



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**ESTUDO SOBRE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
CAFEÍNA DA ERVA-MATE**

ALEXANDRE TIMM DO ESPIRITO SANTO
ENGENHEIRO QUÍMICO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Março, 2016



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ESTUDO SOBRE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CAFEÍNA DA ERVA-MATE

ALEXANDRE TIMM DOM ESPIRITO SANTO

ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). EDUARDO CASSEL

CO-ORIENTADOR: Prof(a). Dr(a). RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS

Dissertação de Mestrado 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 Mestre/Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Março, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ESTUDO SOBRE PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CAFEÍNA DA ERVA-MATE

CANDIDATO: ALEXANDRE TIMM DO ESPIRITO SANTO

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE 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 - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DR. LÚCIO CARDOZO FILHO - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA E DE AGRONOMIA - UEM

DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que são o maior exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos meus familiares amigos e colegas que sempre estiveram presente ao meu lado.

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

À Prof. Dr. Aline Machado Lucas, Me. Guilherme Evaldt Rossa, Prof. Dr. Lígia Damasceno Ferreira Marczack e Dr. Júlia Ribeiro Sarkis pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS pelo auxílio e companheirismo.

À Prof. Dr. Marleny Saldaña pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Ao governo canadense (Programa ELAP) pelo apoio em viabilizar o desenvolvimento de parte do trabalho.

À FAPERGS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE SÍMBOLOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill	20
3.2. Cafeína	22
3.3. Processos extrativos	25
3.3.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)	25
3.3.2. Processamento por alta pressão em meio aquoso (PAP)	27
3.3.3. Campo elétrico moderado (CEM)	28
3.3.4. Infusão	30
3.4. Processos de purificação	30
3.4.1. Extração líquido-líquido	30
3.4.2. Fracionamento por cromatografia em coluna	31
3.4.3. Sublimação e recristalização	32
3.4.4. Antissolvente supercrítico (SAS)	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Amostras de erva-mate	34
4.2. Processos extrativos	35
4.2.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)	35

4.2.2. Extração com processamento por alta pressão (PAP).....	37
4.2.3. Campo elétrico moderado (CEM).....	39
4.2.4. Infusão	43
4.3. Processos de purificação	44
4.3.1. Extração líquido-líquido.....	44
4.3.2. Fracionamento por cromatografia em coluna.....	45
4.3.3. Sublimação e recristalização	46
4.3.4. Antissolvente Supercrítico (SAS)	47
4.4. Análises Cromatográficas	50
4.5. Análises Microscópicas.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1. Processos extrativos	52
5.1.1. Extração com Fluido Supercrítico (EFS)	53
5.1.2. Extração com Processamento por Alta Pressão (PAP)	54
5.1.3. Extração com Campo Elétrico Moderado (CEM)	56
5.1.4. Infusão	59
5.2. Processos de purificação	61
5.2.1. Purificação por extração líquido-líquido	61
5.2.2. Purificação por cromatografia em coluna.....	62
5.2.3. Purificação por sublimação e recristalização	64
5.2.4. Purificação por Antissolvente Supercrítico (SAS).....	64
5.3. Resumo dos processos	67
6. CONCLUSÕES	69
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química da cafeína	23
Figura 3.2. Diagrama de fase genérico pressão <i>versus</i> temperatura.....	26
Figura 3.3. Representação esquemática do processo de eletroporação em uma célula vegetal.	29
Figura 3.4. Esquema do fracionamento por cromatografia em coluna. A amostra (A+B) é separada em A e B devido às diferentes iterações com a fase móvel e a fase estacionária.....	31
Figura 4.1. Fluxograma da unidade piloto de EFS utilizada para realizar os experimentos.....	36
Figura 4.2. Unidade de Processamento à Alta Pressão.....	38
Figura 4.3. Fluxograma do Equipamento 1 para extração por Campo Elétrico Moderado	41
Figura 4.4 Fluxograma do Equipamento 2 para extração por Campo Elétrico Moderado	42
Figura 4.5. Aparato de sublimação.....	47
Figura 4.6. Fluxograma da unidade SAS	48
Figura 4.7. Diagrama de blocos do processo de pré-tratamento para purificação por SAS a partir da extração por infusão.....	49
Figura 5.1. Gráfico de rendimento de cafeína para EFS utilizando CO ₂ , CO ₂ +H ₂ O (cossolvente 10%) e CO ₂ +H ₂ O (unidificação) para amostras de EST-NM.	53
Figura 5.2. Gráfico de extração de cafeína para PAP, rendimento de cafeína para as temperaturas de 293,2 e 363,2 K e pressões de 10, 25, 50, 100, 300 e 600 MPa para amostra NEST-375.	54
Figura 5.3. Gráfico de extração de cafeína para PAP. Rendimento de cafeína para a temperatura de 363,2 K e pressões de 10 e 600 MPa para amostra NEST-375 e EST-375.	55

- Figura 5.4. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração CEM em diferentes frequências à 25 V para amostra EST-NM. 57
- Figura 5.5. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração CEM para 60 Hz e 180 V e 10 Hz e 25 V para amostra EST-375 e 10 Hz e 25 V para amostra EST-375.58
- Figura 5.6. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração aquosa à baixa pressão para a amostra NEST-375..... 59
- Figura 5.7. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração aquosa à baixa pressão para a amostra EST-375. 60
- Figura 5.8. Cromatogramas das frações obtidas na etapa purificação por coluna cromatográfica: (a) Grupo 15-21; (b) Grupo 22-44; (c) Grupo 45-60; (d) solução original. 63
- Figura 5.9. Imagens de microscopia eletrônica para cafeína purificada pelo processo SAS e antes do processamento. (a) cafeína purificada pelo processo SAS utilizando acetona como solvente (aumento de 2000 vezes); (b) cafeína purificada pelo processo SAS utilizando diclorometano como solvente (aumento de 2000 vezes); (c) Extrato antes do processamento por SAS (aumento de 2000 vezes); (d) Cafeína pura após processamento por SAS (aumento de 2000 vezes) Rossa (2015)..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Saldo da Balança Comercial (SBC) da cafeína em toneladas no mercado brasileiro entre 2001 a 2010.....	24
Tabela 4.1. Solubilidade da cafeína em diferentes solventes a 298,2 K	45
Tabela 5.1. Tabela das extrações líquido-líquido utilizando clorofórmio à temperatura ambiente.....	61
Tabela 5.2. Tabela das frações coletadas, recuperação de cafeína e cafeína na solução da purificação por fracionamento por coluna cromatográfica....	62
Tabela 5.3. Tabela de massa de extrato e concentração de cafeína das amostras utilizadas antes e após o processo de purificação por SAS	65
Tabela 5.4. Tabela comparativa entre os quatros processos de extração de cafeína	67
Tabela 5.5. Tabela comparativa entre a concentração e recuperação de cafeína dos quatros processos de purificação de cafeína	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Etapas do processamento da erva-mate.....	21
Quadro 4.1. Nomenclatura das amostras de erva-mate utilizadas nos processo de extração	35
Quadro 4.2. Condições de pressão e temperatura avaliadas por PAP	39
Quadro 4.3. Condições operacionais dos experimentos por CEM a temperatura de 303,2 K.....	40
Quadro 4.4. Condições de temperatura e tempo avaliados para o processo de infusão.....	43
Quadro 5.1. Tipos de erva-mate utilizados em cada processo de extração.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CEM	Campo elétrico moderado
CO ₂	Dióxido de carbono
NEST-375	Erva-mate não estacionada com diâmetro de partícula de 0,375 mm
NEST-NM	Erva-mate não estacionada não moída
EFS	Extração por fluído supercrítico
EST-375	Erva-mate estacionada com diâmetro de partícula de 0,375 mm
EST-NM	Erva-mate estacionada não moída
FEG	Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PAP	Processamento por alta pressão
RC	Rendimento de cafeína
SAS	Antisolvente supercrítico (<i>Supercritical antissolvent</i>)

RESUMO

ESPIRITO SANTO, Alexandre Timm do. **Estudo sobre métodos de extração e purificação de cafeína da erva-mate**. Porto Alegre. 2015. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O mercado de cafeína extraída de produtos naturais vem apresentando crescimento devido ao aumento no consumo de produtos que utilizam esta matéria-prima como bebidas energéticas, fármacos e produtos cosméticos, logo novas formas de se obter o composto vêm sendo estudadas. A erva-mate, por possuir até 2% em massa de cafeína nas suas folhas, é considerada uma fonte alternativa para obtenção de cafeína, contudo é necessário desenvolver uma tecnologia capaz de produzir cafeína purificada. Portanto, este trabalho visa estudar quatro processos para promover a extração: extração por fluido supercrítico (EFS), campo elétrico moderado (CEM), processamento por alta pressão (PAP) e infusão; e quatro métodos de purificação: antissolvente supercrítico (SAS), sublimação e recristalização, fracionamento por cromatografia em coluna e extração líquido-líquido. O procedimento analítico utilizado para quantificar a cafeína resultante dos processos supracitados é a cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados demonstraram que todas as técnicas extrativas foram capazes de remover cafeína das folhas de erva-mate, porém a extração aquosa à pressão atmosférica demonstrou-se mais efetiva, removendo até 1,78% em massa de cafeína por massa de erva-mate. Já o processo por SAS e o fracionamento por cromatografia em coluna foram os que apresentaram os melhores resultados em relação à purificação, visto que produziram cafeína com 95,3% e 99,0% de pureza, respectivamente.

Palavras-Chaves: *Ilex paraguariensis*, cafeína, fluido supercrítico, antissolvente supercrítico, campo elétrico moderado, fracionamento.

ABSTRACT

ESPIRITO SANTO, Alexandre Timm do. **Study of methods for extraction and purification of caffeine from Yerba Mate**. Porto Alegre. 2015. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The caffeine market extracted from natural products is rising due to the increasing consumption of product that use caffeine as a raw material, therefore new ways to obtain caffeine are being studied. Drugs, cosmetic and energy drinks industries are example of industries that are growing and use caffeine in their process. Mate has caffeine up to 2% in mass in the leaves and it is considered as an alternative way to obtain caffeine. However, it is necessary to develop a technology able to extract and after that purify caffeine. Thus, this work aims to study four different extraction process: supercritical fluid extraction (SFE), modified electric field (MEF), high pressure processing (HPP) and infusion; and four purification methodologies: supercritical antisolvent (SAS), sublimation and recrystallization, fractionation by column chromatography and liquid-liquid extraction. To analysis the caffeine in all process HPLC were used. The results showed that all four technologies were able to extract caffeine from mate leaves, however the infusion extraction showed to be the most effective technique, extracting 1,78% mass of caffeine per mass of mate. SAS and fractionation by column chromatography showed the best result in terms of purity: 95.3% and 99.0%, respectively.

Key-words: *Ilex paraguariensis*, caffeine, supercritical fluid extraction, supercritical antisolvent, moderated electric field, purification.

1. INTRODUÇÃO

Entre os grandes símbolos da cultura da região dos pampas, que compreende parte da Argentina, o sul do Brasil juntamente com o Uruguai e o Paraguai, estão o chimarrão e o tererê. Ambas são bebidas originárias de tradições indígenas (Bracesco et al., 2011) que foram incorporadas na cultura ocidental de forma extremamente bem sucedida, diferenciando-se apenas quanto à temperatura em que são consumidas; o tererê é consumido com água fria e o chimarrão com água quente. As duas bebidas são preparadas por infusão aquosa das folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hill, que popularmente é conhecida como erva-mate.

As bebidas preparadas a partir da infusão aquosa da erva-mate conseguem extrair a cafeína presente no material vegetal e assim conferem uma ação estimulante, já que a cafeína atua nos centros corticais do sistema nervoso central aumentando a atividade cerebral (Bastos et al., 2007). Essa propriedade também é desejada em bebidas energéticas, tornando a cafeína o principal aditivo para essa indústria (Heckman et al., 2010). Outra propriedade apresentada pelo composto é a capacidade de permear diferentes camadas biológicas, tornando-o um bom veículo para utilização em cosméticos (Sintov e Greenberg, 2014).

Tanto o mercado de bebidas energéticas, quanto o mercado de cosméticos vem apresentando crescimento econômico e por consequência a demanda por cafeína também está em ascensão. O seu consumo é muito maior que a produção atual. Além disso, a cafeína obtida de produtos naturais é vista como um produto superior à sintetizada quimicamente porque algumas empresas utilizam a palavra natural para aumentar o apelo saudável de seus produtos que sofreram adição de cafeína (Mazzafera, 2012).

A cafeína está presente em diversas partes da *I. paraguariensis*, mas nas folhas é onde as maiores concentrações de cafeína são observadas. A concentração de cafeína pode variar de 1% até 2% em massa para a planta seca (Heck e de Mejia, 2007). Portanto, o presente trabalho visa definir uma tecnologia para a produção de cafeína extraída da erva-mate, a partir de estudos teórico-experimental sobre processos de extração e purificação aplicáveis à obtenção de extratos de matérias-primas vegetais. Tal meta provoca uma mudança de paradigma na indústria ervateira, pois a erva-mate passa para a condição de matéria-prima e não de produto alvo. Neste cenário, é necessário o desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a produção de cafeína a partir da erva-mate.

Para realizar esse processo, é necessário incorporar novas tecnologias ao setor da erva-mate que utiliza processos tradicionais e carente em inovação. Neste trabalho se introduz a tecnologia do campo elétrico moderado (CEM), onde se aplica uma corrente elétrica para promover a extração da cafeína das folhas de erva-mate. Outra metodologia estudada é a extração por fluido supercrítico (EFS), que utiliza a capacidade do CO₂, acima do seu ponto crítico, para solubilizar a cafeína de modo seletivo dos demais compostos presentes na erva-mate. A terceira tecnologia estudada para extração é o processamento por alta pressão (PAP), que utiliza altas pressões para promover o rompimento celular das folhas de erva-mate e facilitar a remoção da cafeína das mesmas. Por fim, também é estudado o processo de infusão aquosa, onde água a pressão atmosférica solubiliza a cafeína, técnica esta que é utilizada para se consumir a erva-mate.

Dentre os processos de purificação da cafeína extraída da erva-mate estudados estão tecnologias mais simples, tal qual a extração líquido-líquido, que fundamenta-se na capacidade do clorofórmio extrair a cafeína de uma fase aquosa. Já o fracionamento por cromatografia em coluna é utilizado para purificar a cafeína dos demais compostos devido a diferença de interação entre os compostos presentes no extrato e as fases móvel e estacionária. O terceiro método estudado é o processamento por antissolvente supercrítico (SAS) que ao precipitar a cafeína em um meio supercrítico irá promover a sua separação dos demais compostos no extrato inicial. A última tecnologia estudada é a sublimação e recristalização da

caféina, fazendo-se valer da capacidade da caféina sublimar numa temperatura onde os outros compostos irão permanecer no mesmo estado físico.

Tendo em vista a crescente busca por caféina obtida de fontes naturais no mercado brasileiro e internacional, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia para extrair e purificar a caféina presente nas folhas de erva-mate. Os processos extrativos estudados foram a EFS, CEM, PAP e infusão. Por sua vez, as tecnologias estudadas para promover a purificação da caféina foram: extração líquido-líquido, sublimação e recristalização, fracionamento por cromatografia em coluna e SAS. Além disso, são avaliados dois tipos de erva-mate como amostra. A primeira, erva-mate estacionada, sofre um processo de envelhecimento (estacionamento) durante o seu processo de beneficiamento, enquanto a segunda amostra, erva-mate não estacionada, não passou por este processo de envelhecimento.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo principal propor uma tecnologia de produção de cafeína purificada obtida a partir da erva mate, percorrendo as etapas de definição e avaliação de processos de extração, assim como de processos de purificação.

2.1. Objetivos Específicos

✓ Selecionar processos de extração para estudos sobre a obtenção de cafeína de erva-mate, mais especificamente folhas moídas e secas (04 processos).

✓ Realizar os experimentos de extração de cafeína da erva-mate com os processos previamente selecionados, avaliando os efeitos das variáveis de processo no rendimento e na concentração de cafeína.

✓ Selecionar entre os processos estudados o mais indicado para a produção de cafeína a partir da erva-mate.

✓ Selecionar processos para estudos sobre a purificação de cafeína a partir de extratos de erva-mate (4 processos).

✓ Realizar os experimentos de purificação de cafeína com os processos previamente selecionados, avaliando os efeitos das variáveis de processo no rendimento e na concentração de cafeína.

✓ Selecionar entre os processos estudados o mais indicado para a purificação da cafeína extraída da erva-mate.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Ilex paraguariensis* St. Hill

A espécie *I. paraguariensis* pertence à família das Aquifoliaceae, é mundialmente conhecida por *yerba mate*, ou apenas mate, expressão esta proveniente da língua espanhola, já que a espécie é nativa de regiões subtropicais da América do Sul. No Brasil, a *I. paraguariensis* é conhecida por erva-mate, uma simples tradução de *yerba mate*. A espécie possui um grande valor cultural para a região que compreende Paraguai, Uruguai, o noroeste da Argentina e o sul do Brasil, pois os habitantes nativos da etnia indígena *guaranis*, antes da colonização europeia, já utilizavam a planta devido a suas propriedades medicinais (Bracesco et al., 2011). Uma das formas que a erva-mate era administrada pelos indígenas era como bebidas estimulantes através da simples infusão aquosa das folhas, o que se manteve até os dias atuais, sendo um dos símbolos da região supracitada. A bebida é conhecida como chimarrão no Brasil, *mate* na Argentina e no Uruguai, onde a infusão é realizada com água quente e tererê no Paraguai, onde o preparo da bebida é realizado com água fria (Balzan et al., 2013; Bracesco et al., 2011).

Do ponto de vista botânico a *I. paraguariensis* é uma árvore perene, dioica, possui florações entre os meses de outubro e novembro e a sua produção de frutos ocorre de março a junho. É uma espécie resistente no que se diz respeito a baixas temperaturas, mas necessita precipitações anuais superiores a 1200 mm e distribuídas ao longo do ano. Os processos de cultivo e colheita variam, entre a extração exploratória da erva-mate nativa e erva cultivada, ou uma combinação de ambos os métodos, mas se acredita que o cultivo de plantações seja o método mais eficiente no uso da terra, necessitando menor área de plantio (Heck e de Mejia, 2007).

A erva-mate passa por um processamento para ser consumida. As folhas que são utilizadas para o preparo das bebidas necessitam de um processo de beneficiamento para conferir aroma, sabor e propriedades características. Esse processamento pode variar de acordo com algumas características que se esteja buscando, mas seguem um procedimento básico de colheita, branqueamento, secagem, envelhecimento e embalagem, como descrito no Quadro 3.1 (Heck e de Mejia, 2007). No caso da erva-mate consumida no Brasil, o produto final não passa pela etapa de envelhecimento.

Quadro 3.1. Etapas do processamento da erva-mate

Etapa	Característica
Colheita	As folhas verdes são cortadas, manualmente ou mecanicamente, e levadas para o processamento.
Branqueamento (Sapeco)	A erva-mate verde é aquecida, normalmente pela queima de madeira, a temperaturas que podem variar de 250 °C a 550 °C durante alguns segundos até 5 minutos. Nessa etapa, há a inativação de enzimas oxidativas devido à quebra da epiderme e estomas e há perda de até 25% da umidade inicial.
Secagem (Barbaquá)	As folhas são expostas a uma corrente de ar quente e com isso são aquecidas até aproximadamente 100 °C de oito a 24 horas, secando-as até uma umidade final de 4,5%.
Envelhecimento (Estacionada)	A planta já seca é colocada em ambientes de temperatura e umidade controladas por um longo período de tempo (até 12 meses) para conferir ao produto final suas características de aroma e sabor.
Embalagem	A erva-mate é misturada, moída e embalada para a comercialização.

Fonte: Adaptado de Heck e de Mejia (2007) e Isolabella et al. (2010)

As propriedades fitoterápicas da *I. paraguariensis* vêm sendo estudadas cada vez mais nos últimos anos por pesquisadores de diferentes países, como: Coréia, Japão, China e Estados Unidos (Bracesco et al., 2011), além dos países de onde é

nativa. Dentre os compostos fitoterápicos presentes destacam-se os grupos polifenólicos, alcaloides e saponinas. Entre os compostos polifenólicos presentes na *I. paraguariensis*, observou-se que a concentração de ácido clorogênico se compara a valores encontrados no chá verde. Estes compostos estão ligados ao potencial antioxidante (Heck e de Mejia, 2007). No estudo de Martins e colaboradores (2012), foi observado que o ácido clorogênico está ligado ao processo de redução de ácidos graxos insaturados em fígados de ratos que consumiram extratos de erva-mate. Às saponinas, na erva-mate formadas principalmente por agliconas do ácido ursólico, são atribuídas propriedades anti-inflamatórias, além de contribuir fortemente ao sabor característico do chimarrão. Destacam-se entre compostos presentes na erva-mate as xantinas, um grupamento de alcaloides, onde estão presentes a cafeína, a teobromina e a teofilina (Bastos et al., 2007; Heck e de Mejia, 2007). A erva-mate é a maior fonte de cafeína consumida em países como Argentina e Uruguai e a terceira maior, ficando atrás apenas do café e chás, quando leva-se em consideração o consumo mundial (Mazzafera et al., 2009).

A cafeína e outras xantinas são encontradas na *I. paraguariensis* em maior quantidade nas folhas, estando presente também no caule. A concentração de cafeína pode variar de 1% até 2% em massa para a planta seca, enquanto a teobromina, que depois da cafeína é a xantina que possui maior concentração na *I. paraguariensis*, apresenta concentrações entre 0,3% a 0,9% em massa (Heck e de Mejia, 2007). Lopes et al. (2007) encontraram variação do teor das xantinas em relação a folhas novas e folhas maduras, já os estudos de Reginatto e colaboradores (1999) mostram que entre as plantas do gênero *Ilex* a única a apresentar valores significativos de cafeína é a *I. paraguariensis*.

3.2. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) apresenta massa molar de 194,19 g/gmol (Figura 3.1), densidade relativa de 1,23 e sublima a temperatura de 451,2 K à pressão atmosférica sem se decompor termicamente. A cafeína tem duas formas estruturais, dependendo das condições de temperatura e pressão: forma I ou α e forma II ou β . A forma α é considerada metaestável e é somente estável a temperaturas acima da temperatura de transição, 428,2 K, até a temperatura de

fusão, 510,2 K, enquanto a forma β é estável a pressão ambiente (Mazel et al., 2011).

A função biológica da cafeína em algumas plantas é de proteção contra predadores em tecidos de folhas, flores e frutos, e de inibição da germinação de sementes quando em contato com o solo. A cafeína, quando ingerida pelos seres humanos, atua no sistema nervoso central, bloqueando receptores de adenosina. Também age como estimulante, acelera o metabolismo e até mesmo auxilia a oxidação de gordura. 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).

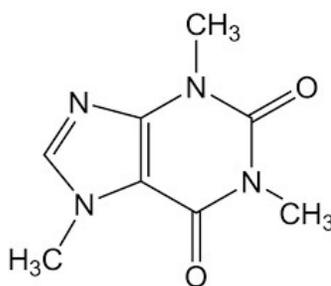


Figura 3.1. Estrutura química da cafeína

Devido a suas características hidrofóbicas, a cafeína possui a capacidade de permear todas as membranas biológicas e também não há barreira para a cafeína entre o sangue e o cérebro. A concentração mais alta de cafeína no plasma sanguíneo humano ocorre no período entre 15 a 120 min após o seu consumo via oral. Já para doses com concentração inferiores a 10 mg/kg a meia-vida da cafeína, para humanos, é entorno de 2,5 a 4,5 horas (Fredholm et al., 1999).

A cafeína pura apresenta diversas aplicações em diferentes setores da indústria: bebidas (refrigerantes e bebidas energéticas), farmacêutica (medicamentos e cosméticos), e alimentícia (Mazzafera et al., 2009; Mazzafera 2012). Dentre os setores que utilizam a cafeína destacam-se o de bebidas energéticas e de cosméticos, visto que estes apresentaram uma expansão considerável nos últimos anos, e a previsão é de que o mercado destes produtos

continue crescendo. A cafeína é utilizada na fabricação de bebidas energéticas devido a suas atividades psicoativas, sendo o principal aditivo destas bebidas (Heckman et al., 2010). A cafeína também é utilizada na produção de cosmético pelas características de liberação transdérmica de fármacos, atividade anti-celulite e inibição de carcinogênese na pele causado pela luz UV (Sintov e Greenberg, 2014).

O aumento do mercado de bebidas energéticas norte americano foi de 240% no período entre 2004 a 2009, sendo os Estados Unidos o maior mercado consumidor do setor (Heckman et al., 2010). A previsão é de que o mercado de bebidas energéticas continue a crescer, saltando de um valor avaliado em US\$ 39,7 milhões (2013) para US\$ 61,7 milhões (2021) (PRNewswire, 2015). Por sua vez, o mercado global de cosméticos era esperado que assumisse a liderança entre os produtos de beleza em 2014, sendo avaliado em US\$ 91 bilhões (Mazzafera 2012), e que atinja a marca de US\$121 bilhões já no ano de 2016 (GCI, 2015). Com isso espera-se que aumente o consumo de cafeína para acompanhar a expansão dos setores citados anteriormente que utilizam este produto.

Segundo Mazzafera (2012) não há dados que evidenciem a produção de cafeína ao redor do mundo, portanto uma avaliação que pode ser feita é a comparação entre a quantidade exportada e importada para cada país. A Tabela 3.1 apresenta o saldo da balança comercial (SBC) brasileira da cafeína entre os anos de 2001 e 2010. Ficando evidente que a demanda nacional de cafeína somente é suprida pela importação e a necessidade em buscar alternativas para a produção de cafeína para atender o mercado interno.

Tabela 3.1. Saldo da Balança Comercial (SBC) da cafeína em toneladas no mercado brasileiro entre 2001 a 2010.

Ano	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Exportação	7	0	2	640	428	276	20	436	272	70
Importação	945	541	1352	1770	1320	1284	1354	1484	1934	2025
SBC	-938	-541	-1350	-1130	-892	-1008	-1334	-1048	-1662	-1955

Fonte: Secretaria do Comércio Exterior, adaptado de Mazzafera (2012)

3.3. Processos extrativos

Os processos estudados neste trabalho para promover a extração da cafeína presente nas folhas da erva-mate são: extração por fluido supercrítico, campo elétrico moderado, processamento por alta pressão em meio aquoso e infusão aquosa.

3.3.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)

O método extrativo que utiliza um fluido supercrítico (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).

Outra vantagem destacável do processo de EFS é a fácil separação soluto-solvente, não necessitando etapas adicionais para promover a obtenção do produto de interesse. A separação é viabilizada pela diminuição da pressão do processo, pois as propriedades do solvente são alteradas quando o solvente passa do estado supercrítico para o estado gasoso. Esse processo apresenta como destaque, além de não exigir uma etapa de separação, a possibilidade de se reaproveitar o solvente, tornando o processo mais sustentável nos quesitos ambiental e econômico (Knez et al., 2014).

A EFS é indicada para extrair compostos a partir de matrizes vegetais e animais, tais como vitaminas, óleos essenciais, aromas e pigmentos, visto que estes apresentam boa solubilidade em FS (Knez et al., 2014). A EFS de 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, enriquecimento dos principais óleos comerciais, valorização de resíduos vegetais e partes de vegetais antes não explorados (de Melo 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 na

Figura 3.2. 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).

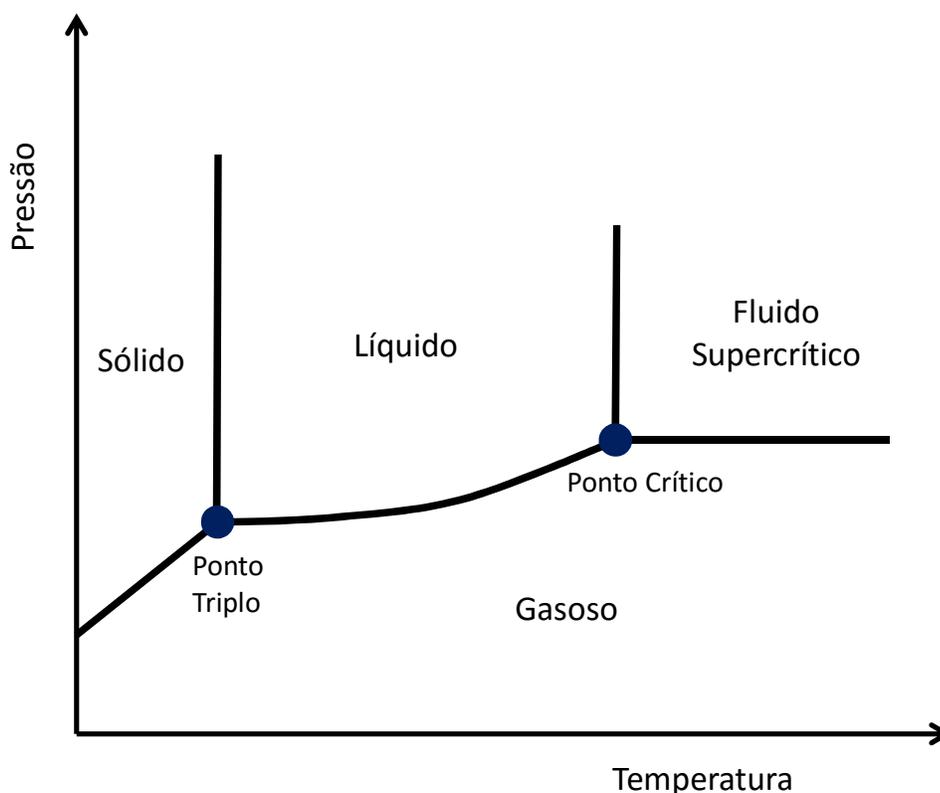


Figura 3.2. Diagrama de fase genérico pressão *versus* temperatura
Fonte: Adaptado de Taylor (1996)

A EFS também apresenta uma característica diferenciada, a possibilidade de variar as propriedades supracitadas do solvente, variando as condições de temperatura e pressão nas quais a extração será realizada. Esses parâmetros influem na transferência de massa e por consequência na determinação de um bom solvente, conferindo assim seletividade ao FS, pois com a variação das condições de processo o FS pode extrair, da mesma matriz, diferentes componentes (Knez et al., 2014).

Além das propriedades já destacadas, a EFS também depende da natureza do solvente. Um bom solvente supercrítico deve apresentar as seguintes características: baixa toxicidade, não ser suscetível à explosão, propriedades críticas não muito elevadas, disponível comercialmente com alta pureza e não danoso ao meio ambiente (Taylor, 1999).

O dióxido de carbono (CO_2) é considerado o solvente universal para os processos supercríticos por que este composto é não inflamável, inerte, atóxico, de fácil reciclagem, baixo custo, possuindo alto poder de solvatação e baixas valores de propriedades críticas. A baixa polaridade do CO_2 é um fator que dificulta o uso deste solvente na extração de compostos que apresentem polaridade mais elevada, mas esse problema pode ser minimizado com a adição de cossolventes (Beckman, 2004; Taylor, 1996). Os cossolventes mais utilizados são polares e se destacam entre estes a água e o etanol (Zulkafli et al., 2014).

3.3.2. Processamento por alta pressão em meio aquoso (PAP)

A tecnologia de processamento por alta pressão (PAP) é utilizada como uma alternativa aos processos térmicos, aquecimento ou refrigeração, para conservar alimentos. O tratamento visa eliminar microrganismos para preservar produtos alimentícios, além de manter suas características originais (Jun, 2009; Tao et al., 2016). O PAP é caracterizado pelo relativo baixo tempo de processo, podendo variar entre alguns segundos até 20 minutos. Além disso, o intervalo de pressões comumente utilizado é entorno de 100 MPa até 800 MPa (Tao et al., 2016).

Entretanto, o PAP também vem sendo utilizado como uma tecnologia alternativa à extração de compostos que estejam em uma matriz vegetal. A vista disso, o PAP surge como uma tecnologia capaz de melhorar a extração sólido-líquido que utiliza técnicas convencionais (Tao et al., 2016). A utilização deste processo como um meio extrativo fundamenta-se no aumento da permeabilidade (teoria da transferência de massa) e da solubilidade (teoria do equilíbrio de fases) com o aumento da pressão. Além disso, a utilização de pressões elevadas causa

danos na matriz vegetal como deformação das células, danos nas membranas celulares e desnaturação de proteínas (Jun, 2009).

Segundo Jun (2009), o PAP é capaz de extrair cafeína presente nas folhas do chá verde, além de apresentar benefícios quando comparado a outros métodos tradicionais como um baixo custo energético, mais rapidez na extração e redução de impurezas. Assim, o autor credita ao PAP a condição de ser uma nova forma de produção de extratos de produtos naturais.

3.3.3. Campo elétrico moderado (CEM)

Técnicas de aplicação de campos elétricos em alimentos surgiram como uma alternativa para processamentos térmicos dos mesmos. 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). A técnica 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. Por isso o processo CEM é chamado de eletroporação (Loghavi et al., 2009).

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 pulsos elétricos curtos e intensos. A presença de um potencial induzido na membrana fornece a energia livre suficiente para rearranjar as estruturas dos fósfolipídeos 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. 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 3.3 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).

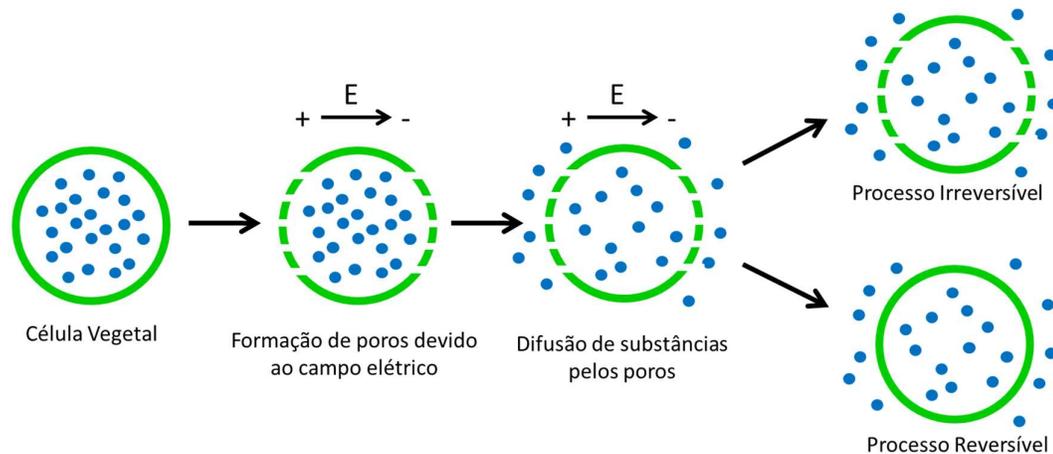


Figura 3.3. Representação esquemática do processo de eletroporação em uma célula vegetal.

Fonte: Adaptado de Vorobiev e Lebovka (2008)

A ocorrência de poros, ou seja, o aumento da permeabilidade da membrana acarreta numa menor resistência, facilitando a difusão de componentes internos da célula. Se a eletropermeabilização ocorre em um tecido vegetal, tanto a condutância quanto a constante dielétrica aparente serão afetadas (Kulshrestha e Sastry, 2006). No processamento de alimentos por CEM os efeitos de difusão são importantes para predição de perdas nutricionais, assim como o aumento da condutividade ao longo do processo (Kulshrestha e Sastry, 2003).

O processamento por CEM envolve a intensidade de campo elétrico e, normalmente, a frequência de 50Hz inferior 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).

3.3.4. Infusão

A técnica de extração por infusão é uma metodologia simples que consiste no poder do solvente, ao entrar em contato com a matriz vegetal, solubilizar determinados compostos. Normalmente é realizada à quente e quando o solvente está em ebulição a técnica denomina-se decocção. Tradicionalmente o processo é feito em sistemas abertos, mas pode ser realizado também em sistemas de refluxo, caracterizando um sistema fechado (Simões et al., 1999).

As bebidas tradicionais preparadas com erva-mate são realizadas através do processo de infusão aquosa, onde a erva-mate e a água entram em contato em um mesmo recipiente (cuia) e é promovida a extração dos compostos (Junior e Morand, 2016). Filip e colaboradores (1998) utilizam esta técnica para extrair e posteriormente quantificar, utilizando técnicas analíticas, a cafeína presente nas folhas de erva-mate.

3.4. Processos de purificação

3.4.1. Extração líquido-líquido

Esta técnica destaca-se como sendo uma das metodologias mais empregadas em laboratórios para promover a separação de compostos, seja para purificá-los ou como um processo de preparação de amostras. O processo é caracterizado pela transferência de soluto entre duas fases que formam um sistema heterogêneo. Normalmente, as fases imiscíveis são constituídas por uma fase aquosa e uma fase orgânica, que mediante o contato intensivo por agitação ocorre a transferência do soluto de uma fase para outra (Facchin e Pasquini, 1998).

A extração líquido-líquido é uma técnica bastante utilizada devido a sua eficiência em processos de separação, contudo possui as desvantagens de ser um processo lento e responsável pela geração de grandes volumes de resíduos de solventes orgânicos (Carasek et al., 2002). A eficiência do processo depende da afinidade do soluto com o solvente que é usado para promover a extração (Queiroz et al., 2001).

3.4.2. Fracionamento por cromatografia em coluna

A técnica de fracionamento por cromatografia em coluna fundamenta-se na diferença de velocidade média que diferentes compostos têm para percorrer uma fase inerte. A coluna consiste em um tubo preenchido por um sólido inerte (fase estacionária) pelos compostos a serem separados irão percorrer, dissolvidos em um solvente (fase móvel). No sistema, os compostos são transportados pela fase móvel e a velocidade média com a qual o soluto migra depende da fração de tempo que o mesmo permanece nesta fase. Quando a fração de tempo na fase móvel é pequena os compostos são fortemente retidos na fase estacionária, ou seja, será necessário mais tempo para que este composto percorra a coluna por completo. Por sua vez, se a fração de tempo na fase móvel é grande os compostos percorrem a coluna em um intervalo de tempo menor (Skoog et al., 2008). A Figura 3.4 apresenta um esquema de como ocorre a separação dos compostos no fracionamento por cromatografia em coluna.

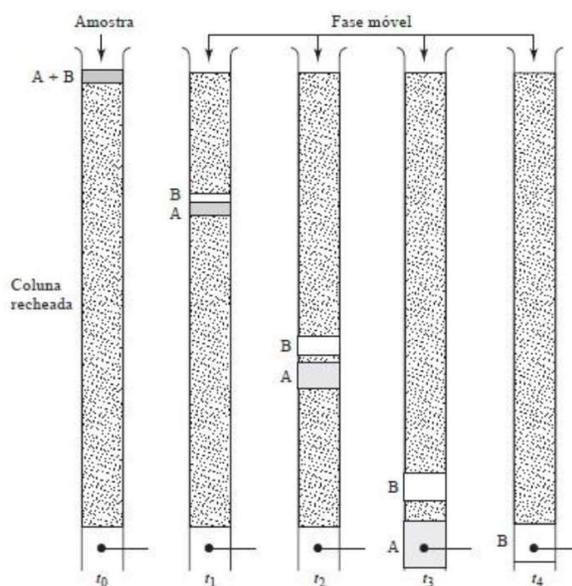


Figura 3.4. Esquema do fracionamento por cromatografia em coluna. A amostra (A+B) é separada em A e B devido às diferentes iterações com a fase móvel e a fase estacionária.

Fonte: Skoog et al. (2008)

Para melhorar o processo, caso a utilização de apenas um solvente não seja suficiente para separar os compostos, pode ser utilizado uma mistura de solventes como fase móvel. Entretanto, se houver a adição de distintos solventes fora de uma mistura, deve-se sempre respeitar uma ordem crescente de polaridade. Desta forma a eluição dos compostos se dará com a modificação gradativa da polaridade da fase móvel. A coleta dos compostos separados é realizada em frações de volume padronizado, conforme a necessidade de cada sistema (Collins et al., 2007).

3.4.3. Sublimação e recristalização

A sublimação é a transformação de uma substância do estado sólido para o gasoso sem a formação de uma fase líquida. Este fenômeno ocorre quando a substância sólida é aquecida à uma pressão menor do que a pressão do ponto triplo, desta maneira a fase líquida não existe e a transição do estado sólido para o estado gasoso ocorre em uma única etapa. O processo inverso, onde há formação de cristais devido ao resfriamento de um gás, é denominado ressublimação (Seader e Henley, 2006).

O processo de sublimação pode ser utilizado para realizar etapas de purificação de compostos, assim como a ressublimação, ou a combinação dos dois fenômenos. Normalmente para a sublimação a substância é sólida à pressão e temperatura ambiente e possui pressão de vapor do sólido maior do que 5 μ m Hg em condições de temperaturas não muito elevadas. As principais aplicações do processo de sublimação e ressublimação são para a obtenção de compostos sólidos de alta pureza ou filmes sólidos puros (Seader e Henley, 2006).

3.4.4. Antissolvente supercrítico (SAS)

Outra grande aplicabilidade dos fluidos supercríticos é para a purificação de extratos e produção de partículas. Especificamente neste estudo, a técnica de interesse é o SAS, visto que a mesma vem demonstrando grande capacidade em purificar extratos naturais e em produzir partículas de interesse a várias áreas do conhecimento como fármacos, polímeros e biopolímeros, supercondutores,

explosivos, entre outros (De Marco e Reverchon, 2011; Reverchon e De Marco, 2011).

O SAS fundamenta-se no uso de um FS para remover um solvente de uma mistura original formada por este mesmo solvente e um soluto. Com a redução da concentração do solvente da mistura, a solução torna-se supersaturada, e por consequência disso ocorre a precipitação de cristais do soluto (Rossmann et al., 2012).

A recristalização promovida pelo SAS é um método utilizado para a purificação de compostos bioativos de fontes naturais. A faixa de pressão de operação habitual do processo SAS varia entre 9 e 15 MPa, região em que o CO₂, tradicional solvente usado em processos supercríticos, é completamente miscível na maioria dos solventes orgânicos (Huang et al., 2013).

A utilização do processamento por SAS para promover purificação ou fracionamento de extratos complexos vem demonstrando ser uma tecnologia promissora. Sánchez-Camargo et al. (2016) estudaram o emprego do SAS para fracionar extratos de alecrim com a finalidade de aumentar a atividade proliferativa de seus extratos. Por sua vez, Catchpole e colaboradores (2004) investigaram o emprego do SAS para fracionar tinturas à base de própolis.

Dados de solubilidade entre os componentes envolvidos no processo SAS são parâmetros importantes tanto para a ação de purificação dos extratos como para a definição de formatos e tamanho finais das partículas (Rossmann et al., 2012). A solubilidade entre o antissolvente e o solvente pode ser facilmente alteradas pela variação de temperatura e pressão do fluido supercrítico (De Marco e Reverchon, 2011). Além das propriedades do FS, outros parâmetros influenciam nas propriedades finais das partículas: concentração do soluto, razão entre as vazões de solvente supercrítico e solvente orgânico e a natureza do solvente orgânico (Osorio-Tobón et al., 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de erva-mate

Para a realização dos experimentos de extração foram utilizadas as seguintes amostras: erva-mate não-estacionada brasileira comercial (Madrugada Alimentos LTDA) e erva-mate estacionada não comercial tipo uruguaio (Baldo S.A.). A erva-mate estacionada passa por um período de estacionamento (envelhecimento), à temperatura controlada, de 04 a 06 meses, fermentando, já a da erva-mate não estacionada não sofre esse processo para atender a característica final desejada pelo consumidor brasileiro. Os dois tipos de erva-mate utilizados eram compostos apenas por folhas, sem a presença de “palitos”.

No Quadro 4.1 é apresentada a nomenclatura definida para as amostras de erva-mate utilizadas neste estudo. Esta nomenclatura leva em consideração a origem das amostras e se a amostra passou ou não por um processo de moagem. A definição de não moída (NM) considera a amostra na granulometria fornecida pela empresa, uma moagem grosseira, onde grande parte da amostra fica retida na peneira com abertura de 2,0 mm. A moagem foi realizada em um moinho de facas Skymssen (Siemsen) e o material moído foi separado em peneiras e foi utilizada as amostras que passaram pela peneira de 0,500 mm de abertura e ficaram retidas na peneira de 0,250 mm de abertura.

A diferença entre as amostras estacionadas e as não estacionadas é que durante o processo de maturação há alteração nas estruturas das folhas, conseqüentemente dificultando a extração dos princípios ativos presentes nas folhas de erva-mate. Sendo assim, justifica-se o uso da erva-mate estacionada, além dos estudos com a erva-mate não estacionada, como forma de comprovar este comportamento para o caso da cafeína.

Quadro 4.1. Nomenclatura das amostras de erva-mate utilizadas nos processo de extração

Erva-mate		Granulometria	
Empresa	Tipo	$\geq 2,0 \text{ mm}^*$	0,375mm
Baldo	Estacionada	EST-NM	EST-375
Madrugada	Não estacionada	-----	NEST-375

* amostra fornecida pela empresa

4.2. Processos extrativos

Os processos de extração selecionados para os estudos foram os seguintes: campo elétrico moderado (CEM), extração por fluido supercrítico (EFS), processamento com água a alta pressão (PAP) e infusão. Os processos selecionados compreendem técnicas avançadas e tradicionais, porém o destaque é que a água foi escolhida como solvente para as extrações, devido a sua capacidade de solubilizar a cafeína. O único método que não utilizou água como solvente foi a EFS, porque na condição supercrítica a água é altamente corrosiva e de difícil obtenção por causa de seu ponto crítico muito elevado. Contudo a água foi escolhida como cossolvente no processo EFS com o objetivo de aumentar a polaridade do solvente. As extrações foram realizadas com a erva-mate não estaciona (NEST) e estacionada (EST). Ao final dos processos extrativos pelos quatros métodos estudados os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) a fim de determinar a quantidade de cafeína removida da erva-mate.

4.2.1. Extração por fluido supercrítico (EFS)

Os experimentos de extração foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS na unidade piloto de extração supercrítica (Figura 4.1). O processo extrativo se iniciou 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 de alta pressão (Maximator® – G35). A jusante da bomba, o CO₂ é aquecido em um

trocador de calor (TC – 2) até a temperatura definida para o processo de extração. O fluido que entra no vaso extrator (VE – 1) se encontra na condição supercrítica, onde o mesmo percola o leito formado pela matriz vegetal, 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 esta redução de pressão o solvente passa para o estado gasoso, precipitando o extrato nos vasos de separação (VS – 1 e VS – 2). A válvula de expansão conta com um sistema de controle de temperatura 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 CO₂. Por fim, o CO₂ passa por um medidor de fluxo (MF – 1) (Siemens® Sitrans FC mass flow 6000) que mensura a vazão do solvente.

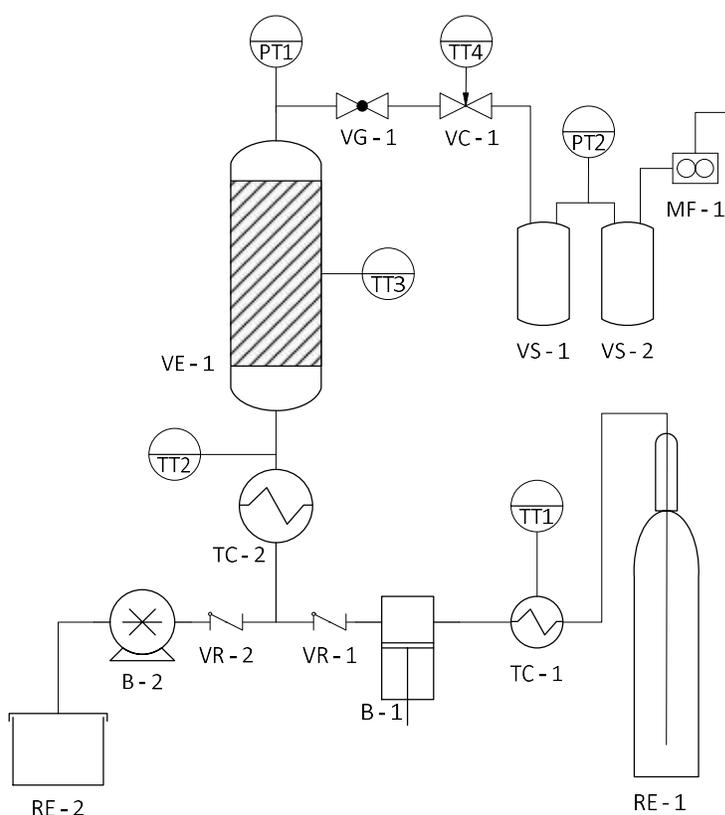


Figura 4.1. Fluxograma da unidade piloto de EFS utilizada para realizar os experimentos
 RE – Recipiente; TC – Trocador de calor; B – Bomba; VR – Válvula de retenção; VE – Vaso de extração; VG – Válvula globo; VC – Válvula de Controle; VS – Vaso de separação; MF – Medidor de fluxo; TT – Medidor de Temperatura; PT – Medidor de Pressão.

A matriz vegetal, erva-mate, utilizada nos experimentos foi a EST-NM e as condições experimentais do processo de extração supercrítica, temperatura e pressão, foram definidas a partir dos estudos previamente realizados por Cassel et al. (2010) e Brun (2012). Para este processo não foram realizados experimentos com a erva-mate NEST em função dos mesmos já terem sido desenvolvidos por Brun (2012). Os resultados destes trabalhos indicam que a condição de maior rendimento de extrato e de maior concentração de cafeína é $P=15$ MPa e $T=323,2$ K, usando CO_2 como solvente. O tempo de extração foi de 90 min (Brun, 2012) e a vazão de CO_2 foi de 700 g/h.

Como forma de potencializar a extração da cafeína, considerando as mesmas condições de temperatura e pressão em que foi realizado a extração com CO_2 puro, foram realizados dois tipos de extrações utilizando água como cossolvente. Na primeira extração a adição de água foi realizada antes do vaso de extração, onde houve a mistura do CO_2 com a água. A razão de água em relação ao CO_2 foi de 10% (m/m). Na segunda extração a água foi adicionada diretamente na erva-mate, umidificando-a antes do início da extração. Para ambos casos a quantidade de água utilizada foi de 120 mL.

4.2.2. Extração com processamento por alta pressão (PAP)

Os experimentos utilizando o PAP foram conduzidos na *University of Alberta* no Canadá em um equipamento multivasos (Unipress, Polônia) apresentado na Figura 4.2. O aparato consiste de um sistema hidráulico, um intensificador de pressão, quatro vasos de 8 mL e um sistema de aquecimento conectado a um banho termostático. A transmissão de pressão do intensificador para os vasos é feita pelo fluido propileno glicol. As amostras de erva-mate foram inseridas nos vasos dentro de um frasco de 3 mL com água e neste frasco é onde ocorre a extração propriamente dita.

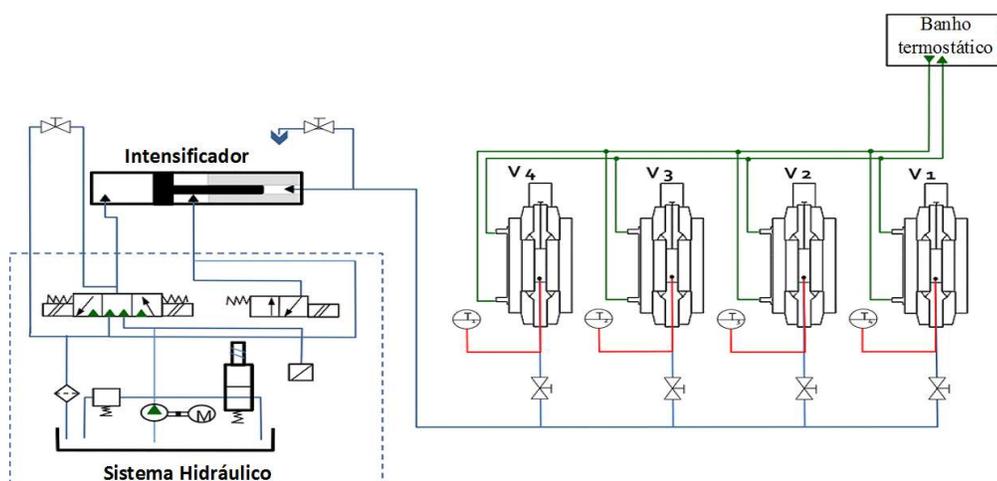


Figura 4.2. Unidade de Processamento à Alta Pressão.

Fonte: Adaptado de Martínez-Monteagudo e Saldaña (2015)

As extrações de cafeína, a partir da erva-mate, por PAP foram conduzidas entre os limites máximos e mínimos do equipamento em relação às variáveis pressão e temperatura, visto que não havia estudos prévios sobre o uso deste processo aplicado à erva-mate. As condições de temperatura e pressão avaliadas para os 12 experimentos são apresentadas no Quadro 4.2. Todas as extrações foram realizadas, inicialmente, com 0,1 g da erva-mate NEST-375 em 2,9 mL de água (concentração de 0,034 g/mL) e tempo de processamento foi de 1 min.

Por fim foi realizado um estudo comparando o processo aplicado a erva-mate NEST-375 com a erva-mate EST-375. Isto foi realizado apenas nas pressões de 10 MPa e 600MPa a 363,2 K. Este procedimento se justifica porque a erva-mate estacionada sofre um processo de envelhecimento enquanto que a outra amostra não, dessa forma busca-se verificar se este processo de envelhecimento influi na extração de cafeína por PAP.

Quadro 4.2. Condições de pressão e temperatura avaliadas por PAP

Experimento	Pressão (MPa)	Temperatura (K)
1	10	293,2
2	25	293,2
3	50	293,2
4	100	293,2
5	300	293,2
6	600	293,2
7	10	363,2
8	25	363,2
9	50	363,2
10	100	363,2
11	300	363,2
12	600	363,2

4.2.3. Campo elétrico moderado (CEM)

O tratamento da erva-mate com CEM tem como objetivo romper permanentemente o tecido das folhas para facilitar a remoção da cafeína durante o processo de extração. Neste estudo foi avaliada a condição do processo CEM que promoveu o maior rendimento de cafeína nos extratos. As duas variáveis de processo foram estudadas com a finalidade de determinar a condição na qual a maior quantidade de cafeína é obtida: tensão e frequência da corrente elétrica.

Para as extrações realizadas por esta tecnologia foram utilizadas a erva-mate EST-375 e a EST-NM. Em função da erva-mate não estacionada ter uma baixa granulometria, conseqüentemente o rompimento celular já ter sido promovido na etapa de moagem, para este processo somente foi estudado para as amostras de erva-mate estacionada. As extrações foram realizadas no Laboratório de Tecnologia e Processos de Alimentos (LATEPA) do Departamento de Engenharia Química da

UFGRS. Dois equipamentos foram utilizados para realizar as extrações. O primeiro (Equipamento 1) é capaz de alterar a frequência, porém a sua tensão máxima é de 25 V. O segundo (Equipamento 2) pode alterar a tensão, mas se limita a frequência da rede pública (60 Hz). No Quadro 4.3 são apresentadas as seis condições de frequência e tensão utilizadas, o tipo de erva-mate empregada em cada procedimento e o equipamento utilizado para realizar as extrações.

Quadro 4.3. Condições operacionais dos experimentos por CEM a temperatura de 303,2 K

Experimento	Frequência (Hz)	Tensão (V)	Equipamento	Erva-mate
1	0	0	1	EST-NM
2	60	180	2	EST-NM
3	10	25	1	EST-375
4	10	25	1	EST-NM
5	100	25	1	EST-NM
6	10000	25	1	EST-NM

O Equipamento 1, apresentado na Figura 4.3, é constituído de um gerador de função (Tektronix Inc., modelo AFG3252, Richardson, Tex, USA) que produz a corrente elétrica, um amplificador elétrico (Industrial Test Equipment, modelo 500A, Port Washington, NY, USA) que aumenta a tensão elétrica e é capaz de mantê-la dentro das especificações. Esses dois equipamentos são conectados em série a uma célula de extração composta por dois eletrodos que é preenchida com água e erva-mate. A célula é colocada sobre um sistema de agitação magnético para promover uniformidade da composição de erva-mate no interior da célula. A célula possui um encamisamento, onde circula um fluido com temperatura constante. Os dados de temperatura, tensão e corrente são registrados *on line* por um sistema de aquisição de dados (*Agilent Technologies Inc.*, Palo Alto, CA, USA).

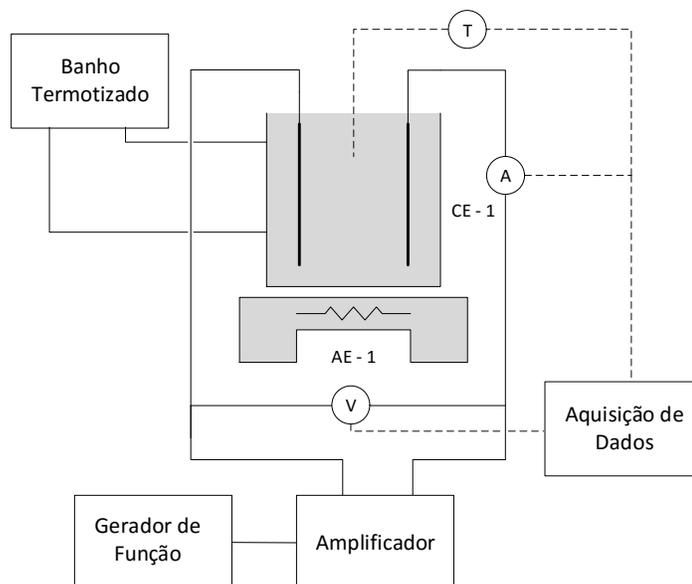


Figura 4.3. Fluxograma do Equipamento 1 para extração por Campo Elétrico Moderado
 CE – Célula de Extração; AE – Agitação Eletromagnética; A – Medidor de corrente elétrica;
 V – Medidor de tensão; T – Sensor de temperatura.

Os parâmetros avaliados no CEM foram os seguintes: frequência da corrente elétrica, tensão elétrica, razão entre a massa de água e a massa de erva-mate (*ratio*) e distância entre os eletrodos. A definição das variáveis estudadas e os limites de aplicação das mesmas foram definidos a partir do estudo realizado por Mercali et al. (2014). Primeiramente foi avaliada a influência da frequência elétrica de 10 Hz até 100 kHz a uma tensão elétrica constante (15 V) e a distância dos eletrodos em 7,2 cm para um *ratio* 20:1 (20 partes de água para 01 parte de erva-mate). As extrações foram realizadas por um período de 2 h, pois este foi o tempo suficiente para esgotar a erva-mate. Os experimentos foram realizados a temperatura constante, $T = 303,2$ K, sendo assim a temperatura não foi considerada uma variável de processo, evitando assim efeitos combinados da temperatura e do CEM.

Em um segundo momento foi avaliada a influência da tensão, comparando os rendimentos obtidos na tensão de 15 V e na tensão a 180 V. A tensão de 180 V foi escolhida por se tratar da tensão máxima de operação do equipamento, já que o equipamento é alimentado pela rede elétrica pública (corrente alternada a 220 V e 60 Hz). O equipamento utilizado (Equipamento 2) para a extração à 180 V (Figura 4.4) é constituído de um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil) que é conectado a um variador de tensão (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo

Varivolt, Brasil). O variador de tensão pode regular a tensão para valores menores que a da fonte. E por fim, os equipamentos estão ligados a um disjuntor (Siemens, Brasil) por motivo de segurança. Os equipamentos estão conectados em série com a célula de extração, composta por um sistema de encamisamento, ligado a um banho termostático. Os eletrodos entram em contato com material vegetal disperso em água, no interior da célula de extração com agitação magnética. O sistema de aquisição de dados (Novus, modelo Field logger, Brasil) é capaz de registrar os valores das variáveis temperatura, corrente elétrica e tensão em função do tempo.

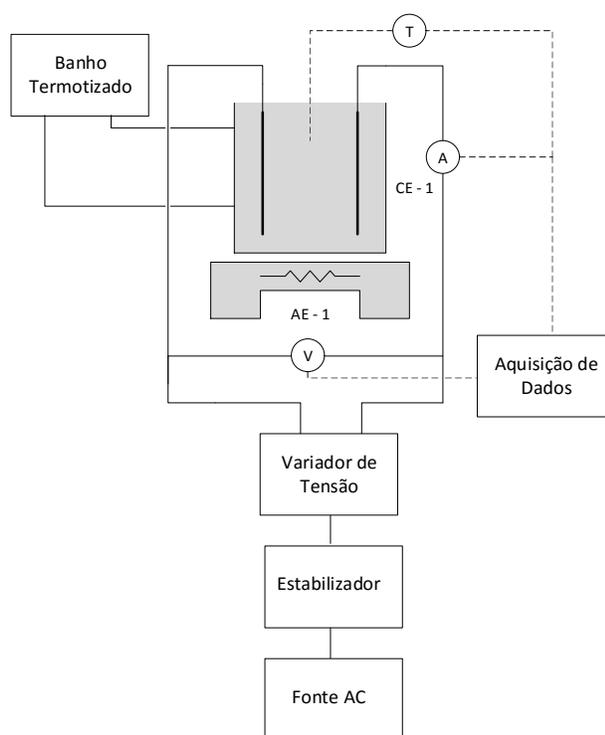


Figura 4.4 Fluxograma do Equipamento 2 para extração por Campo Elétrico Moderado

CE – Célula de Extração; AE – Agitação Eletromagnética; A – Medidor de corrente elétrica; V – Medidor de tensão; T – Sensor de temperatura.

A célula onde a extração foi realizada, assim como a distância entre os eletrodos e o *ratio* foram mantidos constantes para que os mesmos não influenciassem na comparação das extrações a 15 V e 180 V. A única variável que não foi possível manter constante foi temperatura, visto que a 180 V o efeito Joule é mais significativo. Para minimizar isto, o experimento foi iniciado na $T = 278,2$ K. Quando o sistema atingiu 303,2 K, em torno de 30 min após o início do experimento,

a voltagem de 180 V foi cessada completamente e preservada assim até o final das 2 h de experimento, mantendo a temperatura constante.

4.2.4. Infusão

Os experimentos de infusão foram realizados tanto com a erva-mate EST-375, como com a erva-mate NEST-375. Sendo assim possível a comparação entre as duas amostras, visto que a EST-375 sofre um processo de envelhecimento durante o seu beneficiamento o que pode interferir no processo de remoção da cafeína da erva-mate. A massa de erva-mate utilizada foi 1,03 g e o volume de água foi 30 mL, resultando numa concentração de 0,034 g/mL. Os tempos de extração avaliados, assim como as temperaturas estudadas estão apresentados no Quadro 4.4.

Quadro 4.4. Condições de temperatura e tempo avaliados para o processo de infusão

Experimento	Tempo de extração (min)	Temperatura (K)
1	1,0	293,2
2	2,5	293,2
3	5,0	293,2
4	20,0	293,2
5	1,0	333,2
6	2,5	333,2
7	5,0	333,2
8	20,0	333,2
9	1,0	363,2
10	2,5	363,2
11	5,0	363,2
12	20,0	363,2

O processo por infusão foi realizado no interior de um vaso extrator de vidro de 50mL expostos a temperatura por um banho-maria. Após a inserção da erva-mate e da água no vaso extrator, o mesmo foi fechado de maneira que evite-se a perda de água por evaporação, mas mantendo o experimento à pressão atmosférica. No interior do vaso de extração também foi adicionado um agitador magnético para promover a homogeneização do meio.

4.3. Processos de purificação

Para as quatro técnicas utilizadas nos estudos de purificação de cafeína foram utilizadas amostras do extrato obtido por infusão (extração aquosa a baixa pressão) a partir da erva-mate EST-NM. A escolha por esse extrato se deu pelo mesmo apresentar maior ou igual rendimento de cafeína do que outros métodos e por ser de simples e rápida obtenção. Utilizou-se a erva-mate com maior granulometria porque a diferença de remoção de cafeína era pequena e a quantidade de erva-mate utilizada era grande. Deste modo, utilizando esta matéria-prima seria mais rápida, pois não seria necessário um processo de moagem e a separação (filtração) do extrato da erva-mate era mais rápido.

A determinação das quantidades de cafeína antes e depois dos processos de purificação foram determinados por HPLC. Assim buscou-se calcular não apenas a concentração de cafeína no extrato purificado, assim como quantidade recuperada do composto em relação a quantidade do mesmo no extrato original.

4.3.1. Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido consiste em uma operação unitária simples que tem como princípio de funcionamento a solubilidade seletiva de um composto em um solvente imiscível. Logo, a cafeína, originalmente dissolvida em água, foi extraída com clorofórmio, já que neste último a cafeína apresenta maior solubilidade do que na água. O clorofórmio foi escolhido porque apresenta maior afinidade com a cafeína frente a outros solventes orgânicos, conforme apresentado na Tabela 4.1, e por ser imiscível com a água.

A extração foi realizada em funil de separação a temperatura ambiente onde foram utilizados 30,0 mL de extrato da infusão da erva-mate com concentração conhecida e 15,0 mL de clorofórmio. As extrações seguiram dois procedimentos diferentes: no primeiro a adição de clorofórmio foi feita em uma única vez, enquanto que no segundo procedimento foram feitas três adições de 5,0 mL de clorofórmio ao longo da extração. Esta última foi adaptada de Zenebron et al. (2008). Para intensificar a transferência de massa entre as fases e, conseqüentemente, potencializar a extração da cafeína o sistema foi agitado por 2 min a cada adição de clorofórmio. Para determinar a concentração de cafeína ao final do processo da extração líquido-líquido as fases foram analisadas por HPLC.

Tabela 4.1. Solubilidade da cafeína em diferentes solventes a 298,2 K

Solvente	Solubilidade (fração molar x10 ³)
Água	2,10
Metanol	2,00
Etanol	1,71
Tetraclorido de carbono	1,56
Acetona	4,54
Clorofórmio	66,9
Diclorometano	37,0
Acetato de Etila	4,05

Fonte: Adaptado de Shalmashi e Golmohammad (2010).

4.3.2. Fracionamento por cromatografia em coluna

A segunda metodologia estudada para purificar cafeína presente no extrato de erva-mate foi fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando como fase

estacionária sílica gel. A técnica baseia-se na interação entre a fase móvel, onde o extrato está diluído, e a fase estacionária. Os experimentos foram realizados utilizando 20 mL de extrato da infusão da erva-mate, como fase móvel acetato de etila:água:metanol (100:13,5:10) e como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2 mm – 70-230 mesh) (Merck). A altura útil da coluna foi de 28 cm e diâmetro de 2,5 cm. Foram coletadas frações com volume fixo de 5,0 mL. As análises foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Skoog, 2008). A CCD foi escolhida para a análise nesta etapa desse processo pela sua maior rapidez de resposta e pela quantidade de análises. O objetivo foi buscar a fração em que ocorresse a separação da cafeína dos demais compostos presentes no extrato. Para a realização da CCD, utilizou-se a mesma fase móvel que foi utilizada para o experimento de fracionamento por cromatografia em coluna. As análises foram realizadas em placas de sílica (Sílica Gel Alugram Sil G/UV, Merck) e visualizadas em luz UV a $\lambda = 254$ nm, já que os compostos não são visíveis a luz natural. Padrão de cafeína (Sigma Aldrich) com 99% de pureza foi utilizado como referência de comparação nas análises em CCD.

Ao todo foram coletadas 60 frações de 5 mL e estas foram agrupadas em quatro grandes grupos: 1-14, 15-21, 22-44 e 45-60; organizados a partir dos resultados obtidos nas análises em CCD. O término do procedimento em cromatografia em coluna também foi determinado pelas análises em CCD, quando as análises apontaram que não havia mais cafeína no eluente. O processo foi encerrado, totalizando as 60 frações. Por fim, as amostras dos grandes grupos foram analisadas por HPLC para quantificar a cafeína presente nas mesmas.

4.3.3. Sublimação e recristalização

A terceira metodologia estudada para purificar a cafeína foi a sublimação e recristalização, que consiste na mudança da fase sólida para a fase vapor sem a formação de fase líquida intermediária e em seguida a recristalização desse vapor por ressublimação. Os experimentos foram realizados em um sistema laboratorial de arranjo de dois tubos, conforme apresentado na Figura 4.5. O extrato é inserido no tubo mais externo que por sua vez está parcialmente imerso em um banho de glicerol aquecido para que o extrato atinja a temperatura de sublimação da cafeína

(451,2 K). Já o tubo interior é resfriado por um banho termostático para que a cafeína sublimada seja cristalizada em sua superfície. Esta metodologia de arranjo de tubos seguiu os procedimentos realizados por Brun (2012).

Foram utilizados 30 mL do extrato por infusão da erva-mate. Essa quantidade foi seca em estufa a 333,2 K diretamente no tubo utilizado no processo de sublimação. Após toda a remoção de água, os sólidos precipitados foram aquecidos a pelo menos 451,2 K durante 1 h, para promover a sublimação da cafeína. Após a realização do experimento, o tubo onde houve a cristalização foi enxaguado com água para remover a cafeína e posteriormente a solução foi analisada em HPLC para determinar a quantidade de cafeína recristalizada.



Figura 4.5. Aparato de sublimação.
Fonte: Brun (2012)

4.3.4. Antissolvente Supercrítico (SAS)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS em um equipamento SAS (Figura 4.6). O sistema constitui-se de uma linha de FS, que atuará como antissolvente, e uma segunda linha de solvente líquido. A linha de FS é composta por um reservatório de CO₂ líquido (RE – 1). O CO₂ é succionado e pressurizado por uma bomba de alta pressão (B – 1) (Maximator® –

G35). O trocador de calor (TC – 1) resfria o CO₂ e garante que o mesmo ingresse líquido na bomba. Após pressurizado o CO₂ é aquecido em um trocador de calor (TC – 2) para atingir a condição supercrítica. O FS, então, ingressa na parte superior do vaso de precipitação (VP – 1). A linha de solvente líquido é composta por um reservatório (RE – 2), onde está armazenada o extrato dissolvido em um solvente orgânico, uma bomba (B – 2) (Isco® Syringe Pump Model 260D) para succionar a solução e pressurizá-la. A solução entra na parte superior do vaso de precipitação em uma tubulação concêntrica à tubulação de CO₂. A solução ingressa no vaso de precipitação por meio de um injetor (Waters®), que forma pequenas gotículas para aumentar a superfície de contato entre o FS e a solução. No fundo do vaso há um filtro de aço sinterizado (Waters®) de 1 µm para reter apenas as partículas formadas. Por fim, à jusante do vaso de precipitação, há uma válvula de controle (VC – 1) para manter o fluxo de CO₂ constante, dois vasos de coleta do solvente (VS – 1 e VS – 2) e um medidor de fluxo (MF – 1) (Siemens® Sitrans FC mass flow 6000).

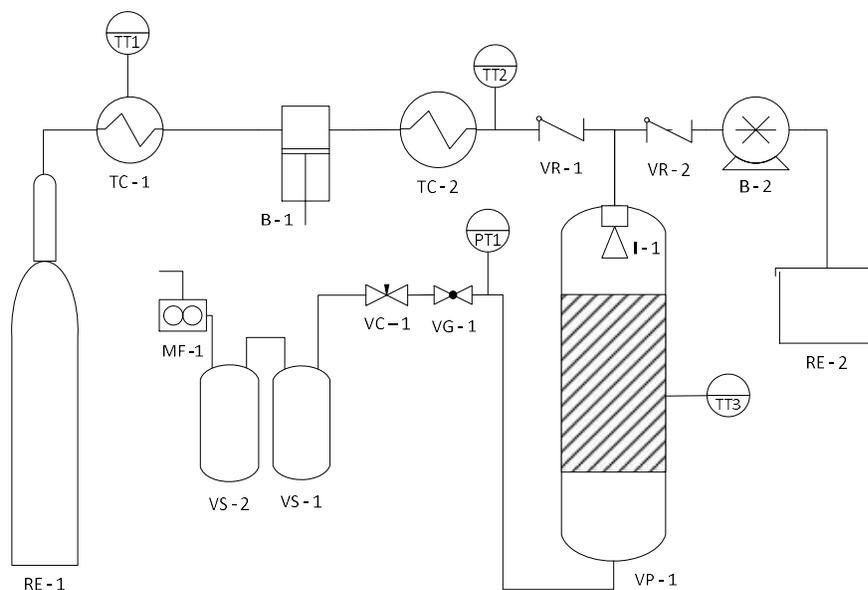


Figura 4.6. Fluxograma da unidade SAS

RE – Recipiente; TC – Trocador de calor; B – Bomba; VR – Válvula de retenção; VP – Vaso de precipitação; VG – Válvula globo; VC – Válvula de Controle; VS – Vaso de coleta de solvente; MF – Medidor de fluxo; TT – Medidor de Temperatura; PT – Medidor de Pressão.

O extrato aquoso de erva-mate, devido a sua polaridade, não é compatível com tecnologia SAS quando se utiliza o CO₂ como FS. Por isso, o extrato aquoso foi primeiramente concentrado, removendo a água, e em seguida submetido a um processo de extração com clorofórmio no qual foi extraído por clorofórmio até verificar-se que o clorofórmio não era capaz de extrair mais cafeína. O objetivo foi remover o máximo de cafeína da fase aquosa e já promovendo um primeiro estágio de purificação. Ao final do processo de extração o clorofórmio foi evaporado, precipitando a cafeína e outros sólidos. Este procedimento está apresentado na Figura 4.7.

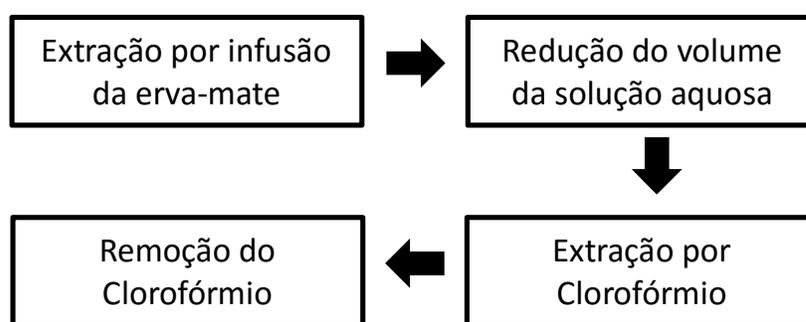


Figura 4.7. Diagrama de blocos do processo de pré-tratamento para purificação por SAS a partir da extração por infusão.

O produto deste processo foi dissolvido em solvente orgânico para serem realizados os experimentos por SAS. O clorofórmio não foi utilizado no processo SAS porque este solvente apresenta grande afinidade com a cafeína o que dificultaria a sua precipitação. Os solventes orgânicos escolhidos foram diclorometano e acetona. Esta escolha se deu pelo fato do diclorometano já ter sido estudado por Brun (2012) e Rossa (2015). Já a escolha da acetona se deu por esta conseguir solubilizar facilmente ceras, um dos constituintes do extrato por infusão da erva-mate. Devido às diferentes solubilidades da cafeína para cada um dos solventes, a concentração da solução injetada foi diferente: 0,0651 g/mL para o diclorometano e 0,0118 g/mL para a acetona. A definição das concentrações das soluções foi feita a partir dos dados de saturação de cafeína nos solventes orgânicos utilizados, facilitando desta forma a precipitação da cafeína (Shalmashi e Golmohammad, 2010).

Os experimentos foram realizados na condição de 10,0 MPa e 333,2 K. Esta condição foi escolhida porque Brun (2012) e Rossa (2014) obtiveram maior rendimento nesta condição. O fluxo de CO₂ utilizado foi de 1300 g/h e o de solvente orgânico foi de 4 mL/min.

Após a formação das partículas, as mesmas foram analisadas em HPLC para verificar a composição dos extratos antes e depois da etapa precipitação com SAS. Dessa forma é possível verificar a eficiência de purificação. Além disso, as partículas tiveram suas morfologias analisadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG) para verificar se o processo alterou a morfologia das mesmas.

4.4. Análises Cromatográficas

As análises de determinação de cafeína foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC). Os experimentos foram realizados no cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series. A metodologia de análise é adaptada de Filip e colaboradores (1998). A coluna de separação utilizada foi a Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm), a detecção foi feita através de U.V. (273 nm) Agilent 1220 Series e o volume de injeção foi de 5 µL. O sistema opera a um fluxo de 1 mL/min dos solventes A (metanol:ácido acético 98:2) e B (água:ácido acético 98:2). Nos primeiros 10 minutos de análise, o fluxo variou constantemente de 17% do solvente A e 83% do solvente B para 20% do solvente A e 80% do solvente B. O fluxo foi mantido constante em 20% de A nos 2 minutos seguintes e aumentado constantemente para 100% em 5 minutos. Por fim, o fluxo foi mantido constante em 100% de A por 5 minutos. Para validar as análises cromatográficas quantitativamente foram realizados ensaios, com diversas diluições de cafeína padrão (Sigma-Aldrich) com 99% de pureza em metanol e água (7:3).

A metodologia utilizada para a determinação de cafeína presente nas folhas de erva-mate foi adaptada das metodologias utilizadas por Filip et al. (1998) e Brun (2012), onde 5 g de erva-mate foram moídas e extraídas em 100 mL de água em

ebulição (decoção) por 20 minutos. Após o resfriamento a solução foi filtrada em papel filtro e analisada em HPLC.

Para as análises dos extratos da EFS também foi realizada uma decoção aquosa dos extratos, mas este procedimento foi realizado nos próprios frascos onde foram coletados os extratos do equipamento de extração supercrítica, a fim de evitar perdas de extrato. Essa decoção teve como objetivo solubilizar o extrato, mantendo insolúvel a cera na mistura, visto que estes compostos não podem ser injetados no HPLC por causa de suas características resinosas. Os extratos obtidos pelos outros três processos de extração, por já estarem em meio aquoso, foram apenas filtrados antes de serem injetados no HPLC. Para as amostras sólidas após purificação, as mesmas foram diluídas em água e filtradas antes de serem injetadas no HPLC.

4.5. Análises Microscópicas

As análises microscópicas foram realizadas em um equipamento de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG) instalado no LabCEMM da PUCRS (Inspect F50, FEI). As amostras analisadas por microscopia foram os sólidos obtidos após o processo de purificação pela tecnologia SAS. Para realizar as análises, as amostras sólidas foram depositadas em uma fita de carbono dupla face, que por sua vez foi posicionada em um *stub*. Para as amostras conduzirem elétrons sua superfície foi metalizada com ouro e o aumento utilizado foi de 2000 vezes e a distância de trabalho utilizada foi de 13,5 mm.

5. RESULTADOS

5.1. Processos extrativos

No Quadro 5.1 são apresentados os tipos de erva-mate utilizados para cada tipo de processo extrativo.

Quadro 5.1. Tipos de erva-mate utilizados em cada processo de extração

	EST-NM	EST-375	NEST-375
EFS	X	O	O
PAP	O	X	X
CEM	X	X	O
Infusão	O	X	X

Legenda: X representa erva-mate utilizada; O representa erva-mate não utilizada

Na EFS foi utilizado apenas a EST-NM em função de estudos extensivos já realizados por Cassel et al. (2010) e Brun (2012) com erva-mate não estacionado. No processo por PAP foram utilizadas apenas as ervas-mate moídas (EST-375 e NEST-375) por limitação do equipamento. Já no CEM foram avaliadas as amostras de EST-NM porque este tipo de processamento é recomendado para produtos com o menor grau de beneficiamento. A EST-375 foi utilizada para fins de comparação. Por fim, o processo por infusão foi realizado com os dois tipos de erva-mate moídas para verificar a influência da temperatura para ambas amostras.

Os resultados dos processos extrativos são apresentados em função do rendimento de cafeína (RC). Esse parâmetro é a relação percentual entre a

quantidade mássica de cafeína extraída pelo processo em relação a quantidade de massa de erva-mate utilizada para realizar o experimento.

5.1.1. Extração com Fluido Supercrítico (EFS)

Os resultados de RC nos extratos obtidos por extração supercrítica da erva-mate (EST-NM) são apresentados na Figura 5.1.

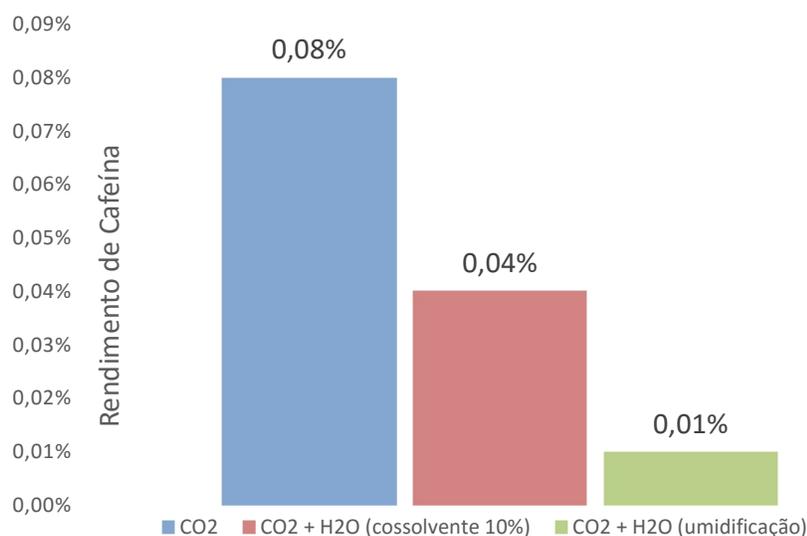


Figura 5.1. Gráfico de rendimento de cafeína para EFS utilizando CO₂, CO₂+H₂O (cossolvente 10%) e CO₂+H₂O (umidificação) para amostras de EST-NM.

O rendimento de cafeína foi baixo para os três procedimentos de extração utilizados, verificando que a adição de água não potencializou a extração de cafeína, reduzindo o rendimento quando comparado à extração com apenas CO₂ supercrítico. Segundo Tello et al. (2011), a adição de água como cossolvente pode ser benéfica devido à hidrossolubilidade da cafeína, porém uma concentração elevada de água afeta o desempenho mecânico da extração, prejudicando o processo (Konar et al., 2014). Outro fator que pode ter influenciado negativamente é a granulometria da amostra utilizada, visto que é recomendado que a amostra seja moída para a realização da EFS, aumentando assim o acesso do solvente supercrítico ao soluto devido ao dano celular promovido pela moagem do material vegetal.

5.1.2. Extração com Processamento por Alta Pressão (PAP)

Na Figura 5.2 estão apresentados os dados de RC das extrações utilizando PAP com a erva-mate NEST-375 nas duas temperaturas avaliadas (293,2 K e 363,2 K) e nas pressões de: 10, 25, 50, 100, 300 e 600 MPa para o tempo de 1 minuto.

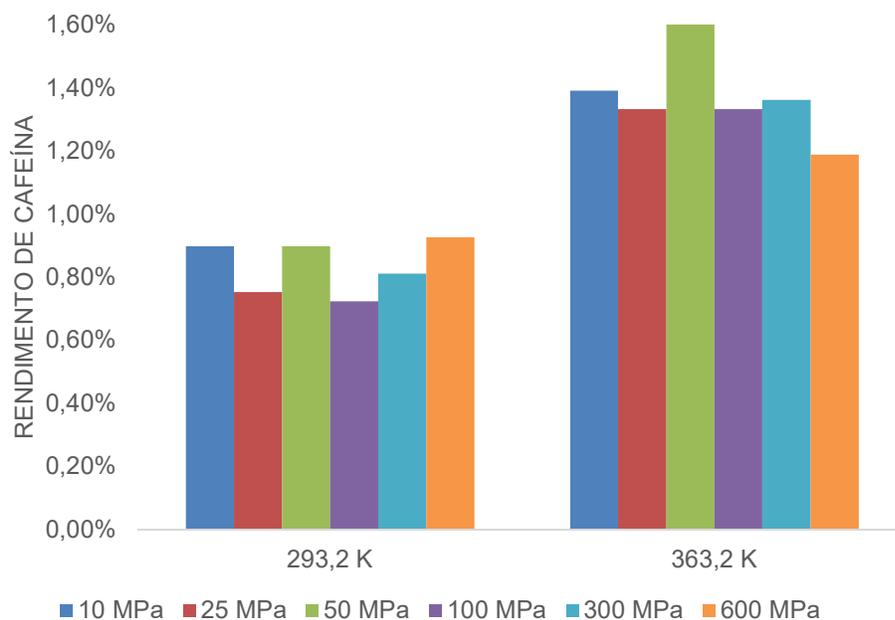


Figura 5.2. Gráfico de extração de cafeína para PAP, rendimento de cafeína para as temperaturas de 293,2 e 363,2 K e pressões de 10, 25, 50, 100, 300 e 600 MPa para amostra NEST-375.

Observa-se na Figura 5.2 que os valores de rendimento de cafeína variaram para as diferentes pressões aplicadas, mas sem respeitar um comportamento. Supõe-se que é devido ao dano celular causado pela moagem prévia do material, impedindo assim uma avaliação mais consistente em relação ao dano do material causado pela pressão. Assim os valores para todas as pressões deveriam ser iguais para uma mesma temperatura, mas isto não ocorreu devido ao erro experimental associado. Acredita-se que o erro experimental está associado a massa de erva-mate utilizada para este experimento (0,1 g) o que acarretou em erros na determinação da

concentração de cafeína. A utilização da massa de 0,1 g se deu pela limitação do equipamento, onde devem ser inseridos a erva-mate e a água para a extração. O equipamento utilizado não suporta recipientes maiores do que 3 mL e por isso não foi possível realizar experimentos com erva-mate não moída, já que a mesma não possuía tamanho compatível com o sistema. Para esta tecnologia seria indicado utilizar um material em que não tivesse sido causado um dano muito agressivo à matriz como a moagem.

O estudo comparativo para as amostras de erva-mate EST-NM e NEST-375 com o objetivo de verificar se a pressão influenciaria de forma diferente as distintas matrizes. Para este procedimento se avaliou os limites extremos do equipamento em relação à pressão (10 MPa e 600 MPa) com a temperatura fixada em 363,2 K. Esses dados estão apresentados na Figura 5.3, bem como os dados de um processo realizado na mesma temperatura, onde a amostra não sofreu tratamento por pressão (0 MPa).

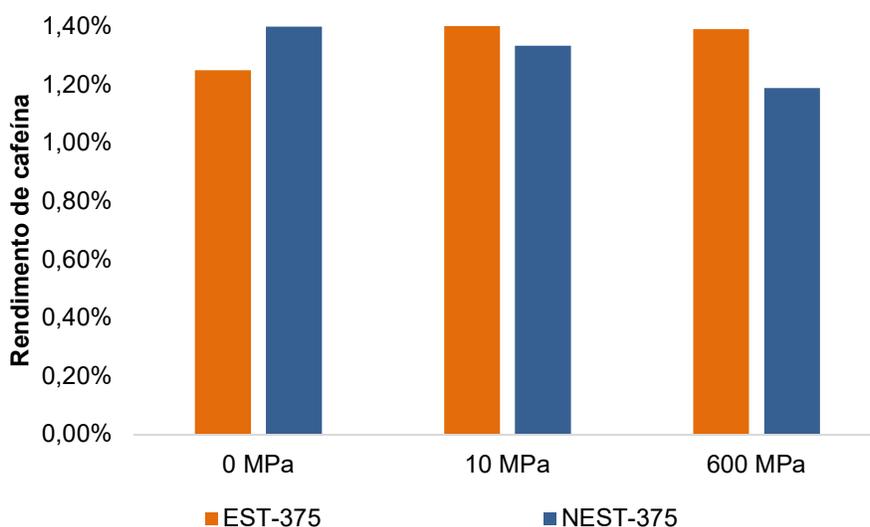


Figura 5.3. Gráfico de extração de cafeína para PAP. Rendimento de cafeína para a temperatura de 363,2 K e pressões de 10 e 600 MPa para amostra NEST-375 e EST-375.

Os resultados para ambas as matérias-primas são bastante semelhantes, indicando que o processamento, mesmo em pressões bastante distintas, não interferiu na extração. Ou, novamente, a granulometria pode ter mascarado os resultados devido aos danos celulares provocados pela moagem

serem maiores do que os causados pelo processo PAP. Novamente, as diferenças encontradas podem ser fruto de erros experimentais devido à quantidade de matéria prima utilizada para esta tecnologia.

5.1.3. Extração com Campo Elétrico Moderado (CEM)

As extrações utilizando CEM foram realizadas pelo período de 120 min, a temperatura constante de 303,2 K, e foram feitas coletas de amostras nos tempos de: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Esse procedimento foi realizado para se ter conhecimento do comportamento do RC ao longo do tempo. O volume (aproximadamente 1,5 mL) de amostra coletada para análise da cafeína por HPLC foi considerado desprezível frente ao total de água remanescente no sistema. Considerando que o processo de extração ocorre à temperatura constante para as diferentes frequências do campo elétrico é possível considerar que a condição de maior RC corresponde à condição em que houve maior rompimento do tecido vegetal.

Na Figura 5.4 são apresentados os resultados de RC *versus* tempo das extrações na temperatura de 303,2 K, usando CEM para a tensão de 25 V e alterando a frequência entre 10 a 10000 Hz para a erva-mate EST-NM. Como teste em branco foi realizado um experimento sem aplicação de campo elétrico (0 Hz) na mesma temperatura dos demais experimentos.

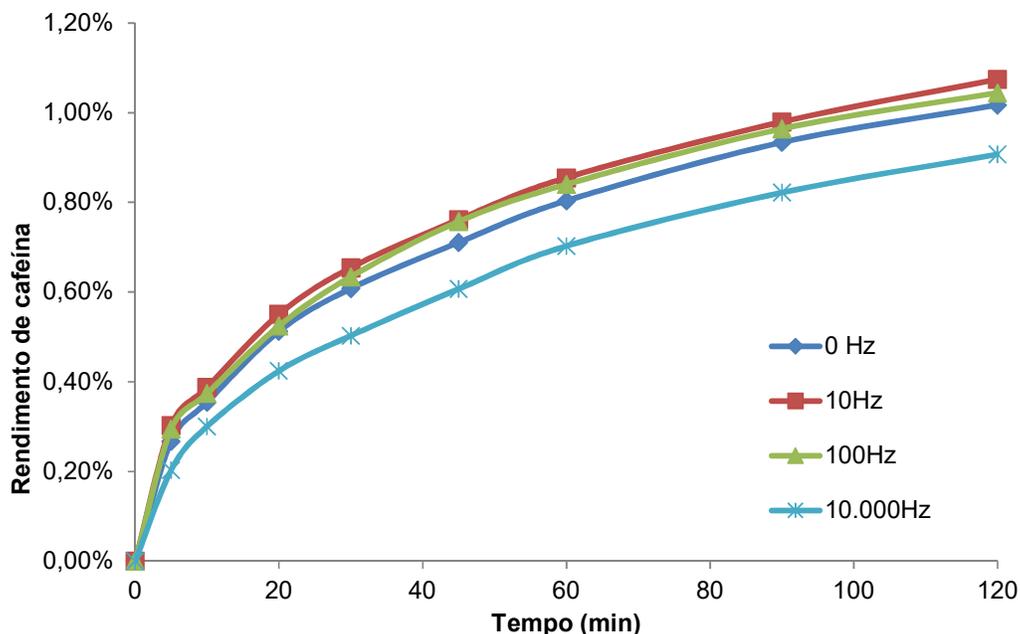


Figura 5.4. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração CEM em diferentes frequências à 25 V para amostra EST-NM.

As extrações variando a frequência entre 10 e 100 Hz mostraram-se ligeiramente mais eficientes do que a extração que não aplicou o campo elétrico. Na frequência de 10.000 Hz observou-se que o rendimento de cafeína diminuiu, quando comparado aos demais experimentos. Também foi possível constatar que o rendimento de cafeína aumenta com a diminuição da frequência, o que já foi observado nos estudos de Lima e colaboradores (1999) e Kulshrestha e Sastry (2003). Isto pode ser justificado pela mobilidade molecular ser prejudicada a frequências mais elevadas (Sensoy e Sastry 2004). Além disso, a influência do CEM é mais acentuada para produtos *in natura* do que produtos processados, que é o caso da erva-mate utilizada (EST-NM), já que etapas prévias do processamento podem ter causado danos celulares maiores nesses produtos (Sensoy e Sastry 2004).

Na Figura 5.5 são apresentados os resultados das extrações utilizando diferentes tensões para o mesmo tipo de erva-mate (EST-NM). Para este caso a diferença de frequências (10 Hz para 25 V e 60 Hz para 180 V) se deve pela limitação do equipamento capaz de trabalhar com tensões elevadas, que opera apenas a 60 Hz. Contudo, a diferença de frequências foi considerada

desprezível. Conforme apresentado na Figura 5.4, a diferença entre a frequência de 10 Hz e 100 Hz é pequena e a frequência de 60 Hz está compreendida neste intervalo. Isso posto, também é apresentado na Figura 5.5 uma extração de comparação entre a erva-mate EST-NM e EST-375 na condição de 10 Hz e 25 V, para avaliar a influência da moagem no processo.

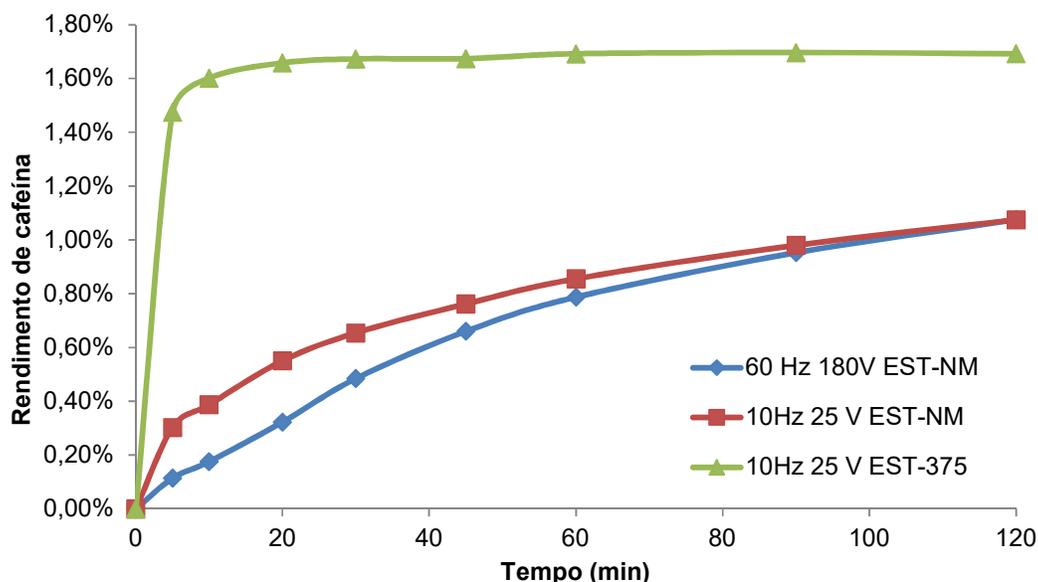


Figura 5.5. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração CEM para 60 Hz e 180 V e 10 Hz e 25 V para amostra EST-375 e 10 Hz e 25 V para amostra EST-375.

As extrações a 25 V e 180 V, utilizando a amostra EST-NM não apresentaram diferença após 120 min quanto ao rendimento de cafeína. A diferença inicial se deve ao fato que a 180 V o sistema iniciou o procedimento na $T = 278,2$ K para compensar o efeito de aquecimento provocado pela aplicação desta tensão ao sistema. Quando a temperatura atingiu 303,2 K e a corrente foi cessada (em torno de 30 min após o início da extração) ambas as curvas começaram a tender para o mesmo valor. Acredita-se que o tempo em que a corrente era de 180 V, em torno de 30 minutos, foi o suficiente para promover a extração e o restante do tempo de extração foi apenas para a difusão da cafeína presente nas folhas de erva-mate para o meio aquoso.

Já o procedimento utilizando a erva-mate EST-375 apresentou um RC maior, quando comparado a qualquer outro procedimento utilizando CEM. Pode-se observar também que para essa extração, logo a 20 minutos, não se extrai mais cafeína. Isso demonstra que o processo de moagem foi mais eficiente do que o processo CEM para a extração de cafeína, tanto no que se diz respeito ao RC quanto ao tempo de extração.

5.1.4. Infusão

Os resultados obtidos para o processo de extração da erva-mate (NEST-375) à pressão atmosférica são apresentados na Figura 5.6. Estes resultados consistem na curva de extração, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração para as temperaturas de 293,2 K, 333,2 K e 363,2 K. O objetivo foi avaliar a influência da temperatura no rendimento de cafeína. Já na Figura 5.7 são exibidos os resultados para a curva de rendimento de cafeína *versus* tempo de extração para as temperaturas em que foram obtidas, porém para a amostra EST-375.

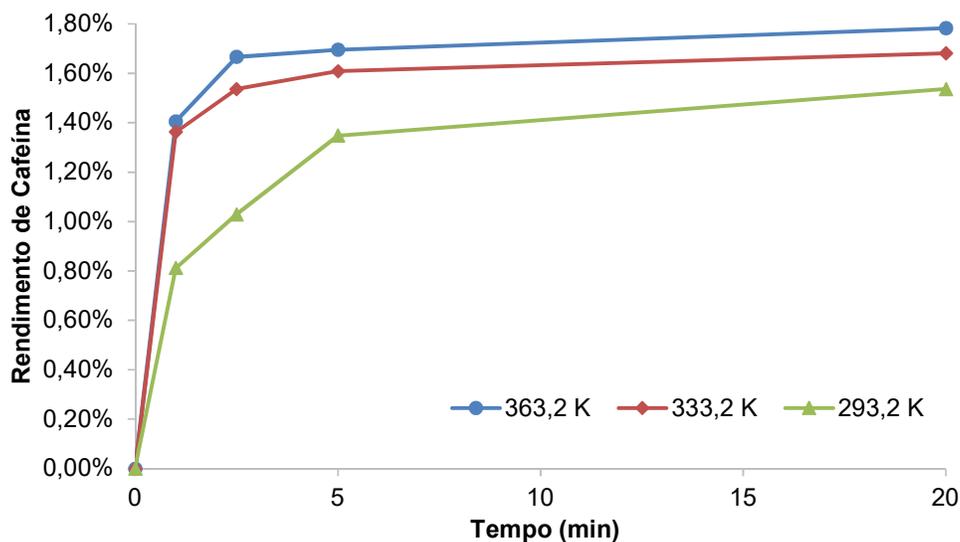


Figura 5.6. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração aquosa à baixa pressão para a amostra NEST-375.

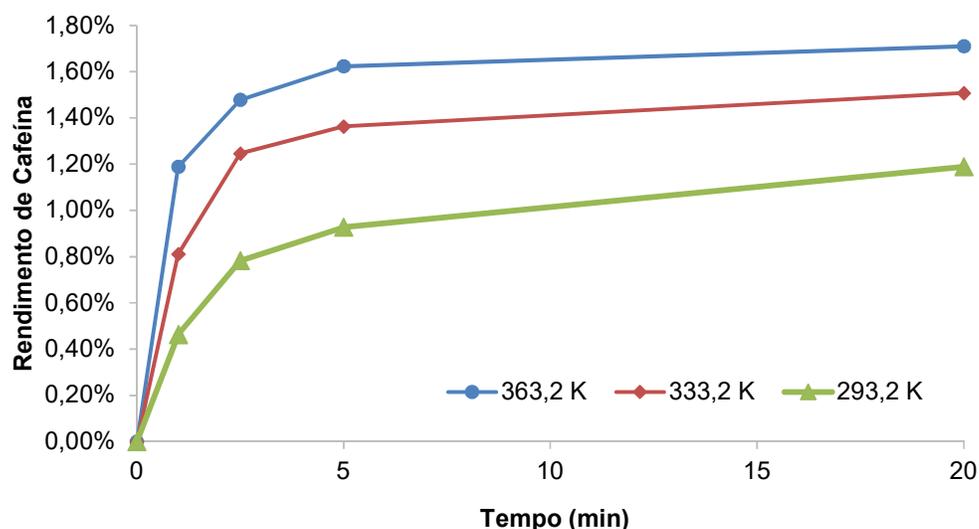


Figura 5.7. Curva de extração de cafeína, rendimento de cafeína *versus* tempo de extração obtido pelo método de extração aquosa à baixa pressão para a amostra EST-375.

Para a amostra de erva-mate EST-375 é possível observar um aumento de 1,51% para 1,71% no RC nos extratos obtidos nas temperaturas de 333,2 K e 363,2 K respectivamente. Quando comparados à temperatura de 293,2 K o aumento foi mais ascentuado de 1,19% para 1,78%, mostrando assim a influência da temperatura nesse processo extrativo. Contudo, essa diferença foi observada de forma mais discreta para a amostra de erva-mate NEST-375, os valores para as temperaturas de 293,2 K, 333,2 K e 363,2 K do RC foram 1,54%, 1,68% e 1,78% respectivamente. Possivelmente este resultado é devido às diferenças existente entre os processos produtivos da erva-mate estacionada (passa por um período de estacionamento, fermentando a erva-mate) e da erva-mate não estacionada (erva-mate sem um período de estacionamento). Em relação aos rendimentos máximos de cafeína, obtidos na temperatura de 363,2 K, observa-se que os valores são semelhantes, 1,78% para NEST-375 e 1,71% para EST-375, permitindo assim inferir que nesta temperatura o efeito do processo produtivo da erva-mate influi pouco no rendimento do processo.

5.2. Processos de purificação

Todos os métodos de purificação utilizaram em seus experimentos extratos obtidos por infusão da erva-mate EST-NM, devido ao fato deste processo ter sido o que apresentou os melhores resultados em relação ao RC e ser um processo de simples e rápido. A seguir serão apresentados os resultados para os métodos de purificação: extração líquido-líquido, cromatografia em coluna, sublimação e recristalização e por fim purificação por processamento SAS. O valores de recuperação de cafeína apresentados se referem ao balanço de massa do composto, levando em consideração como volume de controle o aparato realizado para realizar a purificação.

5.2.1. Purificação por extração líquido-líquido

A purificação da cafeína utilizando clorofórmio como solvente se mostrou eficiente, independentemente se o solvente foi adicionado em uma única vez ou dividido em três adições. Observou-se, contudo, que o procedimento em que a adição de clorofórmio foi em uma única vez (15 mL) foi menos eficiente (67,4% de recuperação de cafeína) e mais seletivo (89,2% de cafeína na solução) quando comparado ao procedimento em que são realizadas três adições de 5 mL (recuperação de 81,8% de cafeína e 81,5% de cafeína na solução), no processo de purificação. Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados da purificação para os extratos purificados de erva-mate, tanto em relação ao rendimento do processo como em relação à pureza do produto final.

Tabela 5.1. Tabela das extrações líquido-líquido utilizando clorofórmio à temperatura ambiente

Solvente	cafeína inicial (mg)	cafeína extraída (mg)	% recuperação de cafeína (m/m)	% cafeína na solução (m/m)
3x5mL clorofórmio	37,20	30,42	81,8%	81,5%
1x15mL clorofórmio	37,20	25,06	67,4%	89,2%

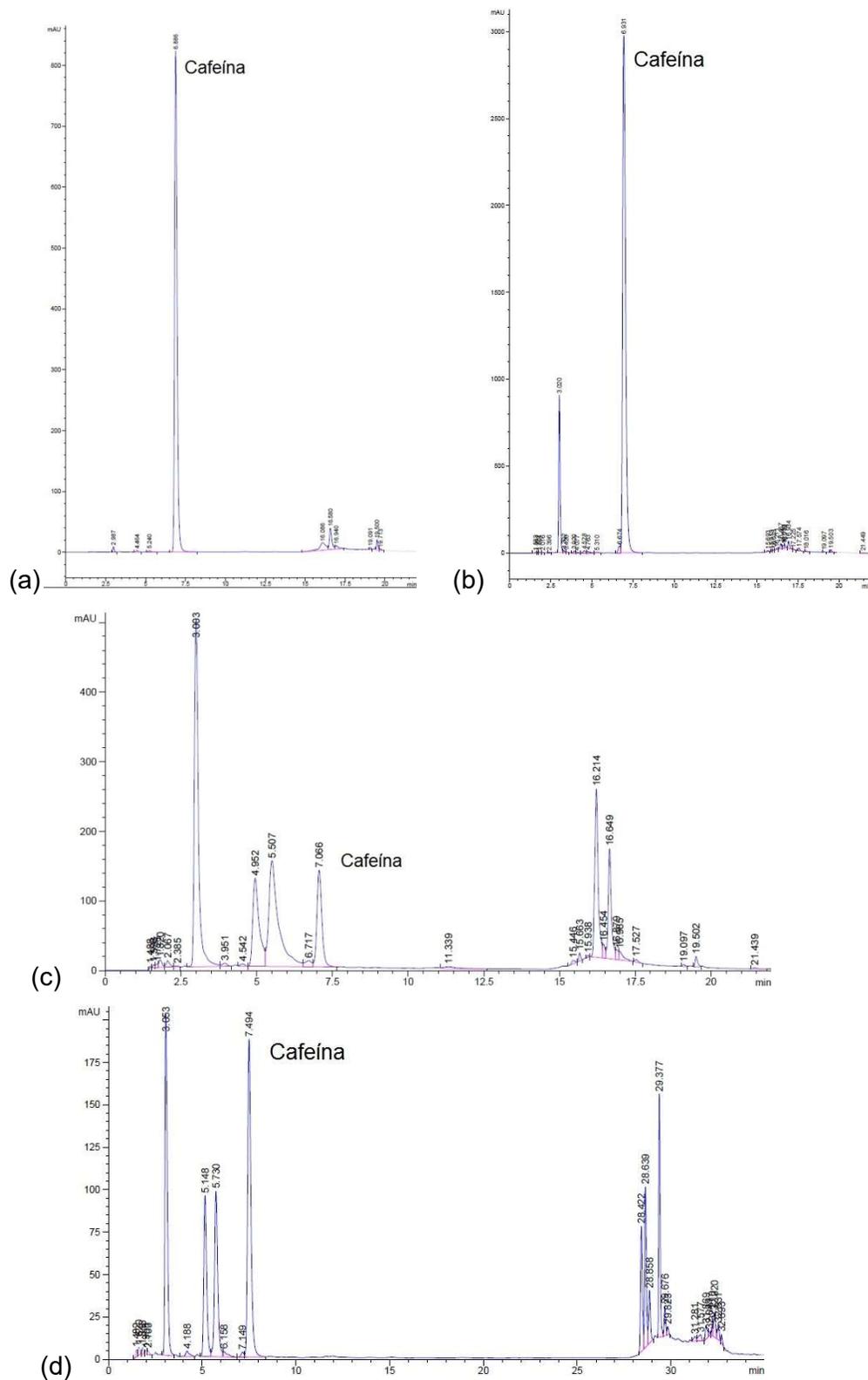
5.2.2. Purificação por cromatografia em coluna

A purificação por cromatografia em coluna foi capaz de separar a cafeína, porém é provável que a altura de recheio da coluna não tenha sido suficiente para que fosse removida toda a cafeína antes que outros compostos começassem a eluir. Os resultados de recuperação (% massa de cafeína/massa de cafeína da solução original) de cafeína e a concentração de cafeína para 04 grandes grupos de frações coletadas: Grupo 1 (1-14), Grupo 2 (15-21), Grupo 3 (22-44) e Grupo 4 (45-60) são apresentadas na Tabela 5.2. Na Figura 5.8 são apresentados os cromatogramas obtidos.

Tabela 5.2. Tabela das frações coletadas, recuperação de cafeína e cafeína na solução da purificação por fracionamento por coluna cromatográfica

Grupos	Intervalo (min)	% recuperação de cafeína (m/m)	% cafeína na solução (m/m)
1	1-14	0,00	0
2	15-21	4,8	99
3	22-44	20,2	53
4	45-60	3,8	2

O sistema estudado não se mostrou eficiente quanto à recuperação de cafeína, porque foi coletada menos de 50% da cafeína inserida na coluna. Em relação à pureza dos extratos, observa-se na Tabela 5.2 e na Figura 5.8 a que a solução do Grupo 2 contém praticamente cafeína pura (99%), enquanto que para a solução do Grupo 3, que apresentou o maior grau de recuperação (20,2%), a concentração de cafeína foi de 53% (m/m). Acredita-se que a diferença entre a quantidade de cafeína que foi inserida e coletada se deu porque uma parte ficou retida na sílica devido à coluna não possuir número de estágios suficientes para a separação desejada.



5.2.3. Purificação por sublimação e recristalização

A purificação por sublimação e recristalização se mostrou bastante seletiva para cafeína, porque se utiliza da propriedade de sublimação do composto, porém a técnica não demonstrou bom resultado em relação à recuperação de cafeína da solução original. A quantidade purificada de cafeína recuperada foi muito baixa, não sendo possível quantificá-la, apenas identificá-la. Dentre os compostos identificados pela análise de HPLC, a partir da amostra coletada no tubo de resfriamento do sistema de sublimação, a cafeína representa 88% da concentração do extrato.

Uma hipótese que pode justificar a baixa recuperação de cafeína é que na etapa de secagem do extrato da erva-mate em estufa o mesmo ficou bastante aderido (incrustado) às paredes do tubo de aquecimento. Possivelmente, a realização de um pré-tratamento para remoção de compostos como ceras e outros compostos de alto peso molecular do extrato antes da etapa de secagem pode potencializar a sublimação da cafeína, conseqüentemente um aumento de sua recuperação pelo processo de sublimação e recristalização.

5.2.4. Purificação por Antisolvente Supercrítico (SAS)

Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados obtidos na purificação do extrato de cafeína por SAS. A massa de extrato da erva-mate inicial (antes do processo de purificação por SAS), assim como a concentração de cafeína foram obtidas após os processos de pré-tratamento apresentado na Figura 4.7. Após a purificação, a cafeína foi pesada e analisada em HPLC para determinar suas concentrações de cafeína, assim como a recuperação.

Tabela 5.3. Tabela de massa de extrato e concentração de cafeína das amostras utilizadas antes e após o processo de purificação por SAS

Solvente	Antes do processamento		Após o processamento		
	Massa de extrato (g)	cafeína (m/m)	Massa recolhida (g)	cafeína (m/m)	recuperação de cafeína (m/m)
Diclorometano	4,54	47,6%	0,59	84,9%	13,0%
Acetona	4,62	50,8%	0,26	95,3%	5,6%

Verificou-se que ambos os solventes utilizados, nas condições de processo trabalhadas, conseguiram aumentar o grau de pureza da cafeína, entretanto a recuperação do processo foi baixa. Isso pode ser explicado pela baixa quantidade de cafeína utilizada ou pela solubilização da cafeína solubilizada pela solução solvente-antisolvente, não sendo retida no vaso de precipitação. Quando se utilizou o solvente acetona a recuperação foi menor ainda.

Outra análise realizada para a cafeína purificada por este método foi a microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG). Foram realizadas análises nos dois produtos recolhidos do vaso coleta após o processamento por SAS, assim como o extrato pré-processado. Desta forma é possível comparar os resultados entre os dois solventes e também comparar de que forma o processamento influenciou a morfologia do material. Na Figura 5.9 são apresentados resultados da análise por FEG, assim como uma análise de cafeína pura, realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), que também foi processada por SAS apresentada por Rossa (2015).

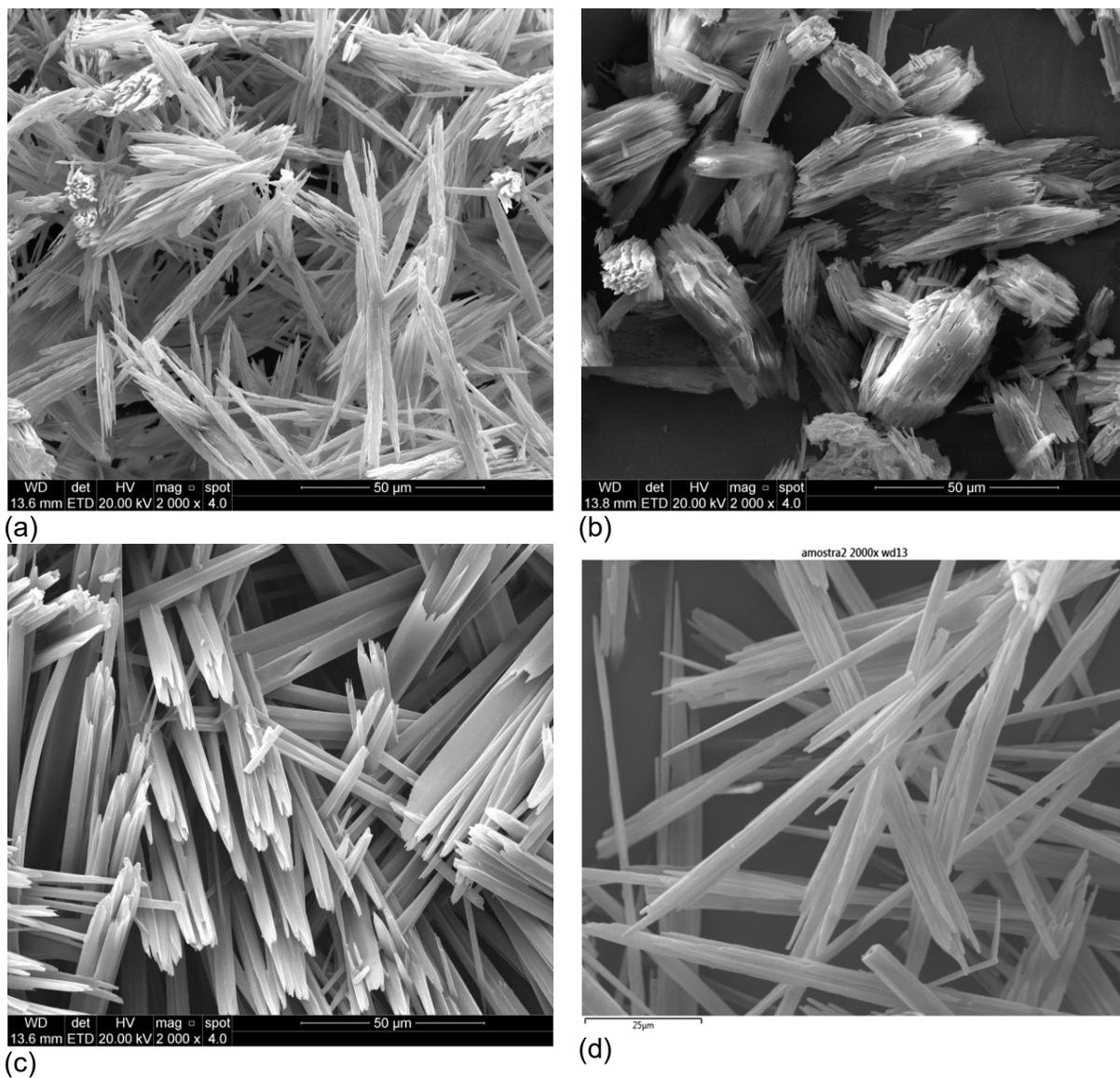


Figura 5.9. Imagens de microscopia eletrônica para cafeína purificada pelo processo SAS e antes do processamento. (a) cafeína purificada pelo processo SAS utilizando acetona como solvente (aumento de 2000 vezes); (b) cafeína purificada pelo processo SAS utilizando diclorometano como solvente (aumento de 2000 vezes); (c) Extrato antes do processamento por SAS (aumento de 2000 vezes); (d) Cafeína pura após processamento por SAS (aumento de 2000 vezes) Rossa (2015).

Todas as imagens obtidas com amostras de cafeína extraída da erva-mate apresentaram maior aglomeramento de partículas do que comparado à cafeína pura obtidas por Rossa (2015). Porém, após o processamento por SAS é possível visualizar que as partículas ficaram menos aglomeradas e tiveram o seu tamanho reduzido. Dentre as duas metodologias de purificação por SAS aplicadas neste trabalho, a que se obteve maior concentração de cafeína

(utilizando-se acetona como solvente) apresentou maior semelhança quando comparada às partículas de cafeína pura.

5.3. Resumo dos processos

Neste estudo foram avaliados quatro processos de extração de cafeína a partir da erva-mate. Foram empregadas nos trabalhos experimentais três amostras de erva-mate, sendo que a diferença entre as mesmas está relacionada aos processos utilizados para a preparação do produto final. Neste estudo foram basicamente consideradas amostras que passaram ou não pela etapa de estacionamento e amostras que possaram ou não por uma relação granulométrica. Como fora de sintetizar os resultados obtidos, são apresentados na Tabela 5.4 os resultados de maior rendimento de cafeína extraída das amostras pelos quatros processos estudados.

A excessão da EFS, os processos demonstraram resultados semelhantes quanto ai rendimento de cafeína. O que pode justicar este fato é que a granulometria foi o principal responsável pelo dano celular e os processamentos aplicados não tiveram influência na extração. Observou-se também que temperatura é um parâmetro importante no rendimento de cafeína. Quanto maior é a temperatura de extração, maior é rendimento de cafeína e mais rapidamente se obtem este composto.

Tabela 5.4. Tabela comparativa entre os quatros processos de extração de cafeína

Tecnologia	Maior RC	Tempo (min)	Temperatura (K)	Erva-mate
EFS	0,08%	90	323,2	EST-NM
PAP	1,37%	1	363,2	EST-375
CEM	1,69%	120	303,2	EST-375
Infusão	1,78%	20	363,2	NEST-375

Seguindo o mesmo procedimento empregado para os processos produtivos, na Tabela 5.5 são apresentados os melhores resultados obtidos para a purificação da cafeína a partir de extratos resultantes do processo de infusão. Os resultados apresentados são recuperação de cafeína e concentração nos extratos purificados. As tecnologias que apresentaram maior concentração de cafeína foram o fracionamento por coluna cromatográfica e SAS. Porém a tecnologia que apresentou maior recuperação de cafeína foi a extração líquido-líquido.

Tabela 5.5. Tabela comparativa entre a concentração e recuperação de cafeína dos quatros processos de purificação de cafeína

Tecnologia	Concentração de cafeína (m/m)	Recuperação de cafeína (m/m)
Extração Líquido-Líquido	89,2%	67,4%
Coluna Cromatográfica	99,0%	4,8%
Sublimação e Recristalização	88,0%*	---
SAS	95,3%	5,6%

*Valor obtido considerando apenas os compostos identificados em HPLC, porque não foi possível determinar a massa recuperada.

6. CONCLUSÕES

Todos se demonstraram capazes de aumentar a concentração de cafeína. A purificação utilizando fracionamento por coluna cromatográfica conseguiu-se atingir elevados índices de pureza de cafeína (99%), porém com uma baixa recuperação (4,8%) devido a fração, onde a cafeína se mostrou majoritária, ser muito pequena frente as demais. A extração líquido-líquido se demonstrou o método mais simples e com melhores valores de recuperação de cafeína (81,8% e 67,4%), mas não foi o que apresentou maiores concentração de cafeína (81,5% e 89,2%). A metodologia de purificação por sublimação e recristalização apresentou resultados semelhantes em relação à concentração de cafeína no extrato aos resultados obtidos pela extração líquido-líquido, contudo a quantidade recuperada foi muito baixa, sendo incapaz de calcular a quantidade recuperada. O método por SAS se demonstrou um método capaz de elevar a concentração de cafeína (95,3%) e mesmo que não possua uma recuperação de cafeína (5,6%) elevada, apresenta um valor agregado de alterar a morfologia da cafeína. Apesar da morfologia, do tamanho das partículas e da aglomeração não serem iguais aos da cafeína pura, demonstrou-se que após o processamento houve mudanças nessas características.

Os estudos realizados permitem concluir que é viável a obtenção de cafeína utilizando a erva-mate como matéria-prima, contudo é necessário uma combinação de operação unitárias estudadas. Como é o caso da infusão para obtenção do extrato e o SAS para obter o produto final com elevada concentração é um caminho para o desenvolvimento de um processo de produção de cafeína. Porém, será necessário otimizar os processos de separação e purificação, através de um estudo planejado sobre as influências das variáveis destes processos na produção de cafeína purificada.

A extração por infusão consistiu no processo que produziu os melhores resultados para remoção de cafeína além de ser uma tecnologia simples e apresentar uma capacidade de extração semelhante ao CEM e a PAP. A moagem demonstrou-se o principal causador de danos celulares na erva-mate. Por exemplo, na extração por CEM, que tem a finalidade de promover danos na parede celular da planta, utilizando as mesmas condições de processo, o uso da erva-mate moída representou um rendimento de cafeína de 1,69% frente aos 1,07% quando utilizada da planta com maior granulometria. A temperatura também é um parâmetro que influencia na extração de cafeína, como por exemplo na extração por infusão em 20 min o RC obtida foi de 1,54% e 1,78% para as temperaturas de 293,2 K e 363,2 K, respectivamente.

O CEM não demonstrou uma capacidade de promover um grande dano celular, já que a utilização do processo aumentou apenas 5% o rendimento da extração em relação a extração que não utilizou o CEM. Isso se justifica por ter-se usado a erva-mate EST-NM que já sofreu tratamentos prévios (beneficiamento da erva-mate e pré-moagem), justificando o baixo acréscimo no rendimento da extração.

Na EFS o rendimento de cafeína obtido com a erva-mate estacionada (EST-NM) é 63,7% mais baixo quando comparado com a erva-mate não estacionada realizados por Brun (2012) obtido nas mesmas condições operacionais. Por sua vez, a água foi prejudicial a EFS na quantidade estudada, tanto como co-solvente quanto para umidificar a planta.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

✓ Aprofundar os estudos sobre o efeito das variáveis de processo no rendimento e na purificação da cafeína para os processos que proporcionaram os melhores resultados deste estudo.

✓ Utilizar erva-mate *in natura* (sem processamento) nas extrações por CEM para avaliar o real efeito do dano celular causados por esta técnica e, conseqüentemente, na extração da cafeína. O dano celular também poderia ser avaliado por microscopia eletrônica.

✓ Realizar extrações com a tecnologia por PAP com erva-mate sem ter sofrido um processo de moagem para avaliar o real efeito do dano celular causados por esta técnica e, conseqüentemente, na extração da cafeína.

✓ Explorar outras condições para a EFS, tais como: temperatura e pressão, mas principalmente o teor de umidade da erva-mate, ou até mesmo utilização de etanol como cossolvente por ser um solvente mais compatível com o CO₂ supercrítico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALZAN, S.; Hernandez, A.; Reichert, C. L.; Donaduzzi, C.; Pires, V. A.; Gasparotto Junior, A.; Cardozo Junior, E. L. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115-122, 2013.

BASTOS, D. H. M.; Oliveira, d. D. M.; Matsumoto, R. L. T.; Carvalho, P. d. O.; Ribeiro, M. L. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007.

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.

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.

BRUN, G. W. **Processo de Produção de Erva-Mate Descafeinada e de Micro/Nanopartículas de Cafeína usando Dióxido de Carono Supercrítico**. Porto Alegre. 2012.118p. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

CARASEK, E.; Tonjes, J. W.; Scharf, M. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por

espectrometria de absorção com chama. **Química Nova**, v. 25(5), p. 748-752, 2002.

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.

CATCHPOLE, O. J.; Grey, J. B.; Mitchell, K. A.; Lan, J. S. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 29, p. 97-106, 2004.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1º ed. São Paulo: editora da UNICAMP, 2007. 456p.

DE MARCO, I.; Reverchon, E. Influence of pressure, temperature and concentration on the mechanisms of particle precipitation in supercritical antisolvent micronization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 295-302, 2011.

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.

FACCHIN, I.; Pasquini, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, v. 21(1), p. 60-68, 1998.

FILIP, R.; Lopez, P.; Coussio, J.; Ferraro, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 129-131, 1998.

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.

GCI. U.S. Skin Care Market to Reach Nearly \$11 Billion in 2018. Disponível em: <<http://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/skincare/US-Skin-Care-Market-to-Reach-Nearly-11-Million-in-2018-311287121.html>> Acesso em: 14 novembro 2015.

HECK, C. I.; De Mejia, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, v. 72, p. R138-151, 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.

HUANG, T.-L.; Lin, J. C.-T.; Chyau, C.-C.; Lin, K.-L.; Chang, C.-M. J. Purification of lignans from *Schisandra chinensis* fruit by using column fractionation and supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 27-37, 2013.

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.

JUN, X. Caffeine extraction from green tea leaves assisted by high pressure processing. **Journal of Food Engineering**, v.94, p. 105-109, 2009.

JUNIOR, E. L. C.; Morand, C. 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.

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.

KONAR, N.; Dalabasmaz, S.; Poyrazoglu, E. S.; Artik, N. Colak, A. The determination of the caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea* aerial parts under various extraction conditions by supercritical fluid extraction (SFE). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 89, p. 128-136, 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.

LIMA, M; Heskitt, B. F.; Sastry, S. K. The effect of frequency and wave form on the electrical conductivity-temperature profiles of turnip tissue. **Journal of food process engineering**, v. 22, p. 41-54, 1999.

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.

LOPES, M. R. S.; Martinez, S. T.; Chaves, V. C.; Rocha, A. S. R.; Amarante, L. Determinação por HPLC de cafeína e Teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 954-956, 2007.

MARTÍNEZ-MONTEAGUDO, S. I.; Saldaña, M. D. A. Kinetics of lactulose formation in milk treated with pressure-assisted thermal processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v 28, p 22-30, 2015.

MARTINS, F.; Noso, T. M.; Porto, V. B.; Curiel, A.; Gambero, A.; Bastos, D. H. M.; Ribeiro, M. L.; Carvalho, P. d. O. Maté Tea Inhibits In Vitro Pancreatic Lipase Activity and Has Hypolipidemic Effect on High-fat Diet-induced Obese Mice. **Obesity**, v. 18, p. 42-47, 2012.

MAZEL, V.; Delplace, C.; Busignies, V.; Faivre, V.; Tchoreloff, P.; Yagoubi, N. Polymorphic transformation of anhydrous caffeine under compression and grinding: a re-evaluation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 7, p. 832-840, 2011.

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.

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.

OSORIO-TOBÓN, J. F.; Carvalho, P. I. N.; Rostagno, M. A.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. Precipitation of curcuminoids from an ethanolic turmeric extract using a supercritical antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 26-34, 2016.

PRNEWSPRIDE. Global Energy Drinks Market 2015-2021: Insights, Market Size, Share, Growth, Trends Analysis and Forecasts for the \$61 Billion Industry. Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/news-releases/global-energy-drinks-market-2015-2021-insights-market-size-share-growth-trends-analysis-and-forecasts-for-the-61-billion-industry-300137637.html>> Acessado em: 14 novembro 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação em cromatográfica. **Química Nova**, v. 24(1), p. 68-76, 2001.

REGINATTO, F.H.; Athayde, M.L.; Gosmann, G.; Schenkel E..P. Methylxanthines accumulation in Ilex species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other Ilex species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.10, n.6, p. 443-446, 1999.

REVERCHON, E.; De Marco, I. Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology. **Chemical Engineering Journal**, v. 169, p. 358-370, 2011.

ROSSA, G. E. **Desenvolvimento e implantação de unidade piloto de precipitação de partículas usando antissolvente supercrítico (SAS)**. Porto Alegre. 2015.72p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Programa de Pós Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

ROSSMANN, M.; Braeuer, A.; Dowy, S.; Gallinger, T. G.; Leipertz, A.; Schluecker, E. Solute solubility as criterion for the appearance of amorphous particle precipitation or crystallization in the supercritical antisolvent (SAS) process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 350-358, 2012.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; Mendiola, J. A.; Valdés, A.; Castro-Puyana, M.; García-Cañas, V.; Cifuentes, A.; Herrero, M.; Ibáñez, E. Supercritical antisolvent fractionation of rosemary extracts obtained by pressurized liquid extraction to enhance their antiproliferative activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 581-589, 2016.

SEADER, J. D.; Henley, E. J. **Separation Process Principle**. 2ª Ed. Hoboken: Wiley, 2006. 756p.

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

SHALMASHI, A.; Golmohammad, F. Solubility of caffeine in water, ethyl acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane, and acetone between 298 and 323 K. *Latin American applied research*, v. 40, p. 283-285, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC, 1999. 821p.

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**. 8º ed. São Paulo: Thomson, 2008. 999 p.

TAO, Y.; Sun, D.; Górecki, A.; Blaszcak, W.; Lamparski, G.; Amarowicz, R.; Fornal, J.; Jelinski, T.; A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing in parallel with oak chip maceration on the physicochemical and sensory properties of a young red wine. **Food Chemistry**, v. 194, p. 545-554, 2016.

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

TELLO, J.; Viguera, M.; Calvo, L. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 53-60, 2011.

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

Zenebron, O.; Pascuet, N. S.; Tiglea, P. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

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.