

ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS  
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

BRUNA SGARIONI

**PROCESSAMENTO DOS EXTRATOS DA ERVA-MATE: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
ENCAPSULAMENTO**

Porto Alegre  
2023

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



# **PROCESSAMENTO DOS EXTRATOS DA ERVA-MATE: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ENCAPSULAMENTO**

**BRUNA SGARIONI**  
ENGENHEIRA QUÍMICA

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

**Porto Alegre**  
**Março, 2023**



# **PROCESSAMENTO DOS EXTRATOS DA ERVA-MATE: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ENCAPSULAMENTO**

**BRUNA SGARIONI**

BACHAREL EM ENGENHEIRA QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Dissertação 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 em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Março, 2023**

## Ficha Catalográfica

S523p Sgarioni, Bruna

Processamento dos extratos da Erva-Mate : extração,  
purificação e encapsulamento / Bruna Sgarioni. – 2023.  
79.

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cassel.

1. Ilex paraguariensis. 2. Cafeína. 3. Polifenóis. 4. Nanocápsulas.  
5. Gelatina. I. Cassel, Eduardo. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



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

## **Processamento dos extratos da erva-mate: extração, purificação e encapsulamento**

**CANDIDATA: BRUNA SGARIONI**

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**

### **BANCA EXAMINADORA**

**DRA. GILSANE LINO VON POSER - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - UFRGS**

**DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - DO PGETEMA - PUCRS**

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900  
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625  
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br  
www.pucrs.br/politecnica

*“Nossa maior fraqueza é a desistência. O caminho mais certo para o sucesso é sempre tentar uma vez mais”  
(Thomas Edison)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, meus maiores exemplos e inspirações, e a todos aqueles que acreditaram em mim de alguma forma.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a todos os meus familiares, que sempre me deram forças e me incentivaram a acreditar em mim.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando estivesse distante.

Ao orientador Prof. Dr. Eduardo Cassel pelo apoio irrefutável e a confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS pela amizade e por todos os auxílios prestados.

A equipe da UNIVATES em especial a Profa. Claucia Fernanda Volken de Souza, a Ma. Renata Pelin Viciniescki e ao Me. Guilherme Schwingel Henz pelo auxílio na utilização do *spray dryer*.

A empresa Baldo S.A. pelo fornecimento de matéria prima e fomento da pesquisa desenvolvida neste trabalho.

Ao CNPq e a CAPES pelo fomento do trabalho desenvolvido.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>8</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	21
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
3.1. Processamento da Erva-Mate.....	22
<b>3.2. Compostos Bioativos .....</b>	<b>23</b>
3.2.1. Metilxantinas.....	23
3.2.2. Polifenóis.....	25
<b>3.3. Técnicas de Extração .....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Extração por Fluido Supercrítico.....	26
<b>3.4. Técnicas de Análise .....</b>	<b>27</b>
3.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	27
3.4.2. Atividade Antioxidante .....	27
3.4.3. Determinação de Polifenóis Totais .....	27
<b>3.5. Encapsulamento de Compostos Bioativos .....</b>	<b>28</b>
3.5.1. <i>Spray Dryer</i> .....	28
<b>3.6. Liberação de Compostos Bioativos Encapsulados .....</b>	<b>29</b>
3.6.1. Modelos de Liberação .....	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Descafeinização da Erva-mate por Extração com Fluido Supercrítico .....	31

	10
4.1.1. Fracionamento do Extrato .....	32
4.1.2. Separação e Concentração da Cafeína.....	32
4.1.3. Determinação da Capacidade Antioxidante .....	34
4.1.4. Análise da Cafeína por CLAE .....	34
<b>4.2. Extração de Polifenóis a Partir da Erva-Mate Descafeinada .....</b>	<b>35</b>
4.2.1. Qualificação e Quantificação de Polifenóis por CLAE .....	36
4.2.2. Quantificação dos Polifenóis pelo Método Folin-Ciocalteu .....	36
4.2.3. Atividade Antioxidante .....	37
<b>4.3. Encapsulamento da Cafeína .....</b>	<b>38</b>
4.3.1. Nano <i>Spray Dryer</i> .....	38
4.3.2. <i>Spray Dryer</i> .....	39
4.3.3. Nano Precipitação em Etanol.....	40
<b>4.4. Caracterização das Cápsulas .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5. Ensaio de Liberação dos Compostos Bioativos.....</b>	<b>41</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Extração por Fluido Supercrítico .....</b>	<b>43</b>
5.1.1. Fracionamento do Extrato e CCD .....	43
5.1.2. Concentração da Cafeína Extraída.....	44
5.1.3. Atividade Antioxidante .....	48
<b>5.2. Extração de polifenóis .....</b>	<b>48</b>
5.2.1. Capacidade Antioxidante.....	50
5.2.2. Quantificação dos principais polifenóis observados.....	51
<b>5.3. Caracterização das cápsulas.....</b>	<b>53</b>
5.3.1. Rendimento do equipamento .....	53
5.3.2. Morfologia das cápsulas.....	53
5.3.3. Análise Termogravimétrica.....	56
5.3.4. Espectroscopia de Infravermelho.....	57
<b>5.4. Modelagem Matemática do Sistema de Liberação das Cápsulas .....</b>	<b>59</b>
<b>5.5. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>62</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>77</b>

<b>ANEXO B.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO E.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura química da molécula de cafeína.....	24
Figura 3.1. Estrutura química dos ácidos cafeoilquínicos: ácido clorogênico e ácido cafeico, respectivamente.....	25
Figura 4.1. Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica.....	32
Figura 4.2. Nano <i>spray dryer</i> B-90 HP. ....	39
Figura 4.3. <i>Spray dryer</i> LabMat MSD 0.5.....	40
Figura 5.1. Análise em CCD das frações do extrato obtido por extração supercrítica. Cada cor apresenta um composto ou um grupo de compostos com características cromatográficas similares.....	43
Figura 5.2. Cromatograma da fração de metanol. ....	44
Figura 5.3. Superfície de resposta para o % de cafeína no extrato purificado seco: (a) temperatura <i>versus</i> tempo de extração com concentração de extrato constante (35 mg/mL); (b) temperatura <i>versus</i> concentração de extrato com tempo de extração constante (20 min); (c) concentração de extrato <i>versus</i> tempo de extração com temperatura constante (42,5° C).....	47
Figura 5.4. Superfície de resposta concentração de polifenóis totais no extrato da erva-mate descafeinada.....	50
Figura 5.5. Capacidade antioxidante obtida nos extratos aquosos da erva-mate descafeinada. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença significativa entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).....	51
Figura 5.6. Cromatograma representativo das extrações aquosas da erva-mate descafeinada no ponto otimizado (70 °C, 30 min), destacando os polifenóis quantificados. ....	52
Figura 5.7. Quantificação em CLAE dos ácidos clorogênico e cafeico.....	53
Figura 5.8. MEV das cápsulas de cafeína produzidas: Nano <i>spray dryer</i> , tamanho (a) e morfologia (b) das cápsulas; nano precipitação em etanol: morfologia (c); <i>spray dryer</i> : morfologia (d). ....	55
Figura 5.9. Distribuição do tamanho da partículas para as cápsulas de gelatina contendo cafeína, preparadas com diferentes metodologias e analisadas por espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	55

- Figura 5.10. TGA das amostras Cafeína ext. (extrato), Gelatina e Cápsulas – produzidas por *spray dryer* e nano *spray dryer* – (a); dTG das amostras Cafeína ext. (extrato), Gelatina e Cápsulas – produzidas por *spray dryer* e nano *spray dryer* – (b). ..... 57
- Figura 5.11. Espectroscopia de infravermelho comparativa entre a cafeína, a gelatina e as cápsulas. .... 58
- Figura 5.12. Dados experimentais do processo de liberação das capsulas. .... 59
- Figura 5.13. Curva gerada a partir da modelagem matemática, seguindo o modelo de primeira ordem (equação 5.4), do sistema de liberação de cafeína. .... 60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Planejamento experimental Box-Benhken para as variáveis independentes para separação e concentração da cafeína extraída por fluido supercrítico.....	33
Tabela 4.2. Planejamento experimental Fatorial Ortogonal para as variáveis independentes para extração de polifenóis das folhas de erva-mate descafeinada.....	35
Tabela 5.1. Concentração de cafeína nas frações do extrato de erva-mate obtido por extração por fluido supercrítico. ....	45
Tabela 5.2. ANOVA do modelo gerado (Equação 5.1).....	46
Tabela 5.3. Concentração de polifenóis totais* no extrato aquosa da erva-mate descafeinada.....	49
Tabela 5.4. ANOVA do modelo gerado (Equação 5.2).....	49

## LISTA DE SÍMBOLOS

ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
ATR	Acessório de Refletância Atenuada
B	Bomba
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmica
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazil
DTG	Primeira Função Derivada para a Curva TGA
EFS	Extração por Fluido Supercrítico
F-C	Folin-Ciocalteu
FSG	Fluido Gástrico Simulado
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GL	Grau de Liberdade
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
MF	Medidor de Fluxo
PdI	Índice de Polidispersão
QM	Quadrado Médio (Variância)
RE	Reservatório
SNC	Sistema Nervoso Central
SQ	Soma dos Quadrado
TC	Trocador de Calor
TGA	Análise Termogravimétrica
UV	Ultravioleta
VC	Válvula de Controle/Expansão
VE	Vaso Extrator
VS	Vaso de Separação

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Modelos de Liberação.....	30
---------------------------------------	----

## RESUMO

SGARIONI, Bruna. Processamento dos Extratos da Erva-Mate: Extração, Purificação e Encapsulamento. Porto Alegre. 2023. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

*Ilex paraguariensis* é uma importante fonte de compostos bioativos como polifenóis e metilxantinas, os quais apresentam benefícios à saúde como minimizar efeito de doenças neurológicas e aumentar o foco e a performance atlética, para metilxantinas; redução do risco de doenças cardiovasculares e tratamento da diabetes tipo 1, para polifenóis. Neste contexto, o estudo tem por objetivo desenvolver uma metodologia para purificação dos compostos contidos no extrato da erva-mate obtido por extração com fluido supercrítico e dos compostos contidos no extrato aquoso da erva-mate descafeinada. Seguiu-se com a encapsulação da cafeína extraída em gelatina e, por fim, com a avaliação e modelagem da liberação da cafeína encapsulada em meio que simulou o fluido gástrico. A caracterização da cafeína presente no extrato antes e após sua purificação foi realizada via cromatografia líquida de alta eficiência e a caracterização dos extratos aquosos obtidos da erva-mate descafeinada foi realizada pelos métodos 2,2-difenil-1-picrihincrazil, Folin-Ciocalteu e cromatografia líquida de alta eficiência. As cápsulas antes da liberação foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espalhamento de luz dinâmica e análise termogravimétrica, enquanto o fluido no qual ocorreu a liberação foi analisado por espectroscopia de ultravioleta. Entre os resultados obtidos podemos destacar a concentração de cafeína no extrato purificado que apresentou valor de, aproximadamente, 87% de pureza; as cápsulas de cafeína, obtidas em *spray dryer* e *nano spray dryer*, com morfologia esférica e tamanho de partícula na escala nanométrica; e o perfil de liberação das cápsulas cujo comportamento foi representado pelo modelo de liberação de primeira ordem.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; cafeína; polifenóis; nanocápsulas, gelatina.

## ABSTRACT

SGARIONI, Bruna. Processing of Yerba Mate Extracts: Extraction, Purification and Encapsulation. Porto Alegre. 2023. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

*Ilex paraguariensis* is an important source of bioactive compounds such as polyphenols and methylxanthines, which have health benefits such as minimizing the effect of neurological diseases and increasing focus and athletic performance, for methylxanthines; reducing the risk of cardiovascular disease and treating type 1 diabetes, for polyphenols. In this context, the study aims to develop a methodology for purifying the compounds contained in the extract of yerba mate obtained by extraction with supercritical fluid and the compounds contained in the aqueous extract of decaffeinated yerba mate. This was followed by encapsulation of the extracted caffeine in gelatin and, finally, with the evaluation and modeling of the release of encapsulated caffeine in a medium that simulated gastric fluid. The characterization of the caffeine present in the extract before and after its purification was performed via high performance liquid chromatography and the antioxidant activity of the aqueous extracts obtained from decaffeinated yerba mate were determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil, Folin-Ciocalteu methods and high performance liquid chromatography. The capsules before release were analyzed by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and thermogravimetric analysis, while the fluid in which the release occurred was analyzed by ultraviolet spectroscopy. Among the results obtained, we can highlight the concentration of caffeine in the purified extract, which presented a value of approximately 87% purity; caffeine capsules, obtained in spray dryer and nano spray dryer, with spherical morphology and particle size in the nanometric scale; and the release profile of the capsules whose behavior was modeled by the first-order release model.

Key-words: *Ilex paraguariensis*; caffeine; polyphenols; nano capsules; gelatin.

## 1. INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis*, conhecida como erva-mate, é fonte de compostos bioativos. Dentre as principais substâncias encontradas têm-se as metilxantinas, os polifenóis e as saponinas (Mateos *et al.*, 2018; Alasmari, 2020). Bebidas à base de erva-mate têm sido associadas a efeitos benéficos à saúde (Santos *et al.*, 2015), dos quais podem-se destacar a diminuição do risco de doenças degenerativas causadas pelo estresse oxidativo (Baeza *et al.*, 2016) e as atividades antioxidantes (Saraiva *et al.*, 2019).

Segundo dados do IBGE (2020), a produção de erva-mate no Brasil em 2020 foi de aproximadamente 426 t, destacando sua importância cultural e econômica como produto agroindustrial local. Embora seja consumida, tradicionalmente, como infusão de suas folhas, existe um interesse crescente no desenvolvimento de produtos à base de seus extratos, como a cafeína, além da demanda do mercado por produtos descafeinados (de Marco, Riemma e Iannone, 2018). O consumo diário de cafeína por pessoa no Brasil equivale a 115 mg, dos quais 63,1% provem do café, 24,9 % do café com leite, 3,6% de refrigerantes à base de cola e 1,9% da erva-mate (Sartori e Silva, 2016). Além destas fontes, a cafeína sintética é adicionada a refrigerantes e bebidas energéticas, a medicamentos como analgésicos, e para diabetes e a cosméticos como cremes faciais e maquiagens (Petre, 2021).

Dentre os compostos presentes no extrato da erva-mate, as metilxantinas, em especial a cafeína, são comumente associadas a efeitos negativos no organismo, contudo novos estudos propõem efeitos relevantes à saúde (Mateos *et al.*, 2018). Em dosagens baixas a moderadas (< 400 mg), reduz a fadiga, aumenta o foco e a performance atlética (Vieira *et al.*, 2017; Neves e Caldas, 2017). Além das metilxantinas, também encontramos no extrato da erva-mate compostos polifenólicos que atuam no organismo exercendo ação antioxidante (Lima *et al.*, 2018; Mateos *et al.*, 2018). Os polifenóis, obtidos a partir da infusão da erva-mate descafeinada e quantificados por meio da análise de polifenóis totais e atividade antioxidante, após

encapsulados, podem ser empregados como aditivos em alimentos, cosméticos e medicamentos (Li *et al.*, 2022); além disso, podem ser adicionados as paredes internas de embalagens, promovendo a liberação destes compostos no meio e reduzindo a deterioração de alimentos (Dai *et al.*, 2022).

Uma forma de aplicação da cafeína extraída da erva-mate é através do encapsulamento do princípio ativo. A encapsulação é um processo que consiste em um revestimento físico no qual compostos chamados de núcleo ativo são cercados por um agente encapsulante com a finalidade de aumentar a estabilidade das substâncias e controlar sua liberação no organismo (Santos *et al.*, 2017; Rossa, 2019). Com a encapsulação, substâncias suscetíveis à degradação por exposição à luz ou a variações na temperatura ficam protegidas (estáveis) e, ao controlar sua liberação é possível aumentar o tempo de atuação da substância-chave no organismo (Santos *et al.*, 2017).

Fruto do apresentado, destaca-se que este estudo tem como meta a encapsulação da cafeína extraída a partir da erva-mate. Para atender à essa meta, as etapas de extração, purificação do extrato, seleção de revestimentos, produção de cápsulas e modelagem matemática dos fenômenos de liberação constituem o foco deste estudo.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é desenvolver um procedimento para purificação da cafeína e de compostos polifenólicos presente no extrato obtido pela extração por fluido supercrítico da erva-mate e encapsulação destes em *spray dryer* e por precipitação em etanol, além de avaliar a liberação da cafeína encapsulada, em fluido gástrico simulado.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Obter os extratos da erva-mate processada a partir de extrações com fluido no estado supercrítico.
- Concentrar em cafeína o extrato de erva-mate obtido por extração com fluido supercrítico.
- Determinar a concentração de cafeína no extrato purificado por cromatografia líquida de alta eficiência
- Obter extratos da erva-mate descafeinada a partir de extrações com água (infusão).
- Determinar a atividade antioxidante por DPPH e a concentração de polifenóis total por Folin-Ciocalteu;
- Encapsular a cafeína purificada em *spray dryer*;
- Avaliar a morfologia e tamanho de partículas das cápsulas através de análises de microscopia eletrônica de varredura e espalhamento de luz dinâmica;
- Realizar experimentos e modelagem matemática da liberação da cafeína em fluido gástrico simulado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Ilex paraguariensis* A. ST.-Hill. (erva-mate) é uma planta que cresce naturalmente nos estados do Sul do Brasil, no leste do Paraguai e nas províncias argentinas de Misiones e Corrientes (Resende *et al.*, 2012; Junior e Morand, 2016; Riachi *et al.*, 2018; Mateos *et al.*, 2018). Suas folhas são tradicionalmente consumidas como infusão quente (chimarrão/mate) na Argentina, Brasil e Uruguai, ou como infusão fria (tereré) no Paraguai e no Centro-Oeste brasileiro (Silva *et al.*, 2008; Bracesco *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012). A erva-mate não é consumida *in natura*; após a colheita é necessário que suas folhas passem por um processamento composto pelas seguintes etapas: branqueamento (sapeco), secagem, moagem, envelhecimento e empacotamento (Riachi *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020).

#### 3.1. Processamento da Erva-Mate

A colheita das folhas verdes e pequenos talos pode ser realizada tanto de forma manual quanto mecânica. O material colhido é transportado para a unidade onde é processado (Franceschini, 2017; Espírito Santo, 2020). Na unidade de processamento o material segue para o branqueamento, onde a erva-mate verde é aquecida rapidamente em um cilindro rotativo a fim de inativar enzimas oxidativas e perder até 25% de umidade; neste cilindro a erva-mate permanece em média por 8 min a 400 °C (Junior e Morand, 2016).

A secagem ocorre pela exposição das folhas a uma corrente de ar quente em cilindros rotativos ou esteiras (Butiuk *et al.*, 2016; Junior e Morand, 2016). A erva-mate de consumo nacional é seca a 90-110 °C por 3 h em esteira ou a 350 °C por 30 min em cilindro rotativo (Junior e Morand, 2016). A umidade da planta após esta etapa é de 3 a 4% (Butiuk *et al.*, 2016). Após a secagem, as folhas são trituradas mecanicamente para facilitar manuseio e transporte (Riachi *et al.*, 2018).

A planta triturada é disposta em câmaras de envelhecimento, onde será conferido sabor e aroma ao produto (Butiuk *et al.*, 2016; Junior e Morand, 2016). O produto nacional não sofre envelhecimento e, portanto, permanece novo e mantém sua coloração verde (Junior e Morand, 2016). O envelhecimento do produto, nos demais países sul-americanos, pode ser feito de forma forçada (62 dias na câmara a 69 °C e 49% umidade) ou de forma natural (9-12 meses à temperatura e umidade ambientes) (Butiuk *et al.*, 2016; Junior e Morand, 2016).

A etapa final consiste no empacotamento do produto. Para isso, o material é moído e peneirado, ajustando sua granulometria às especificações regulamentadas (Santos *et al.*, 2020). A erva cancheada (mercado brasileiro) compõe-se de uma mistura de folhas (maioria) e talos; a estacionada (mercado demais países sul-americanos) compõe-se exclusivamente de folhas (Franceschini, 2017).

### 3.2. Compostos Bioativos

A obtenção de compostos bioativos a partir de matéria-prima vegetal tem sido objetivo de muitos estudos. Esses abordam a utilização de solventes como água, CO<sub>2</sub> supercrítico, solventes orgânicos (hexano, metanol, etanol) e discutem o emprego de diferentes métodos de extração (extração por fluido supercrítico, infusão, maceração, extração com líquido), avaliando a influência da técnica na obtenção dos compostos desejados (Jacques *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021; Kaltbach *et al.*, 2022; Panzl *et al.*, 2022). Em relação à planta em estudo, a composição do extrato da erva-mate é influenciada, tanto por propriedades como pelo cultivo (solo, temperatura, nutrientes), assim como pelo processamento (tempo e temperatura) da planta (Riachi *et al.*, 2018; Mateos *et al.*, 2018) e pelo método extrativo. As principais substâncias bioativas obtidas são compostos polifenólicos, saponinas e metilxantinas (Bracesco *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012; Junior e Morand, 2016; Mateos *et al.*, 2018; Riachi *et al.*, 2018). Esses compostos estão associados a benefícios à saúde. Segundo Mateos *et al.* (2018), existem 58 polifenóis no extrato da erva-mate e 3 metilxantinas.

#### 3.2.1. Metilxantinas

As metilxantinas encontradas na erva-mate são a teobromina, a cafeína, com concentrações média em erva-mate comercial em torno de 1 mg/g de massa seca e

8 mg/g de massa seca, respectivamente, e a teofilina, apresentando apenas traços em erva-mate comercial (Mateos *et al.*, 2018). A cafeína (Figura 3.1) é um fármaco cuja ingestão tem efeito estimulador ao sistema nervoso central (SNC) (Junior e Morand, 2016; Neves e Caldas, 2017). Esta substância é comumente encontrada em alimentos, bebidas e algumas plantas (Ribeiro e Sebastião, 2010; Junior e Morand, 2016; Vieira *et al.*, 2017; Neves e Caldas, 2017; Alasmari, 2020). No setor de bebidas, a cafeína é comumente utilizada em bebidas do tipo cola (refrigerantes) e energéticos (de Marco, Riemma e Iannone, 2018; Espírito Santo, 2020). Como fármaco, a cafeína, associada a outros princípios ativos, pode ser utilizada no tratamento de dores de cabeça e neuralgia e, também, como ingrediente no tratamento de celulite e gordura localizada (de Marco, Riemma e Iannone, 2018).

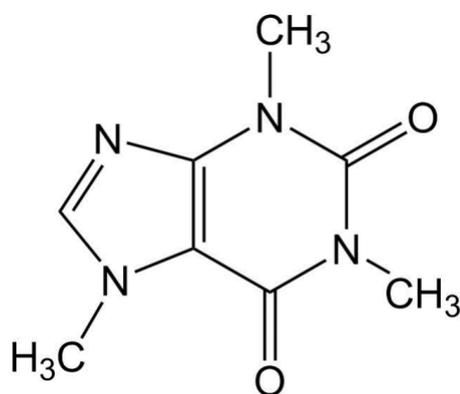


Figura 3.1. Estrutura química da molécula de cafeína.

Segundo Mateos *et al.* (2018), as metilxantinas, em especial a cafeína, são normalmente associadas a efeitos negativos no organismo, contudo novos estudos propõem efeitos relevantes à saúde. Em dosagens não tóxicas a cafeína age bloqueando receptores de adenosina A no cérebro, gerando a diminuição da liberação dessa substância (Viera *et al.*, 2017; Alasmari, 2020). No SNC, a adenosina exerce ação depressora pré e pós-sináptica, reduzindo a atividade motora, deprimindo a respiração, induzindo o sono e aliviando a ansiedade (InterPro, 2020). Por ser uma substância presente em todas as células é esperado que desequilíbrios em seu sistema levem a disfunções neurológicas (Ribeiro e Sebastião, 2010). Por outro lado, estudos sugerem que a inibição destes receptores bloqueia a ação da adenosina, isto indica que a cafeína pode minimizar sintomas de doenças neurológicas tais como Alzheimer e Parkinson (Ribeiro e Sebastião, 2010; Alasmari, 2020).

### 3.2.2. Polifenóis

A erva-mate é uma importante fonte de polifenóis (Gebara *et al.*, 2017). Os principais polifenóis encontrados são os ácidos cafeoilquínicos (Figura 3.2) (Bracesco *et al.*, 2011; Mateos *et al.*, 2018). Segundo Mateos *et al.* (2018) a concentração média destes compostos na erva-mate comercial é em torno de 80 mg/g de massa seca, evidenciando a relevância deste produto natural como fonte de polifenóis. A importância destas substâncias está ligada aos benefícios observados em diferentes estudos que relacionam o consumo dessa substância à redução do risco de doenças cardiovasculares (Junior e Morand, 2016; Gebara *et al.*, 2017), ao tratamento de diabetes 1 (Lima *et al.*, 2018) e à prevenção da senescência das células da retina (Tate *et al.*, 2020). Estes benefícios estão associados à ação antioxidante observada nesses compostos (Lima *et al.*, 2018; Mateos *et al.*, 2018).

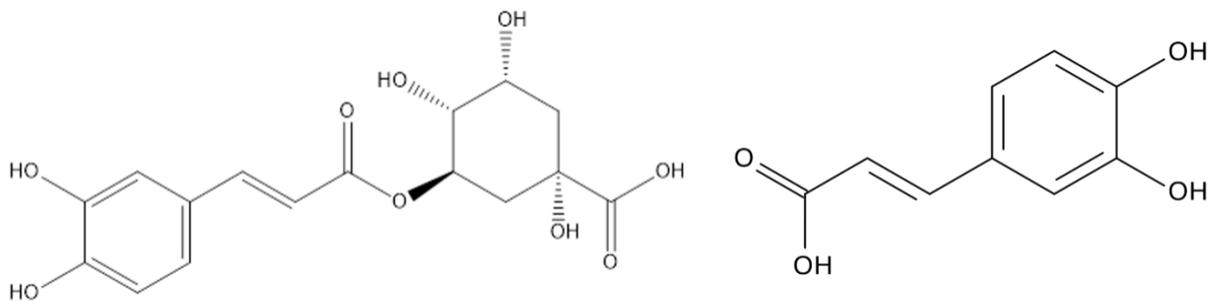


Figura 3.1. Estrutura química dos ácidos cafeoilquínicos: ácido clorogênico (esquerda) e ácido cafeico (direita).

### 3.3. Técnicas de Extração

Os extratos de erva-mate mais estudados são aqueles obtidos através de infusão aquosa, pois estes se assemelham a forma de consumo das folhas processadas (Silva *et al.*, 2008; Silveira *et al.*, 2017; Gullón *et al.*, 2018; Brito *et al.*, 2019). Entretanto, trabalhos realizados com outras técnicas sugerem vantagens para obtenção de extratos da erva-mate: maceração (Jacques *et al.*, 2006); ultrassom (Jacques *et al.*, 2007); alta pressão hidrostática (Kotovicz *et al.*, 2014); fluido supercrítico (Cassel *et al.*, 2010; Vieitez *et al.*, 2018); campo elétrico moderado (Silva *et al.*, 2018).

A fim de se obter a cafeína a partir das folhas de erva-mate é possível se basear em técnicas de descafeinização do café. Segundo Franca (2016), os métodos convencionais para o café são a descafeinização por solvente orgânico, por água e por fluido supercrítico, sendo a última já aplicada na extração da *Ilex paraguariensis* (Zapata *et al.*, 2020; Santo *et al.*, 2021). Segundo De Marco, Riemma e Iannone (2018), a extração por fluido supercrítico é o processo que apresenta a maior seletividade para remoção da cafeína em grãos de café.

### 3.3.1. Extração por Fluido Supercrítico

A extração por fluido supercrítico (EFS) consiste na solubilização de compostos de uma matriz sólida ou líquida por um fluido no estado supercrítico. Ao compará-la aos processos clássicos é possível observar que a EFS se destaca pela facilidade de separação soluto-solvente, por realizar o processo extrativo a temperaturas mais baixas e não utilizar solventes tóxicos, quando utilizado CO<sub>2</sub> (Taylor, 1996). O fluido supercrítico é qualquer fluido cuja condição de pressão e temperatura seja maior do que seu ponto crítico (Vieitez *et al.*, 2018; Taylor, 1996). Nestas condições o fluido possui alta difusividade, o que favorece a extração (Vieitez *et al.*, 2018).

O solvente mais utilizado é o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por ser um composto não inflamável, inerte, atóxico, de baixo custo, facilmente reciclável e alto poder de solvatação. Contudo este é um solvente apolar, o que dificulta a extração de compostos com polaridade elevada. Para minimizar este problema, utilizam-se cossolventes que, ao misturá-los com CO<sub>2</sub>, alteram a polaridade do sistema, possibilitando a extração de outros compostos (Taylor, 1996). Como exemplo de cossolvente tem-se a água, o etanol e o metanol (Franceschini, 2017).

Zapata *et al.* (2020) e Franca (2016) relatam a utilização de água para auxiliar no processo extrativo, justificado pela alta polaridade da cafeína. A primeira relata a utilização de água como cossolvente, a segunda utiliza a água para umedecer os grãos de café antes da extração, aumentando sua umidade a 50%. Cabe ressaltar que o primeiro trabalho retrata a descafeinização da erva-mate, enquanto o segundo estuda os grãos de café. Este fato indica similaridades nas técnicas, evidenciando que é possível basear a descafeinização da erva-mate a partir da descafeinização do café.

### 3.4. Técnicas de Análise

#### 3.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O método de análise utilizado para quantificação da cafeína presente no extrato da erva-mate é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esse método consiste no transporte dos componentes da mistura por uma fase estacionária pelo fluxo da fase móvel, sendo separados pela diferença na velocidade de migração dos componentes da fase móvel (Espírito Santo, 2020). Essa análise é realizada com solventes polares (água deionizada, acetonitrila, metanol) devido a sua afinidade com os compostos a serem identificados (Filip *et al.*, 1998; Mateos *et al.*, 2018).

#### 3.4.2. Atividade Antioxidante

O ensaio de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é aplicado com frequência na avaliação da atividade antioxidante de compostos químicos na indústria alimentícia devido à sua alta estabilidade, viabilidade experimental e baixo custo (Yeo e Shahidi, 2019). Este método consiste na junção de uma certa quantidade de compostos antioxidantes a uma solução de DPPH e avaliação da porcentagem de DPPH extinto resultante das reações DPPH-antioxidantes por espectrofotometria. As reações DPPH-antioxidantes podem ser descritas pela redução do elétron de valência desemparelhado presente no átomo de nitrogênio no DPPH após recepção de um átomo de hidrogênio de antioxidante formando a hidrazina DPPH-H; essa reação causa mudança na coloração da solução, passando de violeta a amarelo (Chen, Liang e Han, 2020; Santo *et al.*, 2021). Desta forma, pode-se avaliar a capacidade redutora dos antioxidantes através do monitoramento da redução de sua absorbância em 515-520 nm (Foti, 2015, Santo *et al.* 2021).

#### 3.4.3. Determinação de Polifenóis Totais

A determinação quantitativa de polifenóis é dificultada pela sua complexidade e diversidade, dado que sua quantificação individual é dificultada pela abundância de compostos e, por isso, não revela adequadamente sua concentração (Blainski *et al.*, 2013), com o intuito de facilitar sua quantificação utiliza-se o método Folin-Ciocalteu (F-C) (Folin e Denis, 1915). Esta é uma técnica analítica conveniente e com boa

reprodutibilidade para a determinação dos polifenóis totais em plantas (Chen *et al.*, 2015). Uma vantagem deste método é que este possui uma resposta equivalente a diferentes substâncias fenólicas, tornando-o adequado para medir, com precisão, os níveis de massa de fenólicos totais (Rover e Brown, 2013). Este método constitui na reação dos polifenóis com o reagente redox (reagente de Folin-Ciocalteu), formando um complexo azul. Este complexo pode então ser quantificado por espectrofotometria, no entanto, como o reagente se decompõe rapidamente, torna-se necessário usá-lo em excesso, o que gera um precipitado com alta turbidez, tornando a análise espectrofotométrica inviável. Para resolver este problema, Folin e Ciocalteu incluíram sais de lítio em seu reagente, prevenindo a turbidez (Blainski *et al.*, 2013).

### 3.5. Encapsulamento de Compostos Bioativos

Compostos bioativos apresentam um papel fundamental na prevenção de doenças como diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares, contudo estes compostos são sensíveis a fatores físico-químicos, por isso é necessário que sejam disponibilizados em sistemas de encapsulados (Lv *et al.*, 2021). Segundo Rossa (2019), as micro/nanocápsulas consistem no revestimento físico de partículas sólidas, líquidas ou gases por um agente encapsulante. Esse encapsulamento tem como objetivo proteger os compostos de agentes externos, tais como incidência de luz, alterações de temperatura, aumentando sua estabilidade e controlando a liberação (Santos *et al.*, 2017; Rossa, 2019). Estudos relatam diferentes metodologias para o encapsulamento do extrato da erva-mate; estas se baseiam em um revestimento com polímeros: quitosana (Harris *et al.*, 2011); policaprolactona e poli (ácido-lático-co-glicólico) (Santos *et al.*; 2017); goma-arábica e frutoglicosatosacarídeo (Pilatti-Riccio *et al.*, 2019); maltodextrina (Nunes *et al.*, 2015; Negrão-Murakami *et al.*, 2017). Dentre as principais técnicas utilizadas estão *spray drying* (Harris *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2015; Negrão-Murakami *et al.*, 2017), evaporação de solvente de emulsão dupla (Santos *et al.*; 2017) e liofilização (Pilatti-Riccio *et al.*, 2019).

#### 3.5.1. *Spray Dryer*

*Spray Drying* é um método que transforma suspensões em um pó composto por micro/nanopartículas (Negrão-Murakami *et al.*, 2017). As vantagens na utilização

desta técnica são: baixo custo, capacidade de ser um processo contínuo e a possibilidade de obter-se partículas esféricas quimicamente homogêneas de diferentes materiais (Nandiyato e Okuyama, 2011). De acordo com Rossa (2019), o funcionamento da técnica se fundamenta em três componentes – o atomizador cuja função é converter a solução em gotas, a fonte de calor que vaporiza o solvente, difunde o soluto e precipita o produto e o coletor de partículas. Estudos mencionam que ao utilizar a técnica de *spray drying*, é possível observar aumento na estabilidade dos compostos obtidos a partir de matéria-prima vegetal, quando encapsulados, em comparação com seu estado livre, além de sugerirem o controle da liberação dos compostos (Harris *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2015; Negrão-Murakami *et al.*, 2017).

### **3.6. Liberação de Compostos Bioativos Encapsulados**

A liberação de fármaco é uma propriedade importante de um sistema terapêutico, sendo um pré-requisito para a absorção do agente terapêutico e contribui para a extensão da disponibilidade ativa para o corpo (Bruschi, 2015). No trato gastrointestinal superior compostos administrados oralmente são propensos à degradação devido às duras condições ácidas contidas no estômago e das enzimas gástricas (Marzorati *et al.*, 2021; Vinarov *et al.*, 2021). Nanopartículas poliméricas contendo compostos bioativos em seu núcleo estão sendo desenvolvidas como sistema de liberação de fármacos. Estas oferecem vantagens como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, fácil fabricação, não toxicidade e capacidade de direcioná-las a órgãos ou tecidos específicos (Wang *et al.*, 2022). Dentre as opções para administração destas cápsulas tem-se priorizado a via oral devido à sua conveniência e potencial liberação controlada.

#### **3.6.1. Modelos de Liberação**

Os sistemas de liberação de fármacos são projetados para manter a concentração de um determinado composto terapêutico em um nível desejado por um longo período. Portanto, é importante controlar a taxa e a duração da liberação do fármaco (Jarosz *et al.*, 2016). É possível adquirir equações matemáticas que descrevem a dependência da liberação em função do tempo, estas tornam-se úteis na predição da cinética de liberação. A partir disso, muitos modelos têm sido usados

na projeção de sistemas e dispositivos de administração de fármacos (simples e complexos) e para predição do comportamento geral de liberação (Bruschi, 2015). Na literatura, existem muitos modelos teóricos ou empíricos como Korsmeyer-Peppas, cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem e modelo de Higuchi. Estes são ferramentas importantes para projetar formulações farmacêuticas, avaliar processos de liberação, *in vivo* e *in vitro*. A partir destes modelos tem-se a medição de parâmetros físicos importantes (coeficiente de difusão, por exemplo) e recorrem ao ajuste do modelo por dados experimentais de liberação (Bruschi, 2015). A maioria considera que os componentes encapsulados apresentam uma liberação inicial rápida seguida de uma liberação lenta (Zou *et al.*, 2015; Jarosz *et al.*, 2016). O Quadro 3.1 apresenta as equações referentes a estes modelos e uma breve descrição.

Quadro 3.1. Modelos de Liberação (Fonte: Jarosz *et al.*, 2016).

<b>Modelo</b>	<b>Equação</b>	<b>Descrição</b>
<b>Ordem Zero</b>	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt$	Taxa de liberação constante e independente do tempo.
<b>Primeira Ordem</b>	$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = kt$	Liberação de drogas solúveis em água a partir de matrizes porosas.
<b>Higuchi</b>	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^{1/2}$	Liberação de fármacos a partir de matrizes que não degradam ou expandem.
<b>Korsmeyer-Peppas</b>	$\ln \frac{M_t}{M_\infty} = n \ln t + \ln k$	Difusão, expansão e dissolução da matriz.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de erva-mate usadas para realizar os experimentos foram providenciadas pela empresa Baldo S.A. Essa matéria-prima fornecida foi processada (item 3.1) e embalada pela empresa. Estas apresentam diâmetro de partícula médio de 100  $\mu\text{m}$  e umidade relativa de 3,59 %.

### 4.1. Descafeinização da Erva-mate por Extração com Fluido Supercrítico

As extrações foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica (Figura 4.1), as condições da extração foram determinadas com base no planejamento experimental realizado por Santo *et al.* (2021). O processo inicia com a alimentação de  $\text{CO}_2$  proveniente do reservatório (RE-1), que, então, passa pelo trocador de calor (TC-1), a fim de resfriar o fluido, garantindo que o solvente esteja líquido antes de passar pela bomba (B-1) de alta pressão (Maximator® – G35), onde é pressurizado na condição da extração. O cossolvente (etanol), acondicionado no reservatório (RE-2), é pressurizado à condição da extração (300 bar), por uma bomba (B-2) de pistão (ISCO 260D). Em seguida os fluidos,  $\text{CO}_2$  e etanol se misturam e adentram o trocador de calor (TC-2) de modo a atingir a temperatura do processo (60 °C). A mistura ingressa no vaso extrator (VE-1) de 500 mL, onde se encontra com a matriz vegetal (erva-mate) e solubiliza o extrato. A mistura solvente-soluto é direcionada para uma válvula de controle/expansão (VC-1) (Hoke-Micromite® 1600) com o intuito de reduzir a pressão da mistura. Ao reduzir-se a pressão, os solventes  $\text{CO}_2$  e etanol passam para os estados gasoso e líquido, respectivamente, precipitando o extrato nos vasos de separação (VS-1 e VS-2). A válvula (VC-1) é acoplada a um sistema de aquecimento a fim de evitar o congelamento dela, uma vez que durante a expansão do solvente ocorre redução na temperatura devido ao efeito Joule-Thompson do  $\text{CO}_2$ . Ao final do processo, o  $\text{CO}_2$  gasoso passa por um medidor de fluxo (MF-1) (Siemens® Sitrans FC mass flow 6000) que mensura a vazão do solvente; a vazão de etanol é

medida pela bomba de pistão (B-2) no início do processo.

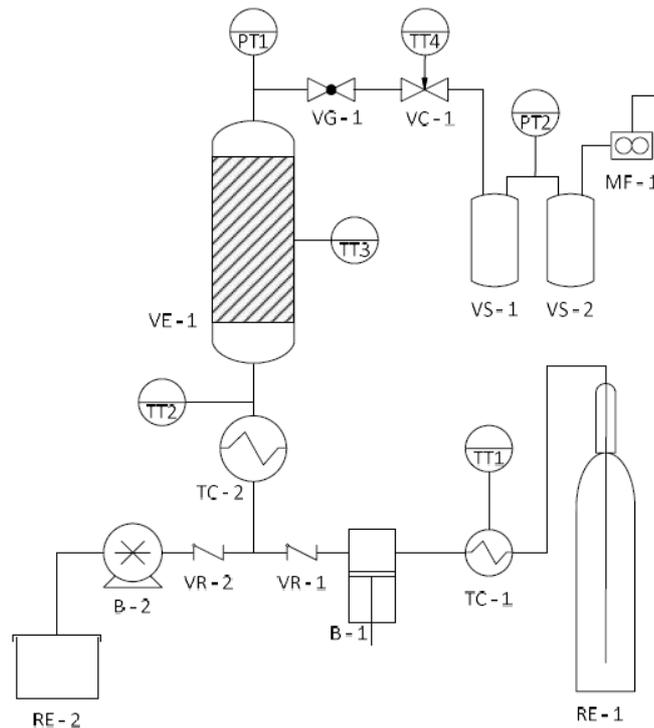


Figura 4.1. Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica.

#### 4.1.1. Fracionamento do Extrato

Para avaliar a composição do extrato obtido por extração supercrítica foi realizado um fracionamento da amostra sólida. O fracionamento foi efetuado através de uma cromatografia em coluna, partindo de uma amostra de 0,5 g solubilizada em diclorometano. Para a separação foram utilizados solventes com polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Após a separação em coluna foi realizado uma cromatografia em camada delgada (CCD) para qualificar a composição de cada fração obtida.

#### 4.1.2. Separação e Concentração da Cafeína

Franca (2016) menciona a busca do mercado por cafeína, sendo essa obtida da recuperação da cafeína extraída na descafeinização do café ou sintetizada. A ervamate pode ser uma fonte alternativa de cafeína, tal como o café. Para isso o extrato obtido na EFS precisa ser fracionado e purificado. O primeiro passo para a purificação da cafeína consiste em uma separação preliminar que inclui a remoção das ceras não

solubilizadas através do processo de filtração, seguido da remoção do cossolvente (etanol) em evaporador rotativo sob vácuo. A separação preliminar resulta em um aglomerado de ceras, clorofilas e metilxantinas. A etapa final da purificação tem como objetivo separar a cafeína dos demais compostos contidos nesse aglomerado. Para isso solubiliza-se em 100 mL de água deionizada uma fração do aglomerado (5,5 g, 3,5 g ou 1,5 g, determinado a partir das concentrações para cada ponto do planejamento descrito na Tabela 4.1). A cafeína, por apresentar solubilidade em água superior aos demais compostos, migra da fração sólida para a fração líquida desta mistura. A mistura é, por fim, filtrada separando sólidos não solúveis, e a solução aquosa é seca em evaporador rotativo. Após esse processo, obtém-se um extrato sólido, para o qual é possível determinar a concentração da cafeína por CLAE. A fim de otimizar o processo de purificação foi realizado em planejamento experimental Box-Behnken, variando a concentração, a temperatura e o tempo. Na Tabela 4.1 são apresentadas as condições experimentais planejadas.

Tabela 4.1. Planejamento experimental Box-Benhken para as variáveis independentes para separação e concentração da cafeína extraída por fluido supercrítico.

Exp.	Variáveis dependentes decodificadas			Variáveis dependentes codificadas		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)	X1	X2	X3
1	25,0	20	55	-1	0	1
2	42,5	30	15	0	1	-1
3	25,0	10	35	-1	-1	0
4	42,5	20	35	0	0	0
5	42,5	10	15	0	-1	-1
6	60,0	20	55	1	0	1
7	42,5	10	55	0	-1	1
8	60,0	30	35	1	1	0
9	60,0	10	35	1	-1	0
10	42,5	20	35	0	0	0
11	42,5	20	35	0	0	0
12	25,0	20	15	-1	0	-1
13	42,5	30	55	0	1	1
14	25,0	30	35	-1	1	0
15.	60,0	20	15	1	0	-1

Os limites adotados para os fatores avaliados foram determinados a partir de dados da literatura e da análise da metodologia aplicada para a descafeinação da

erva-mate. Para a temperatura determinou-se como limite superior a temperatura na qual a erva-mate foi submetida durante o processo de descafeinização e como limite inferior a temperatura ambiente. Para a concentração utilizou-se os limites adotados por Espirito Santo (2020) cujo planejamento fatorial  $2^2$  para esta extração apresentou resultados promissores (percentual máximo de cafeína obtido foi de 92,34%). Para o tempo da extração foi realizada uma varredura e, durante a varredura alíquotas foram coletadas em diferentes tempos a fim de determinar o momento no qual a variação da concentração do extrato é aproximadamente zero. A curva obtida (tempo x concentração de cafeína) está apresentada no Anexo A.

#### 4.1.3. Determinação da Capacidade Antioxidante

Determinou-se a capacidade antioxidante dos extratos a partir da aplicação do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (Sigma-Aldrich). Utilizou-se um espectrofotômetro (Bel photonics UV-M51) para determinação da absorbância no comprimento de onda de 515 nm com tempo de reação de 2 h e 2,9 mL da solução DPPH para 0,1 mL de extrato, seguindo metodologia descrita por Espirito Santo (2020). A solução DPPH possui concentração inicial de 60  $\mu$ M e para cada amostra foram preparadas três concentrações de extrato para reagir com a solução. Dessa forma possibilitou-se a determinação do  $EC_{50}$  (quantidade de extrato necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH).

#### 4.1.4. Análise da Cafeína por CLAE

A análise foi conduzida em cromatógrafo da Agilent Technologies Série 1200 com coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm). A metodologia adotada foi adaptada de Filip *et al.* (1998). A fase móvel consiste em dois solventes com vazão de 1 mL/min: o solvente A é composto por água e ácido acético (98:2), e o solvente B, metanol e ácido acético (98:2). O fluxo inicia em 17% de B e aumentará, constantemente, para 20% em 10 min, sendo mantido constante por 2 min. O fluxo de B aumenta a 100% nos próximos 5 min, e é mantido constante por mais 5 min. O comprimento de onda do detector é ajustado em 270 nm. A fim de quantificar as amostras foi realizada uma curva de calibração, utilizando o padrão de cafeína fornecido pela Sigma-Aldrich. Para obtê-la prepararam amostras com massa conhecida de padrão de cafeína e concentração variando entre 0,04 – 1,00 mg/mL.

Essas foram injetadas no cromatógrafo, seguindo o mesmo método apresentado acima. A partir das áreas obtidas em cada concentração estabeleceu-se uma relação linear entre a área dos picos e a concentração da cafeína. Esta relação pode ser utilizada para áreas variando de 1000 – 27000 u.a. A relação obtida pode ser observada na Equação 4.1,

$$y = 4 \times 10^{-5}x + 0,0252 \quad (4.1)$$

onde x é a área do pico do composto analisado, obtida pelo cromatograma e y é a concentração de cafeína equivalente. O gráfico representativo desta relação esta apresentado no Anexo B.

#### 4.2. Extração de Polifenóis a Partir da Erva-Mate Descafeinada

A extração foi realizada a partir da infusão aquosa de 10 g de erva-mate descafeinada em 100 mL de água milli-q. Para otimizar o processo extrativo foi realizado um planejamento fatorial ortogonal, tendo como variáveis a temperatura e o tempo de extração. A Tabela 4.2 apresenta os experimentos definidos a partir do planejamento fatorial.

Tabela 4.2. Planejamento experimental Fatorial Ortogonal para as variáveis independentes para extração de polifenóis das folhas de erva-mate descafeinada.

Exp.	Variáveis dependentes decodificadas		Variáveis dependentes codificadas	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	X1	X2
1	74,4	81	-1	1
2	95,6	81	1	1
3	95,6	39	1	-1
4	85,0	60	0	0
5	85,0	60	0	0
6	74,4	39	-1	-1
7	85,0	60	0	0
8	100,0	60	$\sqrt{2}$	0
9	85,0	30	0	$-\sqrt{2}$
10	85,0	90	0	$\sqrt{2}$
11	70,0	60	$-\sqrt{2}$	0

Os limites adotados para os fatores avaliados foram determinados a partir de dados da literatura. Para a temperatura determinou-se como limite superior a

temperatura de ebulição do solvente utilizado (água) e para o limite inferior a temperatura ideal para o consumo do chimarrão. Para o tempo da extração foi realizada uma varredura e, durante a varredura alíquotas foram coletadas em diferentes tempos a fim de determinar o momento no qual a variação da concentração do extrato é aproximadamente zero. A curva para varredura (Anexo C, tempo x concentração) foi construída usando as concentrações de ácido clorogênico e ácido cafeico contidos no extrato.

#### 4.2.1. Qualificação e Quantificação de Polifenóis por CLAE

A análise foi conduzida um cromatógrafo da Agilent Technologies Série 1200 com uma coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm). A metodologia adotada baseia-se em Anesini *et al.* (2012). A fase móvel consiste em dois solventes com vazão de 1 mL/min: o solvente A é composto por água e ácido acético (98:2), e o solvente B, metanol e ácido acético (98:2). O fluxo inicia em 15% de B e aumenta, constantemente, para 40% em 30 min, em seguida o fluxo de B aumenta para 75% nos próximos 10 min, e, por fim, passa para 85% em 5 min. O comprimento de onda do detector foi ajustado em 325 nm. Essa metodologia foi utilizada tanto para a determinação do perfil cromatográfico, quanto para a quantificação do ácido clorogênico (Sigma-Aldrich) e do ácido cafeico (Sigma-Aldrich), a partir da construção de curvas de calibração com os padrões. As curvas de calibração do ácido clorogênico e do ácido cafeico estão descritas nas equações 4.2 e 4.3, respectivamente; o gráfico referente a estas curvas encontra-se no Anexo D.

$$y = 7 \times 10^{-5}x - 0,3859 \quad (4.2)$$

$$y = 3 \times 10^{-5}x - 0,0216 \quad (4.3)$$

onde x é a área do pico do composto analisado, obtida pelo cromatograma e y é a concentração deste composto equivalente.

#### 4.2.2. Quantificação dos Polifenóis pelo Método Folin-Ciocalteu

A determinação dos polifenóis totais contidos no extrato obtido a partir da erva-

mate descafeinada foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu (F-C) adaptado de Singleton e Rossi (1965). Para isso, pesou-se aproximadamente 17 mg da amostra de extrato, que, por sua vez, foi solubilizada em 10 mL de etanol 99,5 %. Em seguida a mistura foi acondicionada em balão volumétrico a 100 mL com água deionizada. Para o ensaio coletou-se uma alíquota de 400 µL da solução, transferindo-a para um tubo de ensaio. Neste tubo, adicionou-se 600 µL de etanol 10 %, 1 mL do reagente de F-C (Sigma-Aldrich), agitando em vórtex, 1 mL de solução carbonato de sódio 17 %, e 7 mL de água deionizada, agitando, novamente, em vórtex. Por fim, os tubos foram armazenados em ambiente escuro por 90 min.

Após o tempo de reação, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro, onde leu-se a absorbância, em triplicata, no comprimento de onda de 725 nm. Para quantificação das amostras realizou-se uma curva de calibração com padrão de polifenol ácido gálico (Sigma-Aldrich).

#### 4.2.3. Atividade Antioxidante

Para avaliar a capacidade antioxidante do processo de extração de polifenóis foram coletadas alíquotas dos experimentos realizados no planejamento descrito no item 4.2. Tal método foi realizado com 10 g de erva-mate descafeinada e 100 mL de água milli-q (100 mg de erva-mate/mL). As amostras coletadas foram filtradas e diluídas a 0,25 mg de erva-mate/mL. A capacidade antioxidante foi determinada pela metodologia DPPH (item 4.1.3.) e foi calculada usando a Equação 4.4 como um percentual da concentração inicial (60 µM).

$$DPPH (\%) = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (4.4)$$

Os experimentos foram realizados em triplicata e um teste F foi realizado para detectar diferenças significativas entre os valores das diferentes amostras. Além disso, calculou-se as médias e desvios padrões, sendo considerado significativamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

### 4.3. Encapsulamento da Cafeína

#### 4.3.1. Nano *Spray Dryer*

O processo de encapsulamento foi realizado por meio de uma adaptação das metodologias de Negrão-Murakami *et al.* (2017) e Tan, Zhong e Langrish (2020). Essas metodologias utilizam como agente encapsulante maltodextrina e clara de ovo, respectivamente. A maltodextrina é um biopolímero que apresentou bons resultados na estabilização dos componentes encapsulados, justificando a utilização de biopolímeros, tais como a gelatina (utilizada neste trabalho), para encapsulamento de compostos ativos.

O agente encapsulante, gelatina bovina (Gelnex®), foi combinado com a cafeína extraída (10%  $m_{\text{cafeína}}/m_{\text{total}}$ ) em meio aquoso; a proporção de cafeína foi definida com base na literatura não excedendo o limite do equipamento. A homogeneização foi realizada em agitador magnético com aquecimento a 35 °C por 1 h. Alimentou-se a solução resultante no *nano spray dryer* (Büchi B-90 HP - Büchi, Suíça), Figura 4.2. As condições do equipamento foram ajustadas com base no solvente utilizado (água). Definiu-se a temperatura de entrada do ar de secagem como 107 °C; a temperatura de saída do ar é consequência do processo. A vazão de alimentação da solução foi determinada com base em análise visual do *spray* liberado, sendo selecionada em 33% da capacidade da bomba. Definiu-se a vazão do ar utilizada com base nas especificações de operação do equipamento, 97 L/min. A frequência de vibração do nebulizador foi escolhida com o intuito de gerar partículas nanométricas, sendo assim a frequência empregada foi de 110 kHz. As partículas produzidas e coletadas no equipamento foram armazenadas para análise posterior.



Figura 4.2. Nano *spray dryer* B-90 HP.

O rendimento do encapsulamento das partículas (%) foi determinado pela razão da massa de pó obtida ( $m_f$ ) em relação à massa de sólidos da solução ( $m_0$ ), a Equação 4.5 demonstra a relação.

$$R (\%) = \frac{m_f}{m_0} \times 100 \quad (4.5)$$

#### 4.3.2. *Spray Dryer*

O processo descrito no item 4.3.1 foi escalonado a um *spray dryer* (LabMaq MSD 0.5 - Figura 4.3). Para isso utilizou-se a mesma solução descrita em 4.3.1, contudo, para este equipamento, utilizou-se uma diluição menor, visto que o equipamento é capaz de processar soluções mais viscosas. O equipamento de *spray dryer* foi operado com os seguintes parâmetros: fluxo de ar na câmara de secagem em co-corrente, bico do atomizador de duplo fluido de 0,7 mm, vazão de alimentação de 0,2 L/h, fluxo do ar de secagem 0,97 m<sup>3</sup>/min, temperatura de entrada do ar de 105 °C, temperatura de saída do ar de 90 °C e vazão de ar de atomização de 40 L/h (pressão manométrica de 5 bar). O rendimento do equipamento foi calculado pela equação 4.5.



Figura 4.3. *Spray dryer* LabMat MSD 0.5.

#### 4.3.3. Nano Precipitação em Etanol

O processo de nano precipitação foi realizado a partir da adaptação da metodologia descrita por Silva (2020). Para este método utilizou-se o mesmo agente encapsulante, descrito no item 4.3.1. Neste procedimento, prepararam duas soluções: a solução A, fase inorgânica, é composta de água deionizada e Tween 80 (Synth) 0,16 % (g tween/g água) e a solução B, fase orgânica é composta por Etanol p.a. (Supelco) e Span® 60 (Merk) 0,16% (g span/mL acetona). As cápsulas foram preparadas a partir da solubilização de 1 g de gelatina bovina e 10% ( $\frac{g_{\text{cafeína}}}{g_{\text{gelatina}}}$ ) de cafeína em 30 mL da solução A, a mistura permaneceu sob agitação por 1 h a 45 °C, até homogeneização da mistura. Por fim, 5 mL da mistura foram gotejados em 10 mL da solução B em vórtex para a formação das cápsulas.

#### 4.4. Caracterização das Cápsulas

As cápsulas geradas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), espalhamento de luz dinâmica (DLS), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA). As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no equipamento (FEI® Inspect F50). Para geração das imagens as

partículas foram aplicadas sobre uma fita de carbono e metalizadas por 80 s, utilizando o equipamento de *gold sputtering*. O microscópio está instalado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálises da PUCRS. A determinação do diâmetro hidrodinâmico foi realizada no equipamento ZetaSizer® Nanoseries ZEN3600 (Malven, Inglaterra), onde as amostras foram diluídas em etanol a concentração de 0,1 mg/mL. As análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foram realizadas no equipamento (PerkinElmer, FT-IR Spectrometer Spesctrum 3), usando o acessório de refletância total atenuada (ATR). As amostras foram adicionadas diretamente ao acessório e analisadas no alcance de 4000 – 650  $\text{cm}^{-1}$ , o espectro foi medido em transmitância (%). As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando o equipamento TA instruments modelo STD-650. Amostras de 5 - 10 mg foram aquecidas de 30 °C a 400 °C com uma rampa de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio. A partir da plotagem dos gráficos de perda de massa *versus* temperatura obteve-se as diferentes fases de degradação.

#### 4.5. Ensaio de Liberação dos Compostos Bioativos

Os ensaios de liberação controlada dos compostos bioativos foram realizados a partir da adaptação da metodologia descrita por Tan, Zhong e Langrish (2020). Foram imersas 0,2 g das cápsulas produzidas em 20 mL de fluido gástrico simulado (FGS) por um período a ser determinado a partir de uma varredura - coleta e análise de amostras até que a variação na concentração da alíquota seja aproximadamente zero. Os compostos liberados foram quantificados por espectroscopia de UV-Vis na banda de absorvância de 275 nm. O FGS foi preparado seguindo a metodologia descrita por Hibbins *et al.* (2017). 0,2 g de NaCl foram dissolvidas em 100 mL de água deionizada juntamente com 0,32 g de pepsina de mucosa gástrica suína (Merk) e 0,7 mL de HCl p.a. 37% (Química Moderna); o pH da solução foi mantido em 1,2.

Os ensaios de liberação foram realizados em Banho Dubnoff SL-157, com controle de agitação e temperatura. As cápsulas imersas na solução de FGS foram mantidas a 50 rpm e 37 °C. Para quantificação em espectrofotômetro foi realizada uma curva de calibração a partir da leitura da absorvância do padrão de cafeína nas concentrações de 0,001 – 0,01 g/mL. A curva se encontra descrita na equação 4.6 e pode ser observada no Anexo C.

$$y = 7,4958x - 0,9916 \quad (4.6)$$

onde  $x$  é a absorvância analisada, e  $y$  é a concentração de cafeína equivalente.

#### 4.5.1. Modelagem Matemática do Sistema de Liberação

Partindo dos ensaios descritos no item 4.5, e dos modelos apresentados o item 3.6.1 gerou-se os modelos que descrevem o sistema. Para obtenção das constantes utilizou-se o métodos dos mínimos quadrados onde o objetivo ( $f_{obj}$ ) é minimizar a soma da diferença entre a massa de cafeína obtida ( $M_{exp}$ ) nos ensaios e a massa calculada ( $M_{calc}$ ) pelo modelo (Equação 4.7).

$$f_{obj} = \sum (M_{exp} - M_{calc})^2 \quad (4.7)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Extração por Fluido Supercrítico

#### 5.1.1. Fracionamento do Extrato e CCD

O extrato obtido por extração supercrítica foi fracionado e analisado por cromatografia em camada delgada (CCD). A Figura 5.1 apresenta as frações analisadas que foram observadas na luz ultravioleta (UV).



Figura 5.1. Análise em CCD das frações do extrato obtido por extração supercrítica. Cada cor apresenta um composto ou um grupo de compostos com características cromatográficas similares.

A partir da análise qualitativa do CCD (fase móvel: diclorometano) é possível determinar a fração que contém o grupo de compostos de interesse (compostos fenólicos e metilxantinas), sendo essa a fração obtida com metanol, solvente de maior polaridade. A fração foi, então, injetada em CLAE, seguindo o método descrito no item 4.1.4. A Figura 5.2 apresenta o cromatograma obtido, destacando o pico do composto majoritário.

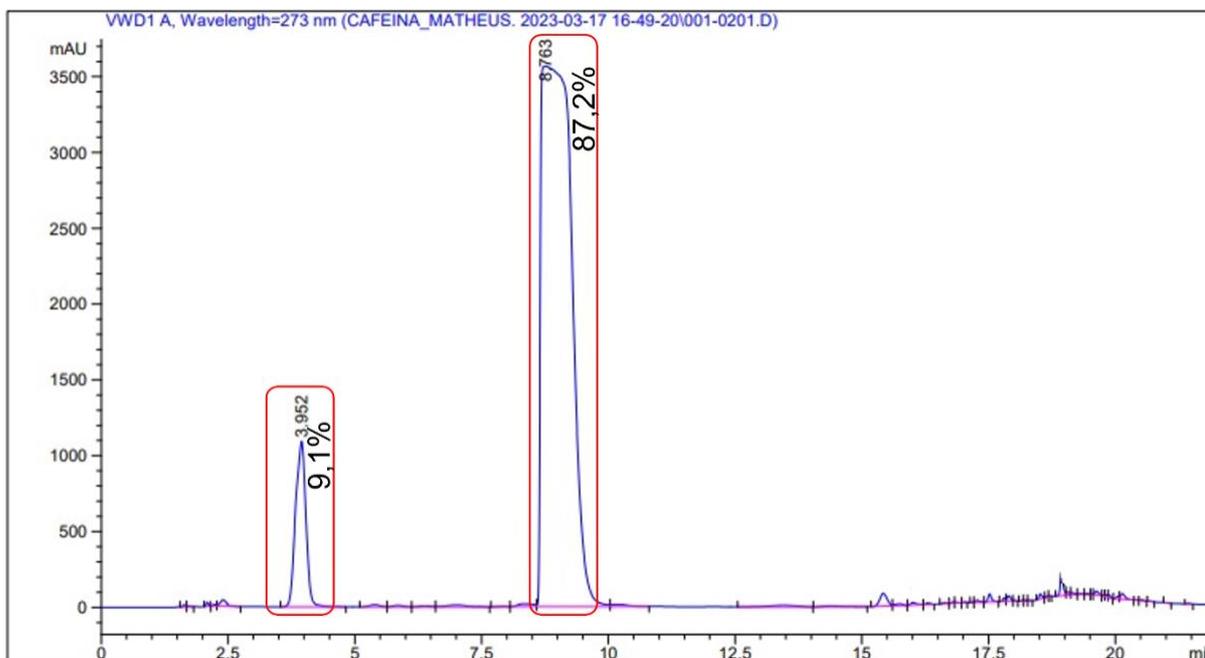


Figura 5.2. Cromatograma da fração de metanol.

Os picos destacados na Figura 5.2 correspondem aos picos da teobromina, com percentual em área equivalente a 9,1%, e da cafeína, com percentual em área equivalente a 87,2%. A partir do resultado obtido podemos indicar que a composição majoritária da fração são metilxantinas obtendo um percentual em área equivalente a 97,3%, sendo a cafeína o composto majoritário da fração. Além disso pode-se destacar que o extrato não reagiu ao reagente DPPH, ou seja, o extrato coletado não apresentou capacidade antioxidante, isso se justifica, principalmente, pelo fato da atividade observada na erva-mate ser atribuída aos polifenóis, que são os compostos majoritários da planta, e não estão contidos no extrato após o processo de descafeinização.

### 5.1.2. Concentração da Cafeína Extraída

Os resultados para a concentração da cafeína obtidos com o extrato proveniente da EFS seco, 10 mL de água milli-q e variáveis independentes: tempo (10, 20 e 30 min), temperatura (25,0; 42,5 e 60,0° C) e concentração (15, 35 e 55 mg<sub>extrato</sub>/mL<sub>solução</sub>), estão apresentados na Tabela 5.1.

As variáveis independentes contribuem para avaliar a quantidade de cafeína na fase aquosa. Comparando os experimentos 12 e 6, maior e menor concentração de cafeína, respectivamente, pode-se observar um aumento de 1,6 vezes.

A equação polinomial de segunda ordem (Equação 5.1), para as variáveis independentes, foi ajustada a partir dos resultados da concentração de cafeína (Tabela 5.1), usando o software Minitab®. As superfícies de resposta são apresentadas na Figura 5.3.

Tabela 5.1. Concentração de cafeína nas frações do extrato de erva-mate obtido por extração por fluido supercrítico.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração (mg <sub>extrato</sub> /mL <sub>solução</sub> )	% Cafeína (mg <sub>cafeína</sub> /mg <sub>extrato</sub> )
1	25,0	20	55	67,84
2	42,5	30	15	63,15
3	25,0	10	35	60,00
4	42,5	20	35	61,37
5	42,5	10	15	69,27
6	60,0	20	55	55,27
7	42,5	10	55	65,63
8	60,0	30	35	58,15
9	60,0	10	35	62,00
10	42,5	20	35	58,79
11	42,5	20	35	65,77
12	25,0	20	15	86,65
13	42,5	30	55	58,10
14	25,0	30	35	77,67
15	60,0	20	15	72,92

$$\begin{aligned}
 y = & 90,2 - 9,9 \times 10^{-1}X_1 + 2,2X_2 - 1,0X_3 + 1,49 \times 10^{-2}X_1^2 \\
 & - 2,08 \times 10^{-2}X_2^2 + 1,04 \times 10^{-2}X_3^2 - 3,07 \times 10^{-2}X_1X_2 \quad (5.1) \\
 & + 8,2 \times 10^{-4}X_1X_3 - 1,8 \times 10^{-3}X_2X_3
 \end{aligned}$$

onde  $y$  é a concentração de cafeína (mg<sub>cafeína</sub>/mg<sub>extrato seco concentrado</sub>),  $X_1$  é temperatura,  $X_2$  é tempo e  $X_3$  é concentração. Os fatores e interações que influenciam a concentração de cafeína foram ajustados a partir de regressões polinomiais, usando a metodologia de superfície de resposta. Os coeficientes ajustados pelas variáveis codificadas (Equação 5.1) foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA) para significância individual com nível de confiança de 90%, a Tabela 5.2 apresenta os resultados obtidos.

Como observado pela Tabela 5.2, apenas o coeficiente linear equivalente a

temperatura da extração apresentou significância com o nível de confiança avaliado (90%;  $p < 0,1$ ). Os demais coeficientes lineares, de interação e quadráticos, apresentaram valor- $p > 0,1$ , ou seja, dentro do intervalo de confiança avaliado não apresentam significância.

Tabela 5.2. ANOVA do modelo gerado (Equação 5.1).

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Modelo</b>	9	768,607	85,401	0,249
<b>Linear</b>	3	317,638	105,879	0,189
<b>Temperatura</b>	1	269,67	269,67	0,058
<b>Tempo</b>	1	0,959	0,959	0,889
<b>Concentração</b>	1	25,709	25,709	0,484
<b>Quadrado</b>	3	157,129	52,376	0,411
<b>Temperatura<sup>2</sup></b>	1	76,625	76,625	0,249
<b>Tempo<sup>2</sup></b>	1	15,944	15,944	0,578
<b>Concentração<sup>2</sup></b>	1	63,249	63,249	0,289
<b>Interação</b>	3	116,492	38,831	0,518
<b>Temperatura*Tempo</b>	1	115,661	115,661	0,17
<b>Temperatura*Concentração</b>	1	0,332	0,332	0,935
<b>Tempo*Concentração</b>	1	0,499	0,499	0,92
<b>Erro</b>	5	225,23	45,046	
<b>Falta de Ajuste</b>	3	200,306	66,769	0,161
<b>Erro puro</b>	2	24,924	12,462	
<b>Total</b>	14	993,837		

GL – grau de liberdade; SQ – Soma dos Quadrados; QM – Quadrado Médio (variância)

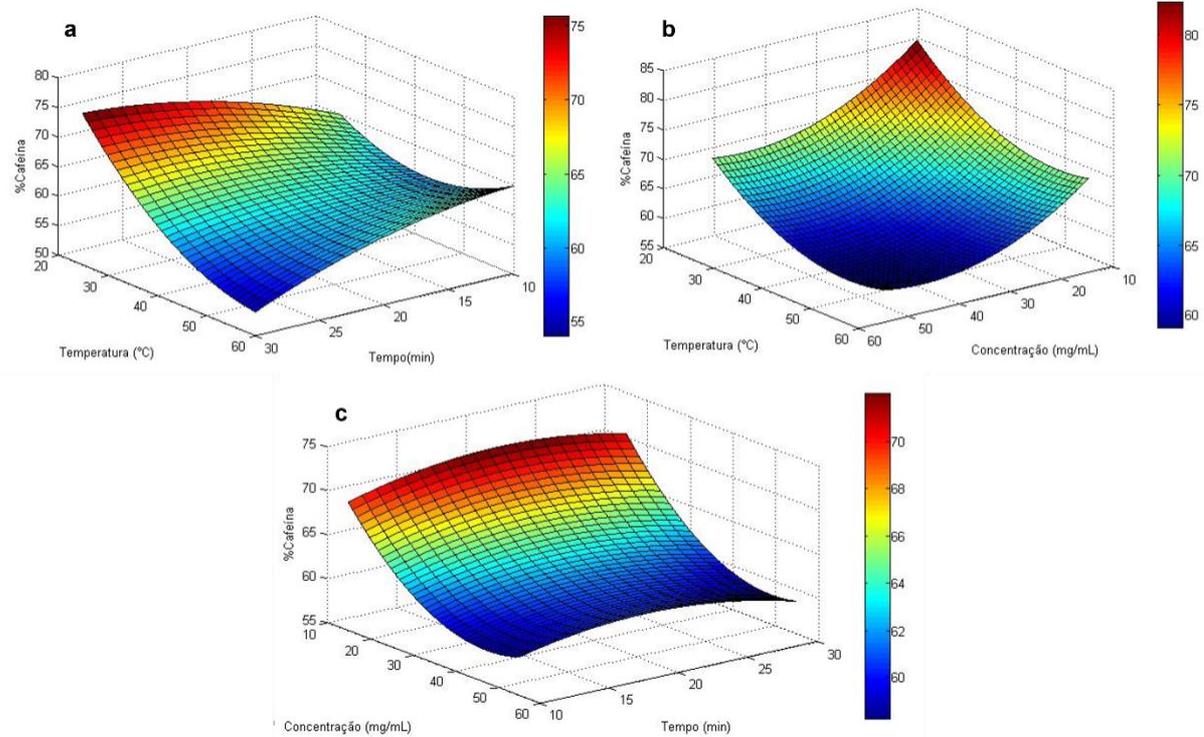


Figura 5.3. Superfície de resposta para o % de cafeína no extrato purificado seco: (a) temperatura *versus* tempo de extração com concentração de extrato constante (35 mg/mL); (b) temperatura *versus* concentração de extrato com tempo de extração constante (20 min); (c) concentração de extrato *versus* tempo de extração com temperatura constante (42,5° C).

É possível avaliar a influência das variáveis temperatura e tempo de extração no percentual de cafeína extraída na Figura 5.3a. Nela observamos que o acréscimo da variável tempo e o decréscimo da variável temperatura resulta no aumento do percentual de cafeína extraída. Além disso, podemos observar que a elevadas temperaturas o tempo deixa de interferir no percentual de cafeína obtida.

O percentual de cafeína obtida como função da temperatura e da concentração de extrato na solução, mantendo o tempo de extração constante, pode ser avaliada na Figura 5.3b. Observa-se que a concentração do extrato na solução não exerce grande influência na quantidade de cafeína obtida, visto que em uma mesma temperatura o percentual de cafeína permanece, aproximadamente, constante com o aumento da concentração de extrato na solução. Por outro lado, o decréscimo da temperatura resulta no acréscimo da quantidade de cafeína extraída.

Por fim, pode-se avaliar a interferência da concentração de extrato na solução e do tempo de extração, à temperatura constante, na Figura 5.3c. Analisando a superfície verificamos que o aumento do tempo e decréscimo da concentração de

extrato na solução geram um produto cujo percentual de cafeína é maior.

O software Minitab® foi usado para resolver a Equação 5.1, maximizando o percentual de cafeína. As variáveis independentes calculadas foram 25° C para temperatura, 30 min para o tempo de extração e 15 mg/mL para concentração de extrato na solução. Pode-se atribuir estas condições a existência de outros compostos no extrato supercrítico além da cafeína, por isso ao aumentar-se a temperatura/concentração facilita-se a extração destes compostos reduzindo a concentração de cafeína, por consequência, prejudicando sua purificação.

### 5.1.3. Atividade Antioxidante

Ao fim da EFS coletou-se uma alíquota do extrato para realização dos ensaios da atividade antioxidante. Como determinado por Espirito Santo (2020), a EFS é seletiva para cafeína, sendo assim, a erva-mate mantém sua composição polifenólica e capacidade antioxidante, dado que os polifenóis, por serem os compostos majoritários na planta, são os principais responsáveis pela atividade observada. O extrato obtido, por sua vez, não apresentou atividade antioxidante, durante as análises realizadas este não foi capaz de reagir com a solução DPPH, a reação foi acompanhada pelo período de 2 h, e não foi observado alteração na coloração do reagente DPPH. Esse resultado está de acordo com a literatura, considerando que Santo *et al.* (2021) e Brun (2012) observaram comportamento similar ao observado.

## 5.2. Extração de polifenóis

Os resultados das extrações aquosas de compostos polifenólicos realizadas com 10 g de erva-mate descafeinada e 100 mL de água milli-q nas seguintes condições: tempo (30, 39, 60, 81 e 90 min) e temperatura (70,0; 74,4; 85,0; 95,6 e 100,0° C) são apresentados na Tabela 5.3.

Comparando os experimentos 11 e 3, onde encontramos a maior e a menor concentração de polifenóis, respectivamente, pode-se observar um aumento de 2,3 vezes. A equação polinomial de primeira ordem (Equação 5.2), para as variáveis independentes, foi ajustada a partir dos resultados da concentração de polifenóis totais (Tabela 5.3) em equivalente de ácido gálico, usando o software Minitab®. O coeficiente linear com valor superior foi o coeficiente da temperatura da extração (6,55 X 10<sup>-2</sup>). A superfície de resposta é apresentada na Figura 5.4

Tabela 5.3. Concentração de polifenóis totais\* no extrato aquosa da erva-mate descafeinada.

Ensaio	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Polifenóis Tot. % (m/m)
1	81	74,4	1,829
2	81	95,6	1,602
3	39	95,6	0,852
4	60	85,0	1,375
5	60	85,0	1,193
6	39	74,4	1,647
7	60	85,0	1,034
8	60	100,0	1,057
9	30	85,0	1,011
10	90	85,0	1,397
11	60	70,0	1,965

\*equivalentes de ácido gálico

$$y = 6,4 - 4,55 \times 10^{-2}X_1 - 6,55 \times 10^{-2}X_2 + 6,38 \times 10^{-4}X_1X_2 \quad (5.2)$$

onde  $y$  é a concentração de polifenóis totais no extrato ( $m_{\text{polifenóis}}/m_{\text{extrato}}$ ),  $X_1$  é temperatura e  $X_2$  é tempo. Os fatores e interações que influenciam a concentração de polifenóis totais foram ajustados a partir de regressões polinomiais usando a metodologia de superfície de resposta. Os coeficientes ajustados pelas variáveis codificadas (Equação 5.2) foram analisados através de uma análise de variância (ANOVA) para significância individual com nível de confiança de 95%, a Tabela 5.4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5.4. ANOVA do modelo gerado (Equação 5.2).

	GL	SQ	QM	Valor-p
<b>Modelo</b>	3	1,01781	0,33927	0,014
<b>Linear</b>	2	0,93721	0,4686	0,008
<b>Temperatura</b>	1	0,66518	0,66518	0,044
<b>Tempo</b>	1	0,27203	0,27203	0,006
<b>Interação</b>	1	0,0806	0,0806	0,223
<b>Temperatura*Tempo</b>	1	0,0806	0,0806	0,223
<b>Erro</b>	7	0,31632	0,04519	
<b>Falta de Ajuste</b>	5	0,2582	0,05164	0,398
<b>Erro puro</b>	2	0,05811	0,02906	
<b>Total</b>	10	1,33412		

GL – grau de liberdade; SQ – Soma dos Quadrados; QM – Quadrado Médio (variância)

Como pode ser observado pela Tabela 5.4, os coeficientes que apresentaram significância individual com o nível de confiança de 95% foram  $\beta_1$  ( $-4,55 \cdot 10^{-2}$ ) e  $\beta_2$  ( $-6,55 \cdot 10^{-2}$ ) – equação . O coeficiente de interação entre os fatores não apresentou significância para o nível de confiança avaliado.

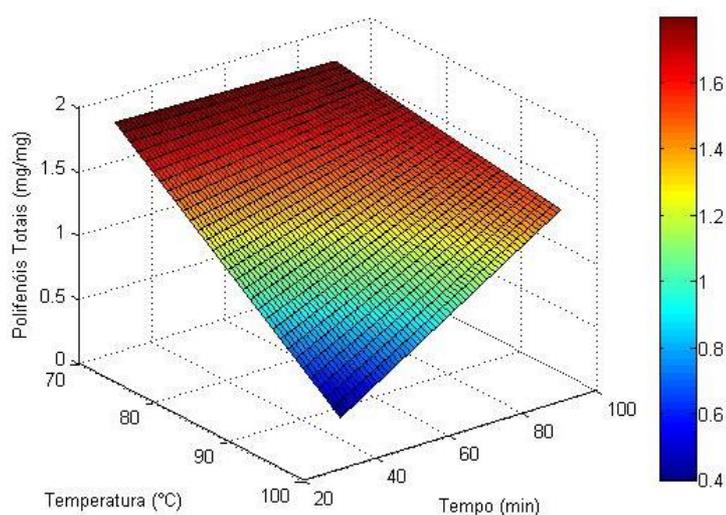


Figura 5.4. Superfície de resposta concentração de polifenóis totais no extrato da erva-mate descafeinada.

É possível avaliar a influência da temperatura e do tempo da extração na Figura 5.4. Aumentando a temperatura de extração podemos observar que a concentração de polifenóis diminui, enquanto ao aumentar o tempo de extração observamos um aumento na sua concentração.

O software Minitab® foi usado para resolver a Equação 5.2 e maximizar a concentração dos polifenóis totais. As variáveis independentes calculadas foram 70 °C para temperatura e 30 min para o tempo, estas encontram-se fora do plano experimental fatorial  $2^2$ , contudo aparecem no plano ortogonal.

### 5.2.1. Capacidade Antioxidante

Os resultados das análises da capacidade antioxidante, utilizando o extrato aquoso obtido a partir da erva-mate descafeinada, estão apresentados na Figura 5.5. Os extratos avaliados foram diluídos para evitar reação instantânea com o reagente DPPH. Como esperado, o ensaio 11 (Tabela 5.3), cujos polifenóis totais (em

equivalente de ácido gálico) apresentaram o maior valor, obteve a maior capacidade antioxidante. Os valores obtidos nos ensaios condizem com o esperado para a diluição apresentada, tendo em vista que Espírito Santo (2020) observou capacidade antioxidante em, aproximadamente, 40% para a concentração de 0,25 mg de erva-mate/mL.

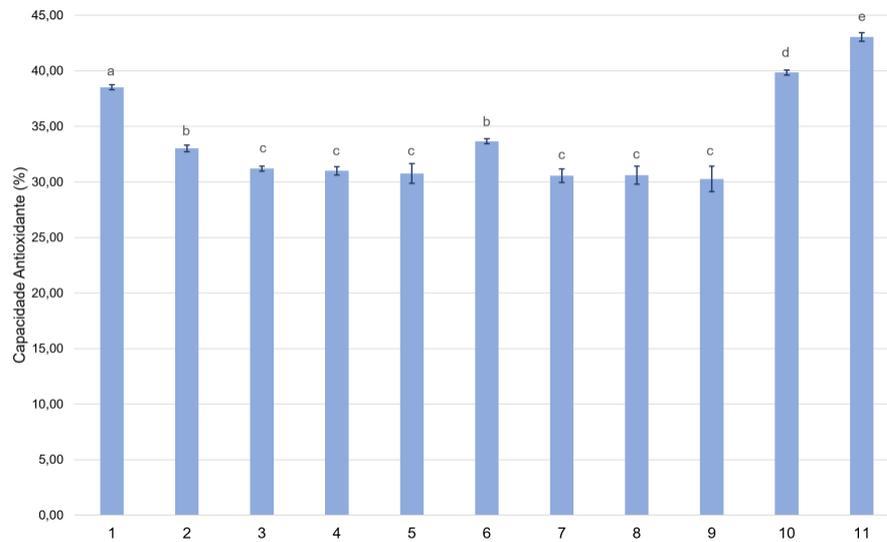


Figura 5.5. Capacidade antioxidante obtida nos extratos aquosos da erva-mate descafeinada. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferença significativa entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.2. Quantificação dos principais polifenóis observados

O cromatograma obtido por CLAE representativo da extração aquosa da erva-mate descafeinada (item 4.2) no ponto otimizado (70 °C e 30 min) consta na Figura 5.6. Nele podemos observar os picos mais significativos.

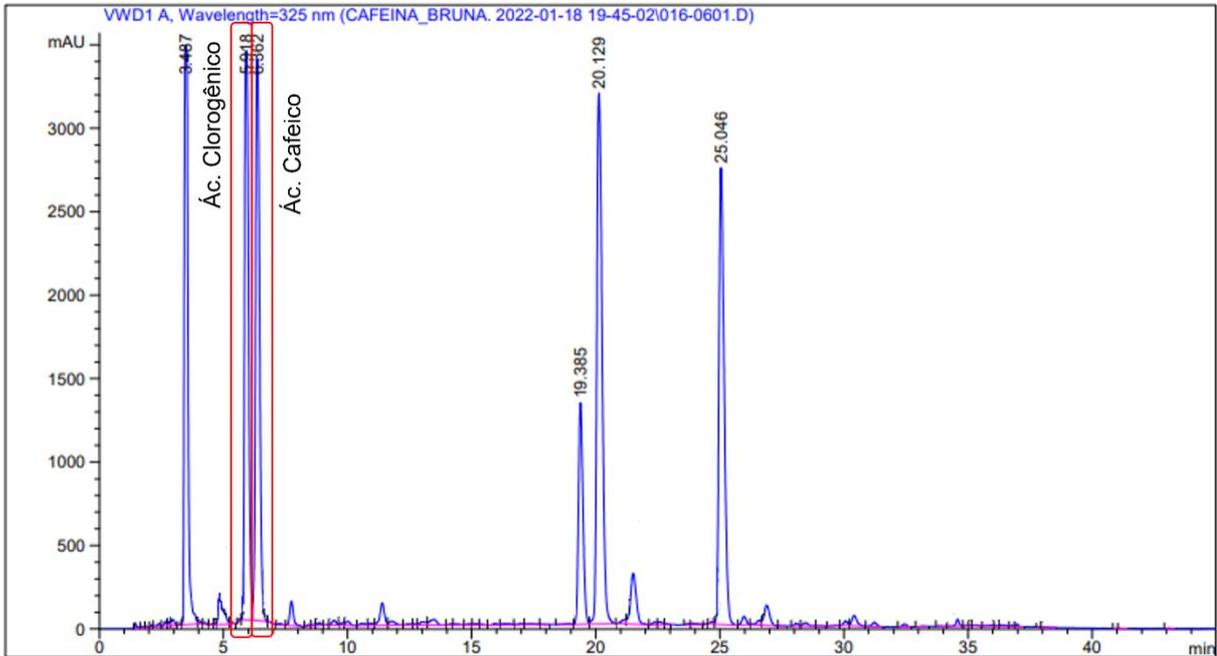


Figura 5.6. Cromatograma representativo das extrações aquosas da erva-mate descafeinada no ponto otimizado (70 °C, 30 min), destacando os polifenóis quantificados.

A Figura 5.7 apresenta os resultados da quantificação por CLAE, dos ensaios apresentados na tabela 5.3, dos compostos destacados na Figura 5.6, ácido clorogênico e ácido cafeico, respectivamente. A partir da quantificação destes compostos podemos observar que a concentração destes não apresentou grandes variações nos diferentes ensaios. É possível observar que a concentração de ácido clorogênico obtida foi em torno de 23 mg/mL e a de ácido cafeico foi em torno de 11 mg/mL.

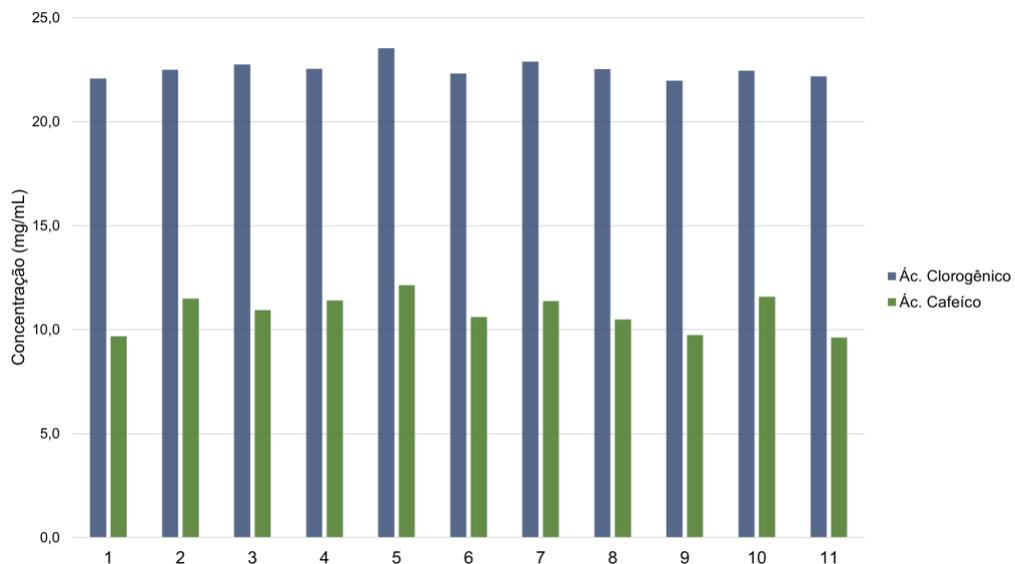


Figura 5.7. Quantificação em CLAE dos ácidos clorogênico e cafeico.

### 5.3. Caracterização das cápsulas

#### 5.3.1. Rendimento do equipamento

A cafeína purificada foi encapsulada em gelatina, seguindo duas metodologias: *spray dryer* e *nano spray dryer*. Os rendimentos apresentados para o encapsulamento da cafeína foram de 41,09% e 38,75% (massa coletada/massa alimentada - equação 4.5), respectivamente. Segundo Bezerra et al. (2021) este desempenho pode ser afetado por fatores tanto externos (umidade, temperatura) quanto internos (viscosidade, transição vítrea). Líquidos de alta viscosidade requerem elevada pressão de pulverização, pois sua viscosidade afeta a formação do jato de pulverização resultando em partículas irregulares (Tonon, 2009). Ademais, elevadas temperaturas no ar de secagem, para remoção da umidade, provocam alteração na concentração da emulsão, resultando um aumento abrupto da viscosidade e alterações na densidade que afetam o desempenho da secagem. Isso se deve à temperatura de transição vítrea e à geração de cargas eletrostáticas, logo o material seco torna-se um material pegajoso que adere às paredes (Bezerra et al., 2021).

#### 5.3.2. Morfologia das cápsulas

A figura 5.8 apresenta os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) das cápsulas produzidas. Nas Figuras 5.8a e 5.8b, observam-se as cápsulas preparadas por *nano spray dryer*. Bagheri et al. (2014) sugere que o principal parâmetro que define a morfologia das partículas é o equipamento e que seu núcleo não exerce influência na forma. Através da avaliação das imagens observam-se partículas esféricas com tamanhos entre 100 nm e 1 µm. Além disso, nota-se o enrugamento de algumas destas esferas. Tan, Zhong e Langrish (2020) relataram a influência da temperatura do ar de secagem na morfologia da partícula, apontando que em temperaturas entre 60 °C e 80 °C as partículas obtidas se assemelhavam a esferas, e em temperaturas mais elevadas, devido ao aumento do índice de evaporação, as partículas enrugam. É possível observar este efeito na Figura 5.8d, como o controle da temperatura do *spray dryer* é realizado pela saída de ar a temperatura no interior da câmara ficou acima de 80 °C, resultando em partículas,

majoritariamente, enrugadas; diferentemente do nano *spray dryer* cuja variação de temperatura no interior da câmara foi de, aproximadamente, 63 °C, e como observado na Figura 5.8b apresentou partículas, majoritariamente, esféricas. Negrão-Murakami *et al.* (2017) também observaram partículas deformadas, contudo estes atribuem a deformação à lenta formação do filme durante o processo de atomização. Pang, Yusoff e Gimbun (2014) observaram que o tipo e a concentração do agente encapsulante influencia na morfologia das cápsulas. Em concentrações mais baixas, o biopolímero aumenta a flexibilidade inicial do filme, o que permite a expansão de gases no interior das partículas durante a secagem. Contudo, quando atingem a máxima expansão, as partículas colapsam, aumentando sua rugosidade e diminuindo sua fluidez. Ao aumentar a concentração do biopolímero, as partículas passam a apresentar morfologias mais esféricas. Isso ocorre devido ao aumento da viscosidade da solução, o que limita a elasticidade das gotas durante a secagem.

As microscopias das cápsulas preparadas por nano precipitação em etanol estão apresentadas na Figura 5.8c. O processo de precipitação gerou partículas escamosas aglomeradas além de apresentar a formação de fibras na superfície dos aglomerados. A presença de aglomerados escamosos também foi observada por Malviya *et al.* (2022), que justifica sua formação ao solvente empregado no processo, neste caso ao etanol. A formação de fibras na superfície pode ser atribuída à utilização do agitador vórtex durante o processo de gotejamento da fase inorgânica.

Além disso, pode-se observar, por meio da magnitude empregada na Figura 5.8c, que as partículas obtidas por esta metodologia apresentaram distribuição de tamanho superior ao observado nas partículas obtidas pelo nano *spray dryer* (Figura 5.8b). Isso é comprovado pela análise por espalhamento de luz dinâmica (Figura 5.9). As amostras preparadas em nano *spray dryer* apresentaram distribuição entre 615 – 1106 nm, com pico em 832 nm e índice de polidispersão (Pdl) de 0,540; enquanto as partículas preparadas por nano precipitação em etanol apresentaram distribuição entre 956 – 1718 nm, com pico em 1270 nm e Pdl de 0,960; por fim, as partículas preparadas pelo *spray dryer* apresentaram distribuição entre 342 – 955 nm, com pico em 568 nm e Pdl de 0,682.

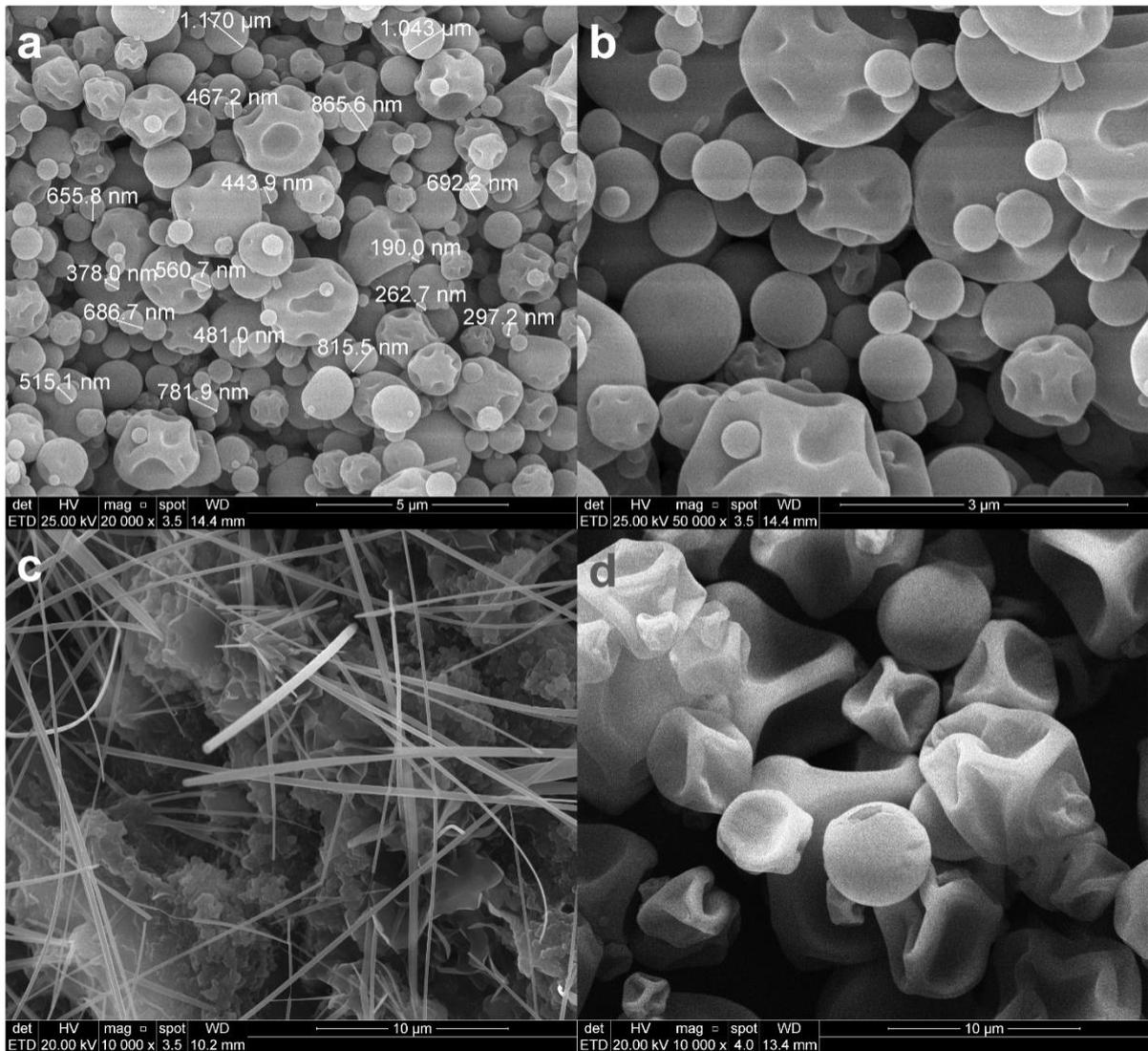


Figura 5.8. MEV das cápsulas de cafeína produzidas: Nano *spray dryer*, tamanho (a) e morfologia (b) das cápsulas; nano precipitação em etanol: morfologia (c); *spray dryer*: morfologia (d).

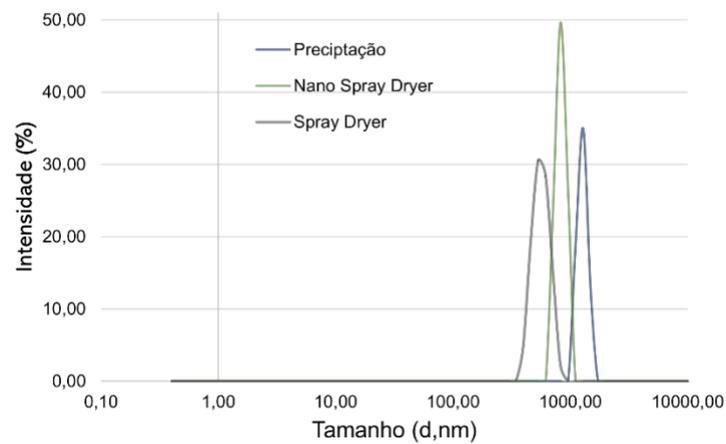


Figura 5.9. Distribuição do tamanho da partículas para as cápsulas de gelatina contendo cafeína,

preparadas com diferentes metodologias e analisadas por espalhamento de luz dinâmica (DLS).

### 5.3.3. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para avaliar a estabilidade térmica das cápsulas de cafeína (Figura 5.10a), enquanto a temperatura de decomposição térmica foi determinada a partir da derivada primeira da função gerada pela curva TGA (dTG) (Figura 5.10b).

Como pode ser observado na Figura 5.10a a degradação das cápsulas ocorreu em três estágios. O primeiro estágio está associado a perda de água/compostos voláteis por evaporação e ocorreu no intervalo de temperatura de 30 °C a 120 °C, sendo a perda observada de 6,5% para as partículas produzidas em nano *spray dryer* e perda de 4,5 % para o *spray dryer*. O segundo estágio refere-se à degradação estrutural de cadeias moleculares no sistema e ocorreu em duas fases; esse comportamento pode ser atribuído à presença de compostos com diferentes estruturas como observado por Gullón *et al.* (2018). Nesse estágio observou-se uma perda de massa equivalente a 14% para as cápsulas produzidas por nano *spray dryer* e 15% para as cápsulas produzidas em *spray dryer*, a faixa de temperatura observada referente a esta degradação foi de 140 °C a 250 °C. Por fim o terceiro estágio indica a degradação de macromoléculas e ocorreu no intervalo de temperatura de 280 °C a 380 °C, sendo a perda de massa observada equivalente a 37% nas cápsulas produzidas em nano *spray dryer*, e naquelas produzidas em *spray dryer* observou-se perda de 40%. Além disso, podemos observar que a degradação da cafeína extraída antes da encapsulação ocorre em um único estágio na faixa de temperatura de 150° C a 270° C. Monteagudo-Olivan *et al.* (2019) e Kim *et al.* (2019) também observaram que a decomposição térmica da cafeína encapsulada ocorre em três etapas e obtiveram percentuais de perda de massa similares aos encontrados em cada etapa, finalizando a degradação com perda de massa equivalente a 70%.

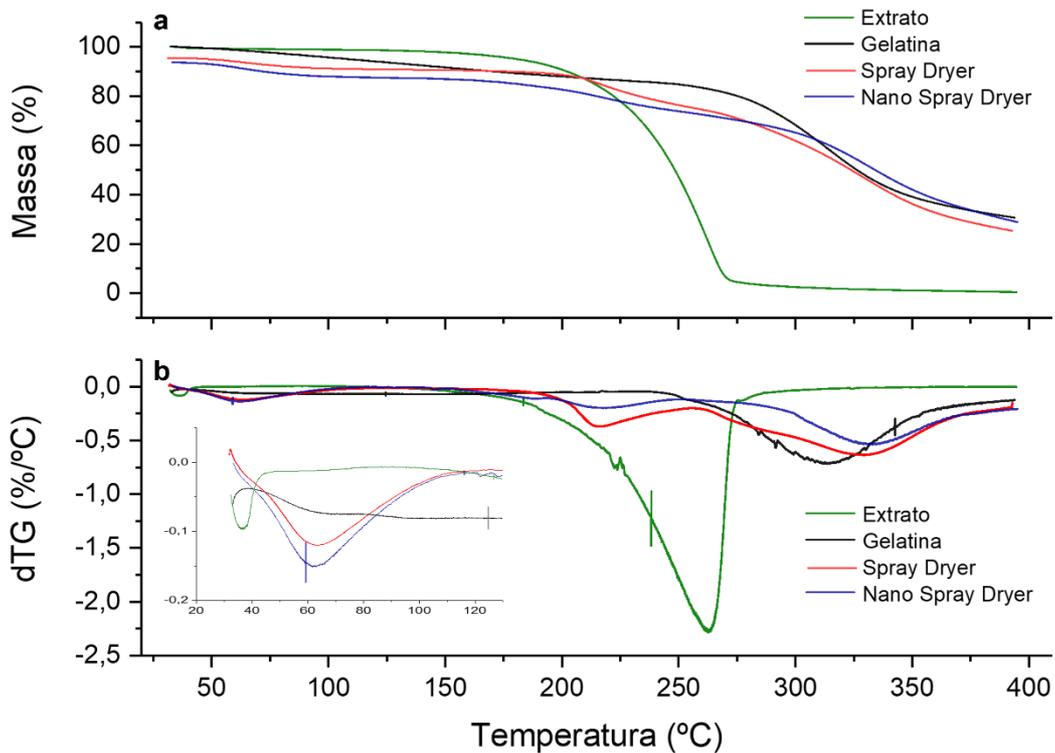


Figura 5.10. TGA das amostras Cafeína ext. (extrato), Gelatina e Cápsulas – produzidas por *spray dryer* e *nano spray dryer* – (a); dTG das amostras Cafeína ext. (extrato), Gelatina e Cápsulas – produzidas por *spray dryer* e *nano spray dryer* – (b).

Ao encapsular o extrato tem-se a proteção térmica dos compostos dado que a gelatina apresenta intervalo de temperatura de decomposição térmica superior ao observado para cafeína, além disso comparando as curvas das cápsulas produzidas nos diferentes equipamentos (*spray dryer* e *nano spray dryer*) notam-se similaridades no comportamento térmico.

#### 5.3.4. Espectroscopia de Infravermelho

O espectro da cafeína concentrada, da gelatina pura e das cápsulas de gelatina com cafeína estão apresentados na Figura 5.11.

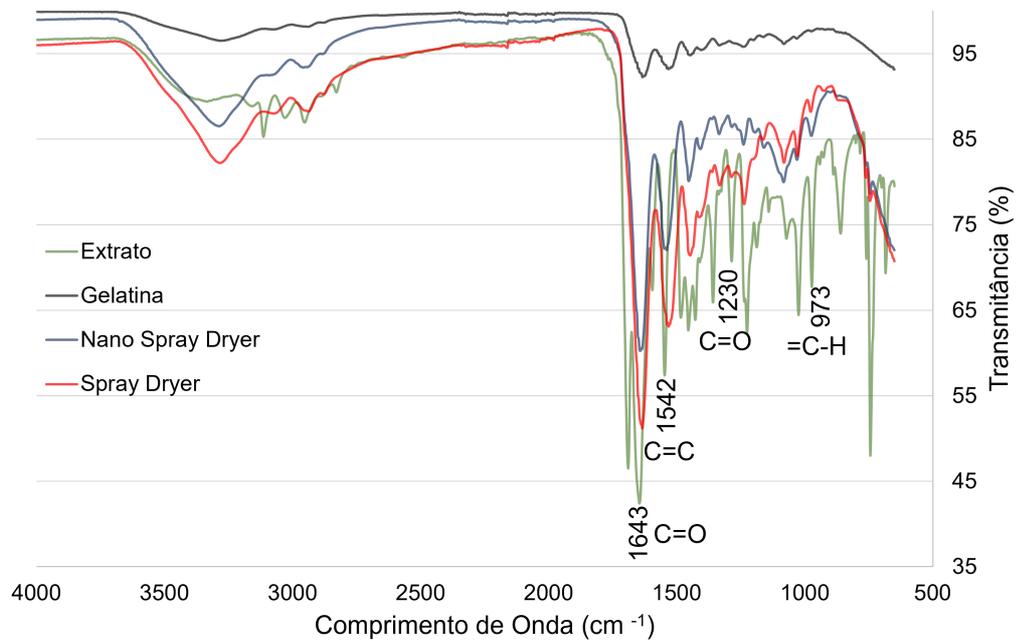


Figura 5.11. Espectroscopia de infravermelho comparativa entre a cafeína, a gelatina e as cápsulas.

A vibração da banda em  $1643\text{ cm}^{-1}$  descreve o estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  em uma amida, em  $1542\text{ cm}^{-1}$  descreve o estiramento da ligação  $\text{C}=\text{C}$  no anel, a banda em  $1230\text{ cm}^{-1}$  representa o dobramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$ , e a banda em  $973\text{ cm}^{-1}$  especifica o dobramento de plano da ligação  $=\text{C}-\text{H}$ . Essas bandas estão presentes no espectro da cafeína e reduzidas no espectro das cápsulas, uma vez que esses grupos funcionais fazem parte da estrutura da cafeína. No entanto, sua presença no espectro das cápsulas sugere que existe cafeína na superfície da partícula e sua redução sugere que a concentração da cafeína presente na superfície é reduzida, ou seja, a cafeína se encontra distribuída ao longo do raio da partícula. Além disso é possível comparar os espectros das cápsulas obtidas pelo *spray dryer* e pelo *nano spray dryer*, nesta comparação é possível observar que ambos os espectros apresentam as mesmas bandas, contudo, aquelas observadas no espectro das cápsulas obtidas pelo *spray dryer* apresentaram maior intensidade, o que sugere que o *nano spray dryer* apresentou uma encapsulação mais eficiente. Comportamento similar foi observado por Vargas *et al.* (2021), neste trabalho foram encapsulados com alginato o extrato da erva-mate, durante as análises realizadas algumas bandas características do extrato surgiram de forma reduzida no espectro das cápsulas sugerindo a distribuição do extrato na superfície da partícula.

#### 5.4. Modelagem Matemática do Sistema de Liberação das Cápsulas

O modelo cinético de primeira ordem é utilizado na descrição de sistemas de absorção e/ou liberação de agentes terapêuticos. Este modelo é capaz de prever o comportamento de sistemas com agentes solúveis incorporados em matrizes porosas (Bruschi, 2015). A equação 5.3 apresenta o modelo descrito.

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = kt \quad (5.3)$$

onde,  $M_t$  é a massa liberada no tempo,  $M_\infty$  é a massa quando o tempo tende ao infinito,  $k$  é a constante de primeira ordem e  $t$  é o tempo.

A partir dos dados experimentais, Figura 5.12, gerou-se a constante de primeira ordem para o sistema. Na equação 5.4 tem-se o modelo gerado.

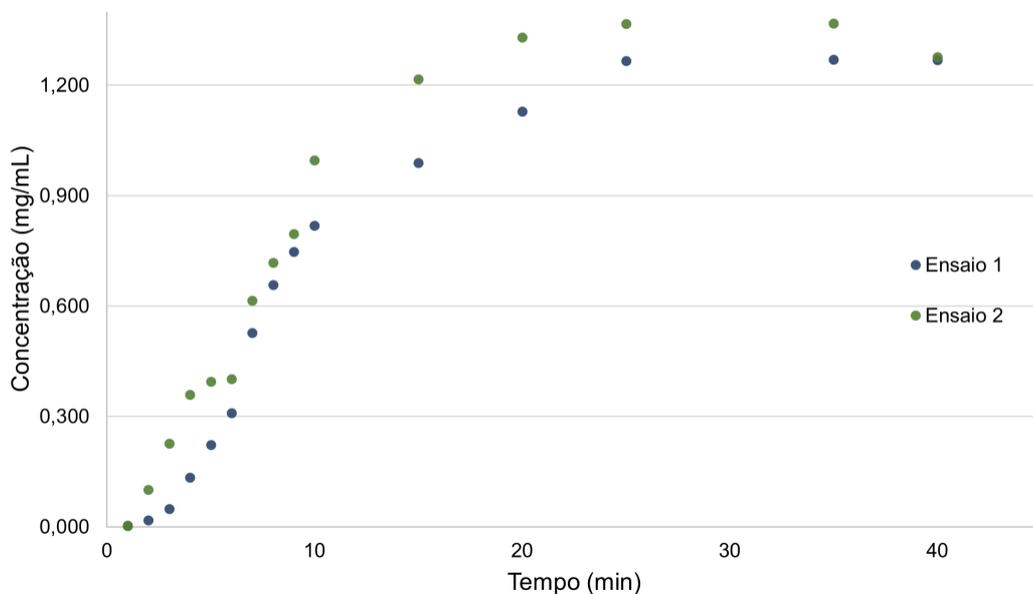


Figura 5.12. Dados experimentais do processo de liberação das cápsulas.

$$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = -0,0879t \quad (5.4)$$

Observando o comportamento experimental (Figura 5.12) nota-se que a liberação apresenta um perfil rápido, chegando à liberação de 90% da cafeína em 20

min. Após este período o perfil de liberação torna-se mais lento, com uma taxa de liberação constante. Além do modelo de primeira ordem (Equação 5.4 -  $R^2$  igual a 0,9739), foram gerados perfis a partir do modelo de Higuchi, Korsmeyer-Peppas e ordem zero (Quadro 3.1), contudo estes não apresentaram adesão aos dados obtidos experimentalmente, além disso, apresentaram  $R^2$  igual a 0,8155; 0,8394 e 0,6540; respectivamente. Os quatro modelos podem ser observados e comparados na Figura 5.13. A partir da figura nota-se que a concentração, tanto no modelo Korsmeyer-Peppas, quanto no modelo Higuchi apresentou uma liberação mais lenta no início do processo, e a tendência observada é o aumento contínuo desta, diferente do que se observa nos dados experimentais, comprovando a não aderência destes modelos ao sistema de liberação. Já o modelo de ordem zero, além de não obter um coeficiente de determinação satisfatório, não foi capaz de representar os dados experimentais, visto que este apresentou uma liberação lenta com taxa constante.

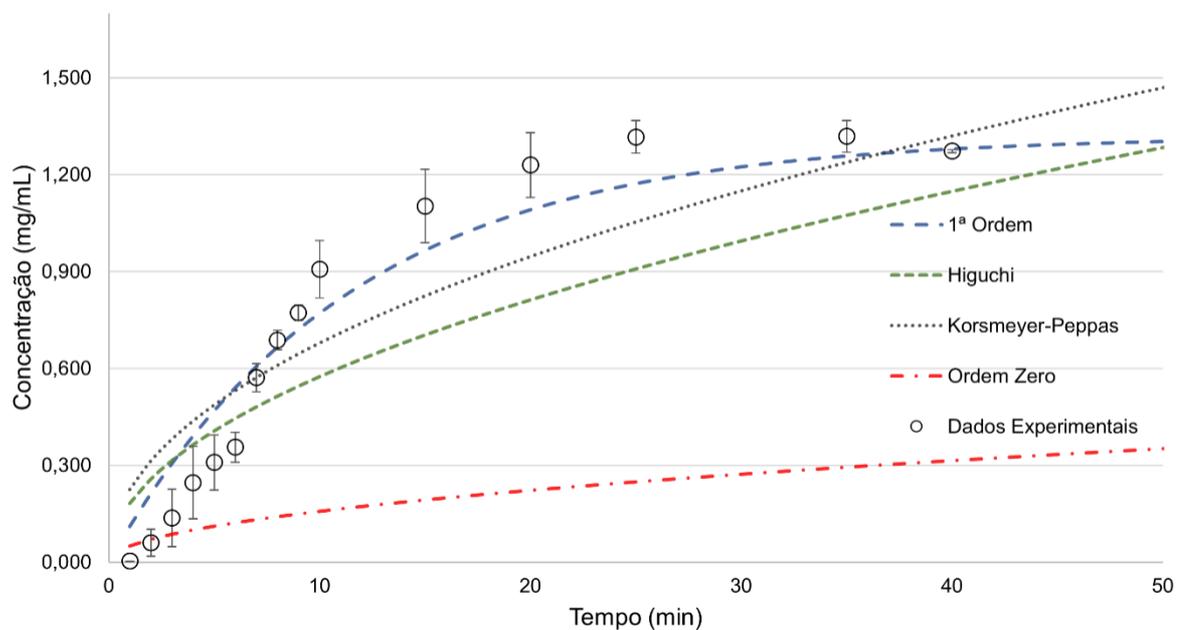


Figura 5.13. Curvas geradas a partir da modelagem do sistema de liberação de cafeína.

## 5.5. Discussão

A partir da extração da erva-mate por fluido supercrítico foi obtido um extrato que não foi capaz de reagir ao reagente DPPH. Esse extrato foi purificado através de

extrações aquosas, obtendo-se cafeína purificada com o percentual de cafeína em relação à massa de extrato seco purificado equivalente a 86,65%. Para este extrato concentrado propôs-se três metodologias de encapsulação da cafeína em gelatina.

A primeira metodologia proposta foi a utilização de um nano spray dryer. Neste método, obtiveram-se cápsulas esféricas em escala nanométrica, como pode ser observado pelas imagens de MEV (Figura 5.8b) e pelo diâmetro hidráulico (832 nm). O rendimento observado obtido por esta metodologia foi de 38,75%, assim como foi observado um incremento na estabilidade térmica do extrato após sua encapsulação (Figura 5.10). A segunda metodologia proposta foi a utilização de um *spray dryer*. A partir do uso dessa tecnologia foram obtidas cápsulas enrugadas cujo tamanho varia entre micro (Figura 5.8d) e nano partículas (Figura 5.9). Isso pode ser atribuído à instabilidade da solução (decantação de partículas na cubeta) preparada para a análise DLS e a incapacidade do equipamento de medir com precisão partículas na escala micrométrica. Além disso, também foi observado rendimento de 41,09% e incremento da estabilidade térmica, assim como foi observado para as partículas produzidas em nano *spray dryer*. Comparativamente, o rendimento e desempenho térmico observado entre as partículas produzidas nos dois equipamentos foi similar. A terceira metodologia proposta foi a precipitação em etanol. A partir da aplicação desse método foram produzidos aglomerados escamosos com fibras na superfície (Figura 5.8c). O diâmetro hidráulico das partícula foi de 1270 nm, o maior dentre os obtidos pelas três metodologias empregadas.

Para a avaliação do perfil de liberação das cápsulas utilizaram-se as partículas preparadas no *spray dryer*. Foi observado percentual de liberação de 90% após 20 min. A partir dos ensaios de liberação, modelou-se o perfil empregando o modelo de primeira ordem. Para esta modelagem obteve-se  $R^2$  de 0,9739.

Ademais, a partir da erva-mate descafeinada/extraída por fluido supercrítico extraiu-se em meio aquoso polifenóis, estes foram quantificados por F-C, obtendo-se um valor máximo (em equivalente de ácido gálico) de 1,965%. Também foi avaliada a capacidade antioxidante deste extratos, obtendo-se valor máximo equivalente a 43%. e foi quantificado por CLAE os ácidos clorogênico e cafeico, obtendo como resultado 23 mg/mL e 11 mg/ml, respectivamente.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, desenvolveu-se um procedimento para a purificação da cafeína extraída por fluido supercrítico, obtendo um extrato com concentração de 86,7% de cafeína. A partir deste extrato de cafeína, propôs-se a metodologia para encapsulação em *spray dryer* e *nanospray* obtendo-se cápsulas na escala nanométrica, 568 nm e 832 nm, respectivamente, e com morfologia esférica, além da metodologia de precipitação em etanol que gerou aglomerados escamosos na escala micrométrica, 1272 nm. A encapsulação tem como objetivo promover a proteção física e térmica da cafeína, essa proteção pode ser comprovada por meios das análises térmicas onde observou-se aumento da estabilidade do extrato após encapsulação. Considerando dados da literatura foi possível observar que a produção de cápsulas de gelatina com cafeína, extraída da erva-mate, é uma nova proposta, visto que os estudos avaliados não empregam a utilização de gelatina como agente encapsulante.

Ademais, foi extraído e avaliado qualitativamente e quantitativamente o extrato da erva-mate descafeinada, nesta metodologia obteve-se extratos com elevada composição fenólica (ácido clorogênico 23 mg/mL e ácido cafeico 11 mg/mL). Também foi constatado por meio da análise de DPPH do extrato supercrítico que a metodologia aplicada para descafeinização da erva-mate não extrai composto fenólicos, sendo seletiva para metilxantinas, como descrito na literatura.

As cápsulas produzidas por *spray dryer* foram submetidas a ensaios de liberação em fluido gástrico simulados, pelo período de 3 h. Os resultados destes ensaios foram modelados matematicamente, obtendo um perfil de liberação de primeira ordem ( $R^2$  igual a 0,9739).

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

As atividades propostas e trabalhos futuros a serem desenvolvidos estão apresentados abaixo:

1. Avaliar a utilização de outros tipos de polímeros (alginato e quitosana) como agente encapsulante e outras concentrações de cafeína (5% e 15%) na encapsulação de cafeína.
2. Propor uma metodologia para reincorporação do extrato supercrítico na erva-mate descafeinada após a purificação/remoção da cafeína.
3. Produção de cápsulas de polifenóis extraídos da erva-mate descafeinada, através do revestimento das mesmas com gelatina, visando a proteção destes compostos e sua liberação controlada.
4. Modelar matematicamente o processo de liberação das cápsulas de polifenóis.

## REFERÊNCIAS

ALASMARI, F. Caffeine induces neurobehavioral effects through modulating neurotransmitters. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 4, p. 445-451, abr 2020. Doi: 10.1016/j.jsps.2020.02.005

ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **SWT – Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299 – 304, mar 2012. Doi: 10.1016/j.lwt.2011.06.015

BAEZA, G.; SARRIÁ, B.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Dihydrocaffeic acid, a major microbial metabolite of chlorogenic acids, shows similar protective effect than a yerba mate phenolic extract against oxidative stress in HepG2 cells. **Food Research International**, v. 87, p 25-33, set 2016. Doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.011

BAGHERI, L.; MADADLOU, A.; YARMAND, M.; MOUSAVI, M. E. Spray-dried alginate microparticles carrying caffeine-loaded and potentially bioactive nanoparticles. **Food Research International**, v. 62, p. 1113-1119, ago 2014. Doi: 10.1016/j.foodres.2014.05.040

BEZERRA, D. G. et al. *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) microencapsulated bioinsecticide: Spray drying technique optimization, characterization, in vitro release, and degradation kinetics. **Powder Technology**, v. 382, p. 144–161, 2021. Doi: 10.1016/j.powtec.2020.11.079

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, p. 6852 – 6865, 2013. Doi: 10.3390/molecules18066852

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.

Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, jul 2011. Doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032

BRITO, V. G. B.; CHAVES-NETO, A. H.; DE BARROS, T. L.; OLIVEIRA, S. H. P. Soluble yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract enhances in vitro osteoblastic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, nov 2019. Doi: 10.1016/j.jep.2019.112131

BRUN, G.W. Processo de produção de erva-mate descafeinada e de micro/nanopartículas de cafeína usando dióxido de carbono supercrítico. Porto Alegre. 2012. 118 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Escola Politécnica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BRUSCHI, M.L. **Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems**. Elsevier, 2015. E-book (68-86). IBNS 978-0-08-100092-2. Doi: 10.1016/C2014-0-02342-8. Acesso ao capitol do livro na base de dados Science Direct da Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780081000922/strategies-to-modify-the-drug-release-from-pharmaceutical-systems#book-info>. Acesso em: 15 mar. 2023

BUTIUK, A. P.; MARTOS, M. A.; ADACHI, O.; HOURS, R. A. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 27-23, mar 2016. Doi: 10.1016/j.jarmap.2015.12.003

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, out 2010. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015

CHEN, L.; CHENG, C.; LIANG, J. Effect of esterification condensation on the Folin–

Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, v. 70, mar 2015. Doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.038

CHEN, X.; LIANG, L.; HAN, C. Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. **LWT**, v.131, set 2020. Doi: 10.1016/j.lwt.2020.109769

DAI, J.; SAMEEN, D. E.; ZENG, Y.; LI, S.; QIN, W.; LIU, Y. An overview of tea polyphenols as bioactive agents for food packaging applications. **LWT**, v. 167, set 2022. Doi: 10.1016/j.lwt.2022.113845

DE MARCO, I.; RIEMMA, S.; IANNONE, R. Life cycle assessment of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from coffee beans. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 393-400, mar 2018. Doi: 10.1016/j.supflu.2017.11.005

ESPIRITO SANTO, A. T. do. **Extração de cafeína e compostos com atividade antioxidante das folhas de erva-mate por três processos: infusão, campo elétrico moderado e fluido supercrítico**. Porto Alegre. 2020. 105p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Escola Politécnica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

FILIP, R.; LOPEZ, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. **Phytoterapy Research**, v. 12, p. 129-131, 1998.

FOLIN, O.; DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenol (and derivatives) in urine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, p. 305-308, jul 2015.

FOTI, M. C. Use and Abuse of the DPPH• Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p 8765-8776, 2015. Doi: 10.1021/acs.jafc.5b03839

FRANCA, A. S. Coffee: Decaffeination. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 232-236, 2016. Doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00183-5

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

GEBARA, K. S.; GASPAROTTO-JUNIOR, A.; SANTIAGO, P. G.; CARDOSO, C. A. L.; DE SOUZA, L. M.; MORAND, C.; COSTA, T. A.; CARDOZO-JUNIOR, E. L. Daily Intake of chlorogenic acids from consumption of maté (*Ilex paraguariensis* a.st.-hil.) traditional beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 45, p. 10093-10100, out 2017. Doi: 10.1021/acs.jafc.7b04093

GULLÓN, B.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; HERRERA, R.; LABIDI, J.; GULLÓN, P. Yerba mate waste: A sustainable resource of antioxidant compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 398-405, mar 2018. Doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.064

HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 803-806, mar 2011. Doi: 10.1016/j.carbpol.2010.07.003

HIBBINS, A. R.; KUMAR, P.; CHOONARA, Y. E.; KONDIAH, P. P.D.; MARIMUTHU, T.; TOIT, L. C.; PILLAY, V. Design of a Versatile pH-Responsive Hydrogel for Potential Oral Delivery of Gastric-Sensitive Bioactives. **Polymers**, p. 474, out 2017. Doi: 0.3390/polym9100474

IBGE. **PEVS - Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?edicao=31773&t=destaques>. Acesso em: 13 fev 2022

INTERPRO. **Adonesine A1 receptor IPR001068**. 2020. Disponível em:  
<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR001068/>. Acesso em: 30 set 2021

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, mar 2016. Doi: 10.1016/j.jff.2015.12.010

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. I.; CARAMÃO, E. B. Chemical composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*): A study of extraction methods. **Journal of Separation Science**, v. 29, dec 2006. Doi: 10.1002/jssc.200600024

JACQUES, R. A.; FREITAS, L. S.; PÉREZ, V. F.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA, J. I.; CARAMÃO, E. B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 6-12, jan 2007. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2005.11.007

JAROSZ, M.; PAWLIK, A.; SZUWARZYŃSKI, M.; JASKUŁA, M.; SULKA, G. D. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 447 – 454, jul. 2016. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.073

KALTBACH, P.; BALLERT, S.; GILLMEISTER, M.; KABRODT, K.; SCHELLENBERG, I. Mate (*Ilex paraguariensis*) tea preparations: Understanding the extraction of volatile and non-volatile compounds upon variations of the traditional consecutive infusions. **Food Chemistry**, v. 374, abr 2022. Doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131756

KIM, J. Y.; CHOI, H. M.; JANG, S. H.; MIN, K. H.; NATHANAEL, A. J.; OH, T. H. Effect of encapsulation with zeolite and coating with TiO<sub>2</sub> on the thermal stability of caffeine during melt extrusion of a PET/TiO<sub>2</sub>@(zeolite/caffeine) nanocomposite. **Advanced Powder Technology**, v. 30, p. 854 -860, abr 2019. Doi:

10.1016/j.appt.2019.01.015

KOTOVICZ, V.; WYPYCH, F.; ZANOELO, E. F. Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 1-9, ago 2014. Doi: 10.1016/j.seppur.2014.04.036

LI, Z.; CHEN, Z.; CHEN, H.; CHEN, K.; TAO, W.; OUYANG, X.; MEI, L.; ZENG, X. Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. **Bioactive Materials**, v. 17, p. 49-70, nov 2022. Doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038

LIMA, M. E.; COLPO, A. Z. C.; ROSA, H.; SALGUEIRO, A. C. F.; SILVA, M. P.; NORONHA, D. S.; SANTAMARÍA, A.; FOLMER, V. *Ilex paraguariensis* extracts reduce blood glucose, peripheral neuropathy and oxidative damage in male mice exposed to streptozotocin. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 9-16, mai 2018. Doi: 10.1016/j.jff.2018.02.024

LV, D.; ZHANG, P.; CHEN, F.; YIN, L. Effects of emulsion concentration on the physicochemical properties of wheat bran arabinoxylan-soy protein isolate emulsion-filled gels used as  $\beta$ -carotene carriers. **LWT**, set 2021. Doi: 10.1016/j.lwt.2021.112498

MALVIYA, T.; TANDON, P. K.; GUPTA, M. K.; SINGH, V.; TRIPATHI, D. N. Simple nanoprecipitation method for size-restricted synthesis of aloe vera nanoparticles: Characteristic analysis and its application as an adsorbent. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 99, fev 2022. Doi: 10.1016/j.jics.2021.100306

MARZORATI, M.; CALATAYUD, M.; ROTSAERT, C.; MELE, M. V.; DUYSBURGH, C.; DURKEE, S.; WHITE, T.; FOWLER, K.; JANNIN, V.; DELLAMINE, A. Comparison of protection and release behavior of different capsule polymer combinations based on *L. acidophilus* survivability and function and caffeine release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 607, set 2021. Doi:

10.1016/j.ijpharm.2021.120977

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIÁ, B.; BRAVO, L. Improved LC-MNn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232-241, fev 2018.

MONTEAGUDO-OLIVAN, R.; COCERO, M. J.; RODRÍGUEZ-ROJO, S. Supercritical CO<sub>2</sub> encapsulation of bioactive molecules in carboxylate based MOFs. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 30, p. 38-47, mar 2019

MUGABI, J.; JEONG, J.; IGURA, N.; SHIMODA, M. Preparation of monodispersed emulsions by premix membrane emulsification without repetitive permeation: Influence of membrane permeation rate (flux) and emulsion viscosity. **Engineering Aspects**, v. 630, dec 2021. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2021.127560

NEGRÃO-MURAKAMI, A. N., NUNES, G. L.; PINTO, S. S.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D.M.C. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 79, p. 561-567, jun 2017. Doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.002

NANDIYANTO, A.B.D; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. **Advanced Powder Technology**, v. 22, p 1-29, 2011.

NEVES, D. B. J.; CALDAS E. D. Determination of caffeine and identification of undeclared substances in dietary supplements and caffeine dietary exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 194-202, jul 2017. Doi: 10.1016/j.fct.2017.03.063

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, abr 2015. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2014.10.031

PANZL, M. V.; ALMEIDA, J. M.S., PEDROZO-PEÑAFIEL, M.; MENCHACA, D.; AURÉLIO, R. Q.; RODRÍGUEZ-HARALAMBIDES, A. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in dried leaves of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) and Their Extraction into Infusions. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 8 mar 2022. Doi: 10.1080/10406638.2022.2030770

PANG, S. F.; YUSOFF, M. M.; GIMBUN, J. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, jun 2014. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.022

PETRE, A. Natural vs. Synthetic Caffeine: What Foods Naturally Contain Caffeine? **Healthline**. 2021. Disponível em: <https://www.healthline.com/nutrition/natural-caffeine> Acesso em: 31.05.2022

PILATTI-RICCIO, D.; SANTOS, D. F.; MEINHART, A. D.; KNAPP, M. A.; HACKBART, H. C. S.; PINTO, V. Z. Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. **Food Research International**, v. 125, nov 2019. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.108600

RESENDE, P. E.; VERZA, S. G.; KAISER, S.; GOMES, L. F.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. The activity of male saponins (*Ilex paraguariensis*) intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 735-740, dec 2012. Doi: 10.1016/j.jep.2012.10.023

RIACHI, G. L.; SIMAS, D. L. R.; COELHO, G. C.; MARCELLINI, P. S.; SILVA, A. J. R.; MARIA, C. A. B. Effect of light intensity and processing conditions on bioactive compounds in mate extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Food**

**Chemistry**, v. 266, p. 317-322, nov 2018. Doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.028

RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and Adenosine. **Journal of Alzheimer´s Disease**, v. 20, p. 3-15, 2010. Doi: 10.3233/JAD-2010-1379

ROSSA, G. E. **Extração e fracionamento de óleo essencial de *Piper hispidinervum* e produção de nano emulsão e nano cápsulas**: experimentos e modelagem. Porto Alegre. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Escola Politécnica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ROVER, M. R.; BROWN, R. C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 104, p. 366-371, nov 2013. Doi: 10.1016/j.jaap.2013.06.011

SANTO, A. T. E; SIQUEIRA, L. M.; ALMEIDA, R. N.; VARGAS, R.M.F; FRANCESCHINI, G.N.; KUNDE, M.A.; CAPPELLARI, A.R.; MORRONE, F.B.; CASSEL, E. Decaffeination of yerba mate by supercritical fluid extraction: Improvement, mathematical modelling and infusion analysis. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 168, fev 2021. Doi: 10.1016/j.supflu.2020.105096

SANTOS, E.C.S.; BICCA, M.A.; BLUM-SILVA, C.H.; COSTA, A.P.R.; SANTOS, A.A. dos; SCHENKEL, E.P.; FARINA, M.; REGINATTO, F.H.; LIMA, T.C.M. de. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, abr 2015. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.02.004

SANTOS, L. P.; CAON, T.; BATTISTI, M. A.; SILVA, C. H. B.; SIMÕES, C. M. O.; REGINATTO, F. H.; CAMPOS, A. M. Antioxidant polymeric nanoparticles containing standardized extract of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. for topical use. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 738-747, dec 2017. Doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.035

SANTOS, M.C.D.; AZCARATE, S.M.; LIMA, K.M.G.; GOICOECHA, H.C.

Fluorescence spectroscopy application for Argentinian yerba mate (*Ilex paraguariensis*) classification assessing first- and second-order data structure properties. **Microchemical Journal**, v. 155, jun 2008. Doi: 10.1016/j.microc.2020.104783

SARAIVA, B. R.; VITAL, A. C. P.; AANJO, F. A.; RIBAS, J. C. R.; PINTRO, P. T. M. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) addition on the functional and technological characteristics of fresh cheese. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 1256-1265, fev 2019. Doi: 10.1007/s13197-019-03589-w

SARTORI, A. G. O.; SILVA, M. V. Caffeine in Brazil: intake, socioeconomic and demographic determinants, and major dietary sources. **Nutrire**, v. 41 n.11 set 2016. Doi: 10.1186/s41110-016-0014-x

SILVA, E. L.; NEIVA, T. J.C.; SHIRAI, M.; TERAQ, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, dec 2008. Doi: 10.1016/j.foodres.2008.08.004

SILVA, C. G. F. **Estudo da Liberação de Fragrâncias Provenientes de Óleos Essenciais a partir de Partículas Poliméricas**. Porto Alegre 2020. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Escola Politécnica, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

SILVA, C. G. F.; CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; MARCZAK, L. D. F. Selective extraction of saponins from *Ilex paraguariensis* St.-Hil. unripe fruits. **Food and Bioproducts Processing**, v. 111, p. 72-82, set 2018. Doi: 10.1016/j.fbp.2018.07.001

SILVEIRA, T. F.; MEINHART, A. D.; SOUZA, T. C. L.; CUNHA, E. C. E.; MORAES, M. R.; GODOY, H. T. Chlorogenic acids and flavonoid extraction during the preparation of yerba mate-based beverages. **Food Research International**, v. 102, p. 348-354, dec 2017. Doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.098

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, jan 1965.

SOUZA, M. C.; SILVA, L. C., CHAVES, J. C., SALVADOR, M. P., SANCHES V. L., CUNHA, D. T. da, CARNEIRO, T. F., ROSTAGNO, M. A. Simultaneous extraction and separation of compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) leaves by pressurized liquid extraction coupled with solid-phase extraction and in-line UV detection. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 2, jul 2021. Doi: 10.1016/j.fochms.2020.100008

TAN, S.; ZHONG, C.; LANGRISH, T. Encapsulation of caffeine in spray-dried micro-eggs for controlled release: The effect of spray-drying (cooking) temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 108, nov 2020. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105979

TATE, P. S., MARAZITA, M. C., MARQUIONI-RAMELLA, D.; SUBURO, A. M. *Ilex paraguariensis* extracts and its polyphenols prevent oxidative damage and senescence of human retinal pigment epithelium cells. **Journal of Functional Foods**, v. 67, abr 2020. Doi: 10.1016/j.jff.2020.103833

TAYLOR, L.T. **Supercritical Fluid Extraction**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Wiley, 1996. 186 p.

TONON, R.V. **Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto**. Campinas. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VARGAS, B. K.; FROTA, E. G.; SANTOS, L. F. dos; GUTKOSKI, J. P.; LOPEWS, S. T.; BERTOL, C.D.; BERTOLIN, T. E.; Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) microparticles modulate antioxidant markers in the plasma and brains of rats. **Food Bioscience**, v. 41, jun 2021. Doi: 10.1016/j.fbio.2021.100999

VELAYATI, A.; NOURI, A. Formulating a model emulsion replicating SAGD in-situ emulsions. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 208, jan 2022. Doi:

10.1016/j.petrol.2021.109528

VIEIRA, J. M.; GUTIERRES, J. M.; CARVALHO, F. B.; PEREIRA, L. B.; OLIVEIRA, L. S.; MORSH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C.; RODRIGUES, M. V.; LEITEMPERGER, J.; LORO, V.; KREWER, C. C.; VENCATO, M. S.; SAPNEVELLO, R. M. Caffeine prevents changes in muscle caused by high-intensity interval training. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 116-123, mai 2017. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.138

VIEITEZ, I.; MACEIRAS, L.; JACHMANIÁN, I.; ALBORÉS, S. Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 58-64, mar 2018. Doi: 10.1016/j.supflu.2017.09.025

VINAROV, Z.; ABRAHAMSSON, B.; ARTURSSON, P.; BATCHELOR, H.; BERBEN, P.; BERNKOP-SCHNÜECH, A.; BUTLER, J.; CEULEMANS, J.; DAVIES, N.; DUPON, D.; FLATEN, G. E.; FOTAKI, N.; GRIFFIN, B. T.; JANNIN, V.; KEEMINK, J.; KESSISOGLU, F.; KOZIOLEK, M.; KUENTZ, M.; AUGUSTIJINS, P. Current challenges and future perspectives in oral absorption research: An opinion of the UNGAP network. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 171, p. 289-331, abr 2021. Doi: 10.1016/j.addr.2021.02.001

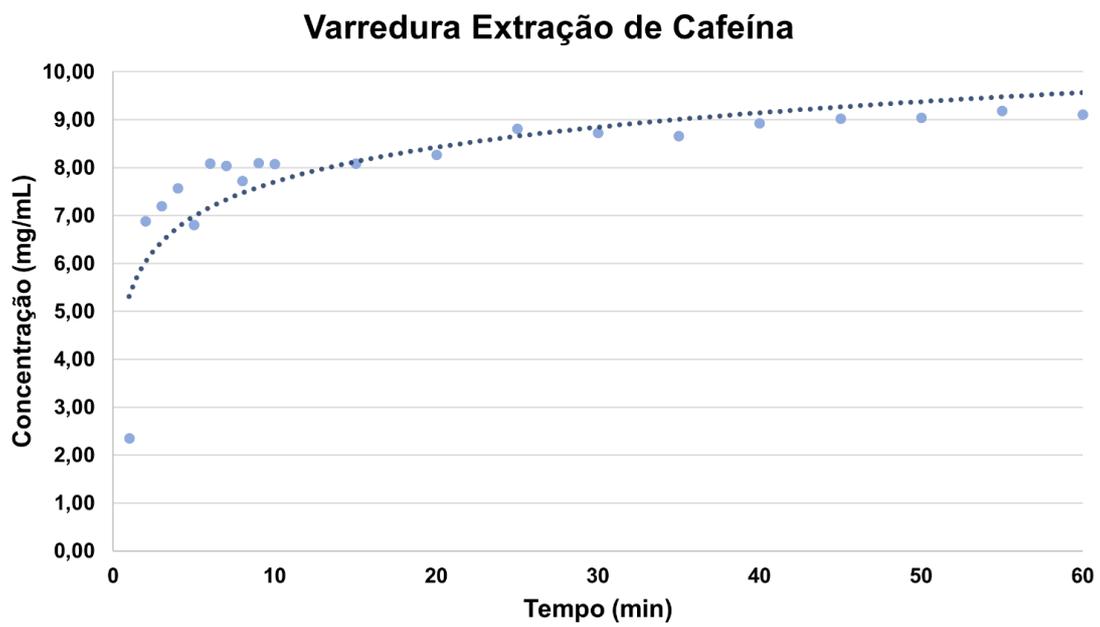
WANG, X.; FAN, Y.; YAN, J.; YANG, M. Engineering polyphenol-based polymeric nanoparticles for drug delivery and bioimaging. **Chemical Engineering Journal**, v. 439, jul 2022. Doi: 10.1016/j.cej.2022.135661

YEO, J.; SHAHIDI, F. Critical Re-Evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 7526-7529, jun 2019. Doi: 10.1021/acs.jafc.9b02462

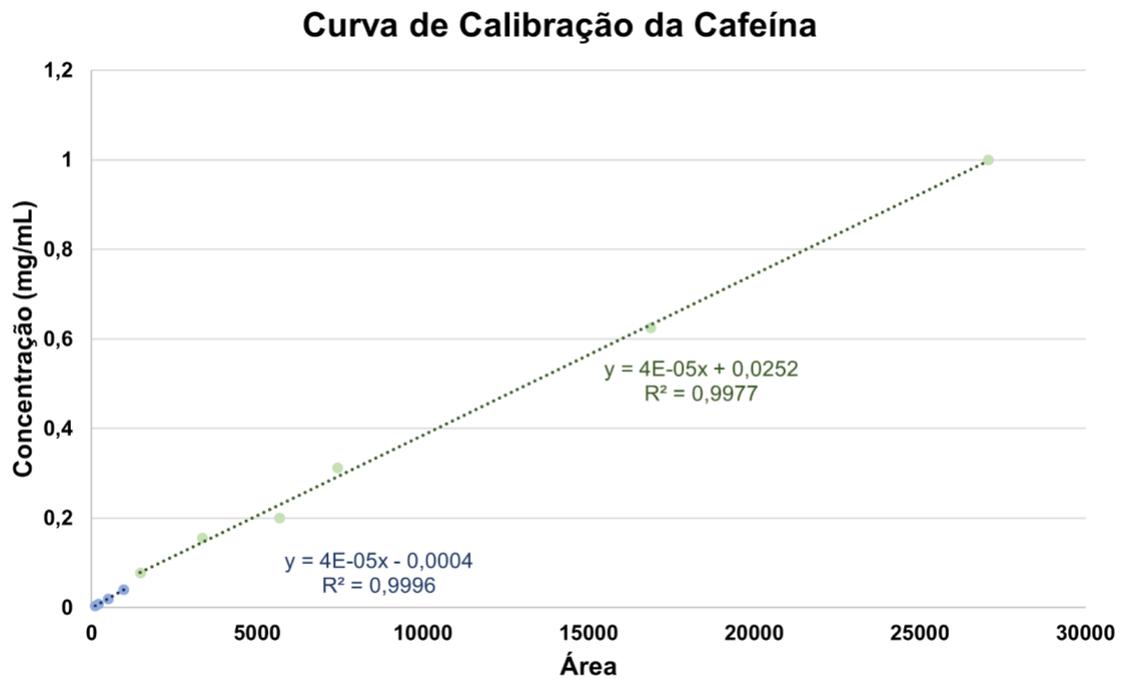
ZAPATA, F. J.; REBOLLO-HERNANZ, M.; NOVAKOFSKI, J. E.; NAKAMURA, M. T.; MEJIA, E. G. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat

accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 1036 – 1046, jan 2020. Doi: 10.1016/j.jff.2019.103646

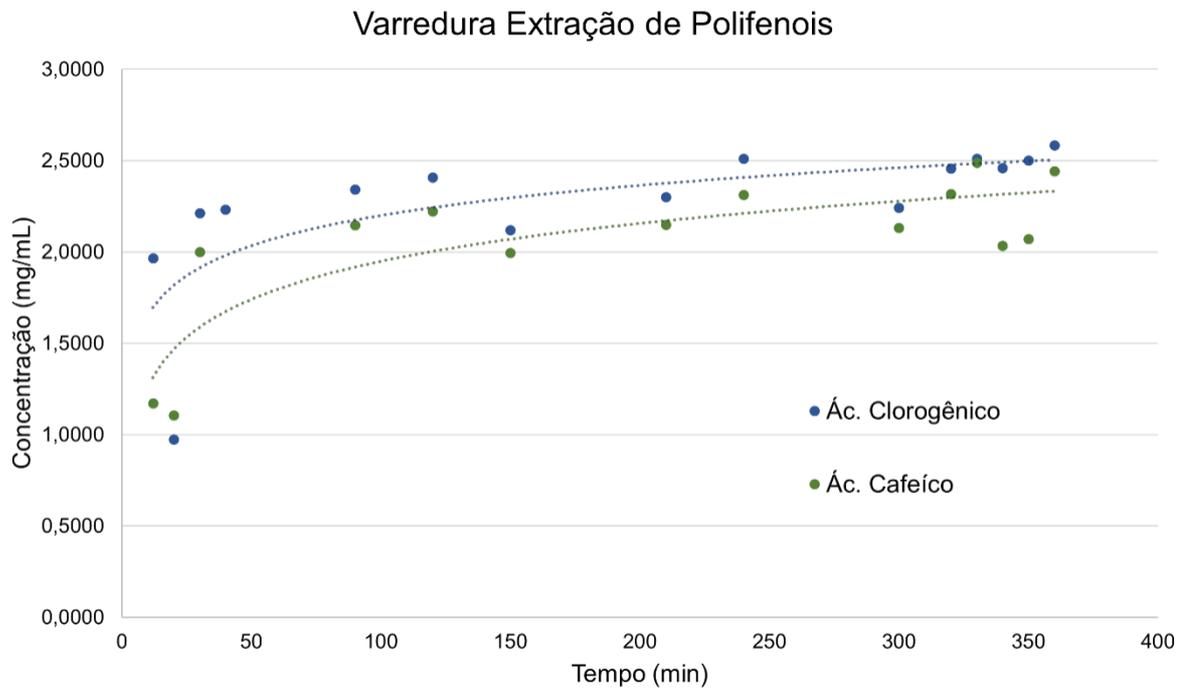
ZOU, X.; ZHAO, X.; YE, L.; WANG, Q.; LI, H. Preparation and drug release behavior of pH-responsive bovine serum albumin-loaded chitosan microspheres. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1389 – 1397, jan 2015. Doi: 10.1016/j.jiec.2014.06.012

**ANEXO A**

## ANEXO B

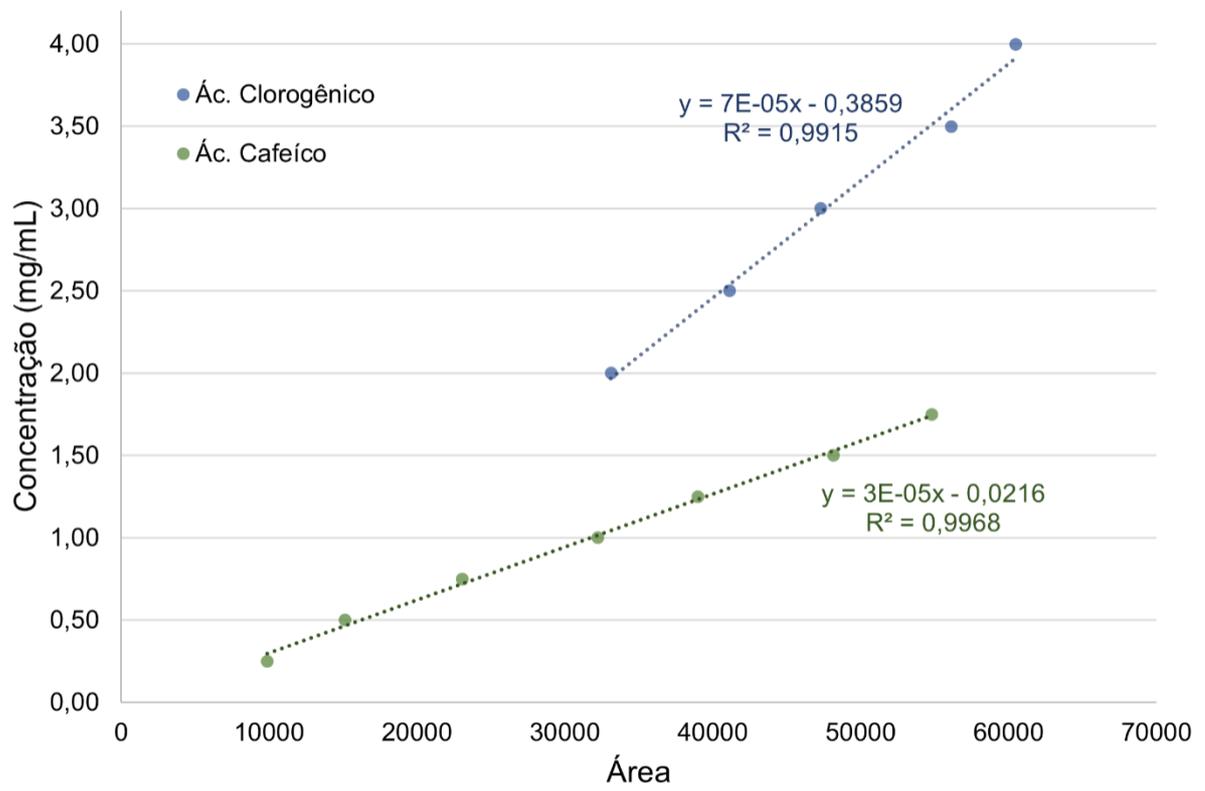


## ANEXO C



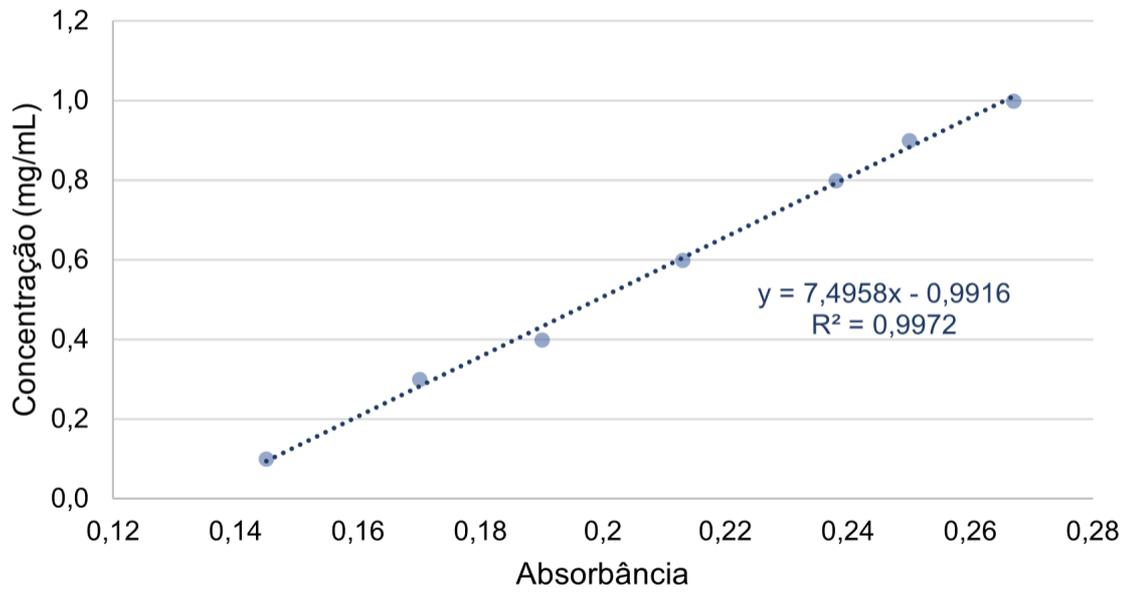
## ANEXO D

## Curva de Calibração Polifenóis



**ANEXO E**

Curva de Calibração da Cafeína





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo  
Porto Alegre – RS – Brasil  
Fone: (51) 3320-3513  
E-mail: [propesq@pucrs.br](mailto:propesq@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)