

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Jéssica Carla Racoski

Tecnologia de fluido supercrítico como ferramenta para obtenção de extrato de
erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Passo Fundo

2019

Jéssica Carla Racoski
Engenheira de Alimentos

Tecnologia de fluido supercrítico como ferramenta para obtenção de extrato de
erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos
Orientador: Dr. Jeferson Steffanello Piccin
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e
não convencionais na produção de alimentos e
ingredientes.

Passo Fundo
2019

CIP – Catalogação na Publicação

R123t Racoski, Jéssica Carla
Tecnologia de fluido supercrítico como ferramenta para
obtenção de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) /
Jéssica Carla Racoski. – 2019.
149 p.: il. color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Steffanello Piccin.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

I. Erva-mate. 2. Cafeína. 3. Compostos bioativos. 4.
Tecnologia de fluido. I. Piccin, Jeferson Steffanello, orientador.
II. Título.

CDU: 633.77

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Tecnologia de fluido supercrítico como ferramenta para obtenção de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)”

Elaborada por
Jéssica Carla Racoski

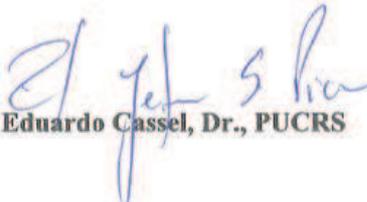
Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora


Jeferson Steffanello Piccin, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)


Aline Dettmer, Dra., UPF


Charise Dallazem Bertol, Dra., UPF


Eduardo Cassel, Dr., PUCRS

Passo Fundo, RS, Brasil
2019

À Nossa Senhora Aparecida,
por sempre me conceder sabedoria nas escolhas
dos melhores caminhos, coragem para
acreditar, força para não desistir e proteção para
me amparar.

A minha filha *Liz*,
pelo amor e motivação incondicional. Que
sempre me impulsiona em direção às vitórias
dos meus desafios.

“Diga-me e eu esquecerei, me ensine e talvez
eu me lembre, me envolva e eu entenderei”
Provérbio Chinês

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

A minha família, principalmente aos meus **pais, Docimar A. Racoski e Evânia F. T. Racoski**, que nunca deixaram de acreditar que persistência tem sua recompensa. O apoio e a união quando é mais preciso é sinal de AMOR mútuo. “Jamais desistir” é um lema que de vocês aprendi! A minha irmã linda, **Gabriela Leticia Racoski** que é confiante em tudo que faz e companheira.

Ao meu companheiro, **Yuri da Silva Menezes**, pela confiança e por acreditar que tudo é possível. A minha filha amada, **Liz Racoski Menezes**, que é a razão pela qual um sorriso surge em minha face todos os dias, que o cansaço adormece no dia mais tenebrosos e que em dias chuvosos serão os dias mais lindos e divertidos.

Ao Prof. **Dr. Jeferson S. Piccin**, muito obrigada pela ajuda, pelas horas de conversas, oportunidades de ensinamentos, orientações e contribuições. Por sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo e à Profa. **Dra. Luciane M. Colla**, pela atenção, apoio, ensinamentos e profissionalismo.

A bolsista de iniciação científica **Luana Pabst**, por tornar as tardes de pesquisa agradáveis, pela ajuda, parceria de todas as horas. Espero que eu tenha plantado uma sementinha para que possa continuar crescendo!

A Prof. Dr. Charise Dallazem Bertol e a empresa Inovamate por todo suporte.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos (PROSUC CAPES modalidade I) e à **Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SDECT)** pelo suporte financeiro à pesquisa (Edital DPCIT 56/2016, processo número 162-16.00/16-2).

“Hoje melhor do que ontem, amanhã melhor do que hoje!”

Filosofia *kaizen*

RESUMO

Os compostos presentes na erva-mate são reconhecidos pelos benefícios à saúde, destacando-se a atividade quimio-preventiva, a inibição do estresse oxidativo, a propulsão intestinal e o efeito vasodilatador e colerético. Dentre os compostos bioativos presentes na erva-mate, destacam-se os alcaloides metilxantínicos, especialmente a cafeína e teobromina, reconhecidos por suas propriedades estimulantes do sistema nervoso central e os compostos fenólicos, com ação antioxidante. Assim, avaliar se a tecnologia de extração supercrítica é efetiva na obtenção de extratos de folhas, caule e flor de erva-mate, bem como as características dos extratos obtidos foram os principais objetivos deste trabalho. Para isso, as condições de pressão e temperaturas de extração foram otimizadas quanto ao rendimento global (R_{∞}), rendimento na taxa de extração constante (R_{CER}) e tempo de extração na taxa constante (t_{CER}) para as folhas de erva-mate. A pressão de operação do sistema ES-CO₂ influenciou positivamente na obtenção de extratos de folhas de erva-mate. A 32 MPa e 58 °C foi possível obter 8,78 % de extrato em relação a massa de matéria-prima. Quando aplicada esta condição a caules e flores, obteve-se rendimentos de extração de 1,37 % e 2,24%, respectivamente. As cinéticas de extração foram avaliadas através do modelo *Spline*, que considera três etapas de extração. O modelo ajustou-se adequadamente aos dados experimentais, apresentando coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99. Os tempos da etapa de taxa constante de extração foram determinados entre 23,7 e 60,6 min, sendo esta etapa responsável pela obtenção de cerca 40 % do total de extrato. A quantificação e identificação dos extratos foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e FTIR. Os principais compostos identificados foram as metilxantinas cafeína e teobromina. Os extratos de flores, caules e flores apresentaram 35,5 e 5,5 mg/g, 63,9 e 9,6 mg/g e 43,1 e 48 mg/g de cafeína e teobromina, respectivamente. Entretanto, os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante. Em condições otimizadas a ES-CO₂ é uma técnica viável para a obtenção de extratos de erva-mate especialmente para a extração de compostos de média polaridade, como a cafeína e teobromina, com potencial aplicação em alimentos, contribuindo para a valorização da cadeia produtiva deste produto.

Palavras-chave: Biocompostos; Cafeína; CO₂; Extração supercrítica; Teobromina

ABSTRACT

The compounds present in the yerba mate are recognized for their health benefits, with emphasis on chemo-preventive activity, inhibition of oxidative stress, intestinal propulsion and the vasodilator and choleric effect. Among the bioactive compounds present in yerba mate, methylxanthine alkaloids, especially caffeine and theobromine, are well known for their central nervous system stimulating properties and phenolic compounds with antioxidant action. Thus, to evaluate if the technology of supercritical extraction is effective in obtaining extracts of leaves, stem and flower of mate, as well as the characteristics of the extracts obtained were the main objectives of this work. For this, the pressure conditions and extraction temperatures were optimized for the overall yield (R_{∞}), yield at constant extraction rate (R_{CER}) and time at constant rate extraction (t_{CER}) for mate leaves. The operating pressure of the ES-CO₂ system positively influenced the extraction of extracts of mate leaves. At 32 MPa and 58 ° C it was possible to obtain 8.78% of extract in relation to the mass of raw material. When this condition was applied to stems and flowers, extraction yields of 1.37% and 2.24%, respectively, were obtained. The extraction kinetics were evaluated through the Spline model, which considers three stages of extraction. The model fitted well to the experimental data, presenting coefficients of determination (R^2) higher than 0.99. The times of the constant rate of extraction stage were determined between 23.7 and 60.6 min, which was responsible for obtaining about 40% of the total extract. The quantification and identification of the extracts were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and FTIR. The main compounds identified were the methylxanthines caffeine and theobromine. The extracts of flowers, stems and flowers presented 35.5 and 5.5 mg / g, 63.9 and 9.6 mg / g and 43.1 and 48 mg / g of caffeine and theobromine, respectively. However, the extracts presented low antioxidant activity. In optimized conditions, ES-CO₂ is a viable technique to obtain extracts of yerba mate especially for the extraction of compounds of medium polarity, such as caffeine and theobromine, with potential application in food, contributing to the evaluation of the productive chain of this product.

Keywords: Biocomposites; Caffeine; CO₂; Supercritical extraction; Theobromine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Diagrama de fases do fluido supercrítico com dióxido de carbono.....	27
Figura 2-Diagrama do processo de extração com fluido supercrítico	29
Figura 3-Elementos básicos do metabolismo primário e secundário da erva-mate e origem de alguns compostos bioativos	30
Figura 4-Métodos de extração para obtenção de biocompostos de plantas.....	34
Figura 5- Formas típicas das curvas globais de extração tipo I e tipo II.	44
Figura 6- Representação da curva de extração e matriz da partícula em cada período	45
Figura 7- Fluxograma metodológico da extração supercrítica de biocompostos da erva-mate.....	47
Figura 8- Esquema do aparato experimental de extração com fluido supercrítico CO ₂	49
Figura 9- Cinéticas de rendimento de extração em diferentes condições de pressão e temperatura, delineadas de acordo com DCCR para ES-CO ₂ aplicada a folhas de erva mate.....	60
Figura 10-Cinéticas de rendimento de extração em diferentes condições de pressão e temperatura, delineadas de acordo com DCCR para ES-CO ₂ aplicada a folhas de erva mate.....	62
Figura 11- Superfície de resposta para ES-CO ₂ para folhas de erva-mate para os parâmetros pressão (X ₁) e temperatura (X ₂) convergindo a) rendimento no período de taxa constante de extração (R _{CER}); b) constante de transferência de massa (k); c) rendimento global (R _∞)	67
Figura 12- Perfis de desejabilidade da correlação das variáveis pressão e temperatura e suas respectivas respostas R _{CER} , k e R _∞	69
Figura 13-- Curvas cinéticas de extração supercrítica nas condições otimizadas (32 MPa e 58°C) de folhas, caules e flores de erva-mate e as respectivas etapas de transferência de massa: CER: taxa constante (convectivo), FER: taxa decrescente e Dif: difusão constante	71
Figura 14-Estrutura química da cafeína e teobromina.....	74
Figura 15-Espectro dos extratos ES-CO ₂ das folhas, caules, flores e frutos da erva mate.....	75
Figura 16- Cromatogramas de: a) folhas de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C	147
Figura 17- Cromatogramas de: a) caules de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C	148
Figura 18- Cromatogramas de: a) flores de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Ordens de grandeza das propriedades termo físicas dos fluidos supercríticos.....	26
Tabela 2-Solventes utilizados em processos de extração supercrítica	28
Tabela 3- Concentração dos principais compostos bioativos presentes na erva-mate (as faixas de valores referem-se a diferentes trabalhos, de plantas de diferentes variedades e tratos culturais, bem como diferentes métodos de extração).....	31
Tabela 4- Diferentes técnicas de extração verificadas na literatura para a obtenção de biocompostos da erva-mate	37
Tabela 5-Descrição dos métodos e resultados da caracterização físico-químicos de folhas, caule e flores de erva-mate.....	48
Tabela 6-Níveis reais e codificados das variáveis pressão (X_1) e temperatura (X_2) utilizados no estudo de extração supercrítica com CO_2 em folhas de erva mate.....	51
Tabela 7-Preparo das amostras para análises cromatográficas.....	55
Tabela 8-Matriz do planejamento experimental e seus respectivos resultados de rendimento na etapa de taxa constante (R_{CER}), constante cinética (k) e rendimento global (R_∞) da ES- CO_2 sobre folhas de erva-mate.....	64
Tabela 9 - ANOVA do rendimento na etapa de taxa de extração constante (R_{CER}), constante de transferência de massa (k) e rendimento global (R_∞)	64
Tabela 10- Parâmetros investigados e seus respectivos valores otimizados	70
Tabela 11- Parâmetros cinéticos do modelo Spline aplicados as cinéticas de extração supercrítica de folhas, caules e flores de erva-mate	72
Tabela 12- Comparativo dos parâmetros t_{CER} , R_{CER} e Y_{CER} com a literatura	73
Tabela 13-Conteúdo de metilxantinas e polifenóis, presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES- CO_2 de pressão 32 MPa, temperatura 58 °C.....	77
Tabela 14- Concentração de fenólicos totais e ação antioxidante presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES- CO_2 de pressão 32 MPa, temperatura 58°C	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	26
2.2	COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA ERVA-MATE	30
2.3	MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE	33
2.4	CINÉTICAS DE EXTRAÇÃO –CURVAS GLOBAIS.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	AMOSTRAS DE ERVA-MATE	47
3.2	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA.....	49
3.2.1	Descrição da Unidade de Extração Supercrítica.....	49
3.2.2	Condução Experimental	50
3.2.3	Análise dos dados e Estratégia de Otimização da Extração Supercrítica.....	50
3.2.4	Otimização multi-resposta com a função <i>desirability</i> de Derriger.....	53
3.3	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS	54
3.3.1	Caracterização de Grupamentos Funcionais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
3.3.2	Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	55
3.3.2.1	Preparo das amostras	55
3.3.2.2	Condições cromatográficas.....	55
3.3.3	Avaliação da Capacidade Antioxidante por FRAP.....	57
3.3.4	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (FT)	57
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM CO₂ (ES-CO₂) FOLHAS DE ERVA-MATE	59
4.2	CINÉTICAS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	71
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS	74

4.3.1	Caracterização de Grupamentos Funcionais por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	74
4.3.2	Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	76
4.3.3	Avaliação da Capacidade Antioxidante por FRAP e Determinação de Fenólicos Totais (FT).....	79
5	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	105
	APÊNDICE B – TABELA CINÉTICA.....	137
	APÊNDICE C – ANOVA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA ERVA-MATE	139
	APÊNDICE D – PROTOCOLO DA ANÁLISE DE ANTIOXIDANTES-FRAP	141
	APÊNDICE E – PROTOCOLO DA ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS - FT	145
	APÊNDICE F – CROMATOGRAMAS CLAE	147

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem buscado alimentos com características funcionais, sendo que a adição de biocompostos provenientes de fontes naturais é uma das alternativas. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é reconhecida por apresentar propriedades nutricionais e medicinais, conferindo a espécie um potencial de novas aplicações.

A erva-mate é uma importante planta nativa da Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil. Cerca de 80% da área de ocorrência está localizada no Brasil, concentrando-se na região Sul, totalizando no ano de 2015 uma produção de aproximadamente 600 mil toneladas (HECK; DE MEJIA, 2007; FIDA MERCOSUR, 2018). A exploração econômica desta planta está relacionada ao comércio das folhas para o produto “erva-mate”, principalmente destinado ao chimarrão e ao tererê (MELLO, 2005) e também na elaboração de blends de chás naturais. Para a elaboração da erva-mate é restrita a inclusão dos frutos e flores, conforme descrito pela Portaria nº 234 na legislação brasileira (BRASIL, 1998). No entanto, para novos produtos, existem estudos que utilizam outras partes da planta, como o fruto e as flores. Sabe-se que as mesmas possuem propriedades diferentes daquelas existentes na folha.

Além do chimarrão e do tererê, as bebidas com erva-mate vem ganhando mercado. A tecnologia aplicada aos processos de fabricação permite manter e até mesmo melhorar a extração de compostos bioativos originários da planta, tais como, compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas. Estes compostos são benéficos à saúde, possuindo efeitos hipocolesterolêmicos, hepatoprotetores diuréticos e propriedades antioxidantes (HECK; DE MEJIA, 2007; RIVELLI *et al.*, 2007, BIXBY *et al.*, 2005; FILIP *et al.*, 2000; GUGLIUCCI; STHAL, 1995), efeito na melhoria da tolerância à glicose (KANG *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012), efeitos anti-inflamatórios (ARCARI *et al.*, 2009; PIMENTEL *et al.*, 2012), atuando sobre o sistema de defesa do organismo e prevenindo a aterosclerose e doenças coronariana. Dessa forma, processos tecnológicos que visem a preservação dos compostos bioativos da erva-mate são estratégias a considerar na busca por outras formas de consumo da matéria-prima.

Para obtenção de extratos bioativos para a saúde humana é necessário preservar as atividades biológicas durante o processamento da matéria-prima. Por este motivo, a qualidade destas substâncias está ligada não só a qualidade da matéria-prima, mas também ao processo de extração utilizado. Dentre os métodos de obtenção de extratos de erva-mate estão infusão a quente e a frio, decocção, sólido-líquido, solventes orgânicos e extração ácida (BRAVO *et al.*, 2014; GNOATTO *et al.*, 2007; SCHUBERT *et al.*, 2006). Entretanto, estes métodos possuem

limitações como resíduos indesejáveis de solvente no extrato e a obtenção de compostos indesejáveis no produto, perda da função biológica e degradação química.

A tecnologia de extração supercrítica representa uma alternativa aos processos de extração existentes. A maior seletividade em relação a alguns compostos e obtenção de extratos livres de solvente são as principais vantagens desta tecnologia. Os fluidos em estado supercrítico possuem propriedades semelhantes a gases como de difusão, viscosidade e tensão superficial, enquanto que a densidades e poder de solvatação são semelhantes à dos líquidos (LIMA; CHARALAMPOPOULOS; CHATZIFRAGKOU, 2018). Estas características elevam as taxas de extração, pois a maior massa específica dos fluidos confere maior poder de solvatação, enquanto que a menor viscosidade combinados com a maior difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida (AGHEL *et al.*, 2004; TSAO; DENG, 2004).

A taxa de extração e o rendimento de processo da tecnologia supercrítica dependem das condições de operação, tais como a temperatura, a pressão, a vazão de solvente e os parâmetros geométricos do equipamento. Assim, o estudo do comportamento destes parâmetros de processo, aliado à avaliação da qualidade dos extratos, auxilia na otimização da extração com fluido supercrítico. Os extratos obtidos por tecnologia supercrítica com CO₂ são considerados naturais e têm permissão para aplicação em alimentos, uma vez que apresentam “status GRAS (*Generally Reconized As Safe*)”. Além disso, o alto gradiente de pressão entre a coluna de extração e a saída do extrator pode produzir extratos livres de micro-organismos e esporos, com maior vida útil quando comparados aos extratos obtidos por processos a baixa pressão (DIAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Desta forma, este trabalho tem por objetivo verificar se a tecnologia de extração supercrítica com CO₂ pode ser uma alternativa a cadeia produtiva de erva-mate para a obtenção de extratos de folhas, caules e flores erva-mate, avaliando a presença de compostos bioativos relacionados a saúde humana. Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- a) avaliar os efeitos da temperatura e pressão do sistema supercrítico sobre os rendimentos dos extratos;
- b) otimizar o processo quanto a a pressão e temperatura de extração supercrítica com CO₂ para as folhas de erva-mate em relação ao rendimento de extrato e taxas de extração;
- c) analisar as cinéticas de extração através de modelos empíricos aplicados a processo dinâmico;
- d) aplicar e comparar as condições otimizados de extração supercrítica aos caules e flores de erva-mate;

e) caracterizar os extratos obtidos quanto a presença de compostos bioativos e potencial antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

A extração supercrítica ou extração com fluido supercrítico pode ser definida como uma operação de solubilização de determinados compostos de uma matriz, sólida ou líquida, por um solvente em condições supercríticas. Um solvente ou substância pura é considerado em estado supercrítico quando este se encontra com pressão e temperatura acima dos valores críticos (P_c e T_c) (BRUNNER, 1994).

A extração supercrítica é um método de separação e purificação que tem sido amplamente utilizado na extração de princípios ativos presentes em plantas. Devido a várias características distintas, tais como a facilidade de recuperação do soluto, reciclagem do solvente com a simples manipulação de temperatura e/ou pressão. E a possibilidade de direcionar a separação pela escolha *a priori* das condições termodinâmicas de temperatura e/ou a pressão aumenta a sintonia do poder de solvência do fluido usado na extração, sem os riscos de deixar resíduos indesejáveis e/ou degradar termicamente os produtos obtidos (MOHAMED, 1997).

As propriedades dos fluidos no estado supercrítico englobam as vantagens dos fluidos nas fases líquida e vapor, simultaneamente, no que se refere à solubilidade e aos aspectos relacionados às propriedades de transporte, mais específico o alto poder de solvatação de um líquido e a baixa viscosidade de um gás. A solubilidade de um soluto num solvente é governada pelas forças intermoleculares entre moléculas envolvidas, que faz com que o solvente se comporte como uma fase extremamente móvel, capaz de se misturar rapidamente com outras substâncias, reduzindo os tempos de processamento (Tabela 1). Os coeficientes de difusão dos solutos são maiores em fluidos supercríticos que nos líquidos, porém é menor que nos gases, então a transferência de massa é mais rápida em fluidos supercríticos que em fases móveis líquidas (BRENNECKE; ECKERT, 1989, CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001).

Tabela 1-Ordens de grandeza das propriedades termo físicas dos fluidos supercríticos

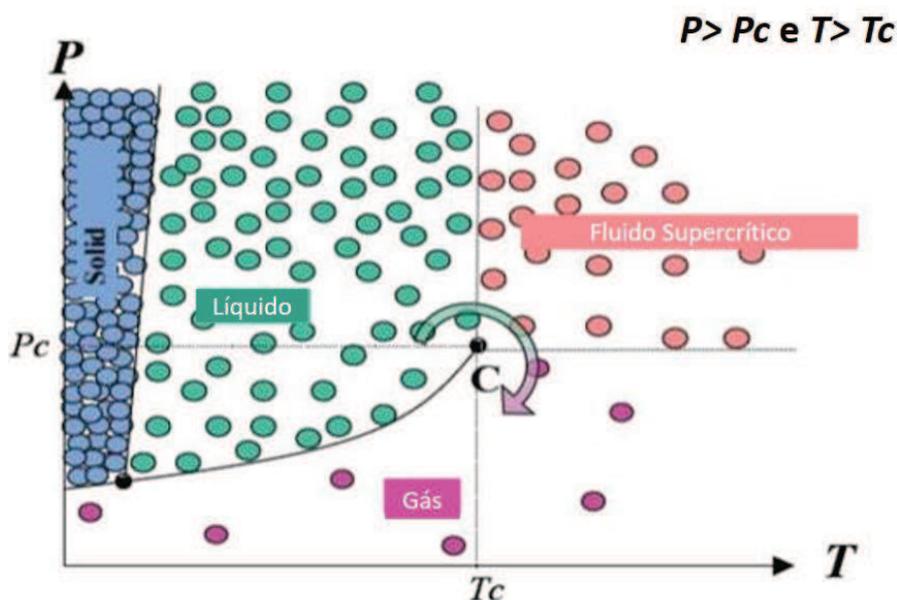
Estado	Densidade (kg.m^{-3})	Viscosidade (N.s.m^2)	Coefficiente de difusão ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
Gasoso	1-100	10^{-5} - 10^{-4}	10^{-5} - 10^{-4}
Fluido Supercrítico	250-800	10^{-4} - 10^{-3}	10^{-8} - 10^{-7}
Líquido	800-1200	10^{-3} - 10^{-2}	10^{-9} - 10^{-8}

Fonte: Taylor (1996)

Esta interação soluto/solvente é fortemente promovida pela proximidade entre as moléculas e, portanto, pela densidade da fase fluida. A densidade pode ser alterada pela variação da pressão e/ou temperatura, passando de valores típicos da densidade de um gás para valores característicos de líquido. Perto do ponto crítico, um pequeno acréscimo na pressão aumenta substancialmente a densidade e conseqüentemente, o fluido apresenta uma nova característica como solvente (ROSA; MEIRELES, 2009; BRUN *et al.*, 2012). Variações expressivas das propriedades do solvente têm sido obtidas para um único fluido supercrítico somente com alterações na densidade (SUN *et al.*, 2002).

O uso da extração com fluido supercrítico e, em particular com o dióxido de carbono supercrítico, é uma alternativa interessante devido as vantagens que apresenta (Figura 1). Apresenta baixo custo, quando comparado aos demais solventes, são fluidos inertes, não-tóxicos, não-inflamáveis, não-agressivos ao meio ambiente e com parâmetros críticos baixos (temperatura 31 °C e pressão de 73,8 kPa). É encontrado no mercado em estado de alta pureza, e ainda, possui facilidade de recuperação do soluto e reciclagem do solvente. Uma desvantagem do uso de CO₂ como solvente é que ele é apolar, assim para analitos polares recomenda-se o uso de um cossolvente, como por exemplo o etanol (BERNA *et al.*, 2000; BECKMAN, 2004; DIAZ-REINOSO *et al.*, 2006; ANDREO; JORGE, 2006; ISASF, 2017).

Figura 1-Diagrama de fases do fluido supercrítico com dióxido de carbono



Legenda-P: Pressão; P_c: Pressão Crítica; T: Temperatura; T_c: Temperatura Crítica.

Fonte: Adaptado de ISASF (2017)

Alguns dos aspectos que restringem o uso dos demais solventes, presentes na Tabela 2, em processos de extração supercrítica, como o clorofluorcarbono causam destruição da camada de ozônio; o óxido de nitrogênio apresenta tendência à decomposição espontânea sob certas condições, o que torna sua aplicação em processos industriais pouco recomendável; o propano pode formar misturas explosivas com o ar sob certas condições; o custo do xenônio é proibitivo em escala industrial; fluidos altamente polares como NH₃, HCl, SO₂ são tóxicos e reativos, limitando seus usos na condição de cossolventes e a água tem as propriedades críticas muito elevadas e em condições supercríticas é altamente oxidante (TAYLOR, 1996).

Tabela 2-Solventes utilizados em processos de extração supercrítica

Solvente	T _c (°C)	P _c (kPa)
Xenônio	16,6	57,6
Trifluormetano	25,9	46,9
Clorotrifluormetano	29,0	38,7
Dióxido de Carbono	31,0	73,8
Monóxido de Nitrogênio	36,5	71,7
Sulfeto de Hexafluor	45,5	37,1
Clorodifluormetano	96,4	48,5
Propano	96,8	42,4
Amônia	132,4	111,3
Tricloro flúor metano	198,0	43,5
Água	374,0	217,7

Fonte: Taylor (1996)

Embora os fluidos pressurizados em condições críticas sejam atraentes para diferentes aplicações, existe uma barreira técnica em função de sua baixa força como solvente em relação a compostos de alto peso molecular. Com o avanço tecnológico, na área de novos materiais a utilização de cossolvente associada ao processo gera uma mudança neste cenário (CAPELETTO *et al.*, 2010; BIMAKR *et al.*, 2011).

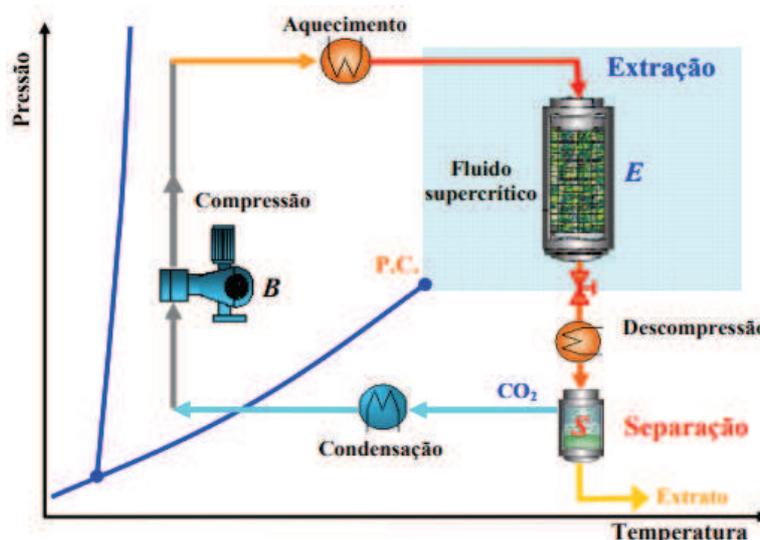
Na extração, as moléculas polares são pouco solubilizadas no CO₂ supercrítico e dessa forma, seu rendimento de extração é baixo. Para aumentar o rendimento da extração de moléculas polares podem ser utilizados cossolventes além do solvente, os quais devem ser adicionados apenas em pequenas quantidades (5 a 20% em massa), atribuído ao aumento da solubilidade devido à ação conjunta dos componentes, ainda é considerado um processo ecologicamente correto pois, não há necessidade de purificação posterior com o uso de etanol e o metanol como cossolvente (TING *et al.*, 1993; DAINTREE; KORDIKOWSKI; YORK, 2008; DALMOLIN *et al.*, 2010; GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013). A presença de etanol afeta

positivamente a extração de polifenóis, pois está relacionada com as interações covalentes (ligações de hidrogênio) e dipolo-dipolo que aumentam a solubilidade dos compostos fenólicos, modificando a polaridade do sistema de extração (SERRA *et al.*, 2010).

SILVA (2013) afirma que:

“O processo de extração supercrítica com CO₂ ocorre em duas etapas: extração dos componentes solúveis da matriz sólida para o solvente supercrítico e separação do extrato do solvente (RAVENTÓS, DUARTE; ALARCÓN, 2002; MARTINEZ; VANCE, 2008). Para a primeira etapa, o CO₂ supercrítico é manipulado em termos de pressão e temperatura, com o objetivo de encontrar o ponto onde há maior poder de solvatação para a substância desejada. O fluido entra no extrator e escoar por todo seu volume extraindo o soluto. No final da coluna do extrator sai a mistura solvente/soluto que segue para a segunda etapa. Na separação, a pressão é reduzida para um valor abaixo do ponto crítico. Desta forma, o solvente vai para o estado gasoso, onde seu poder de solvatação é baixo e por consequência o soluto é precipitado. Assim, o soluto é coletado e o gás é recuperado e redirecionado para o reciclo (Figura 2). Após a etapa de separação o CO₂, agora gás, é condensado, pela diminuição da temperatura. Posteriormente, o agora líquido CO₂, tem sua pressão aumentada para acima do ponto crítico (porém temperatura ainda abaixo da crítica) por uma bomba. O estado supercrítico para o processo de extração é alcançado pela passagem do fluido no aquecedor que aumenta sua temperatura até a escolhida para a extração (ROSA; MEIRELES, 2009) ”.

Figura 2-Diagrama do processo de extração com fluido supercrítico



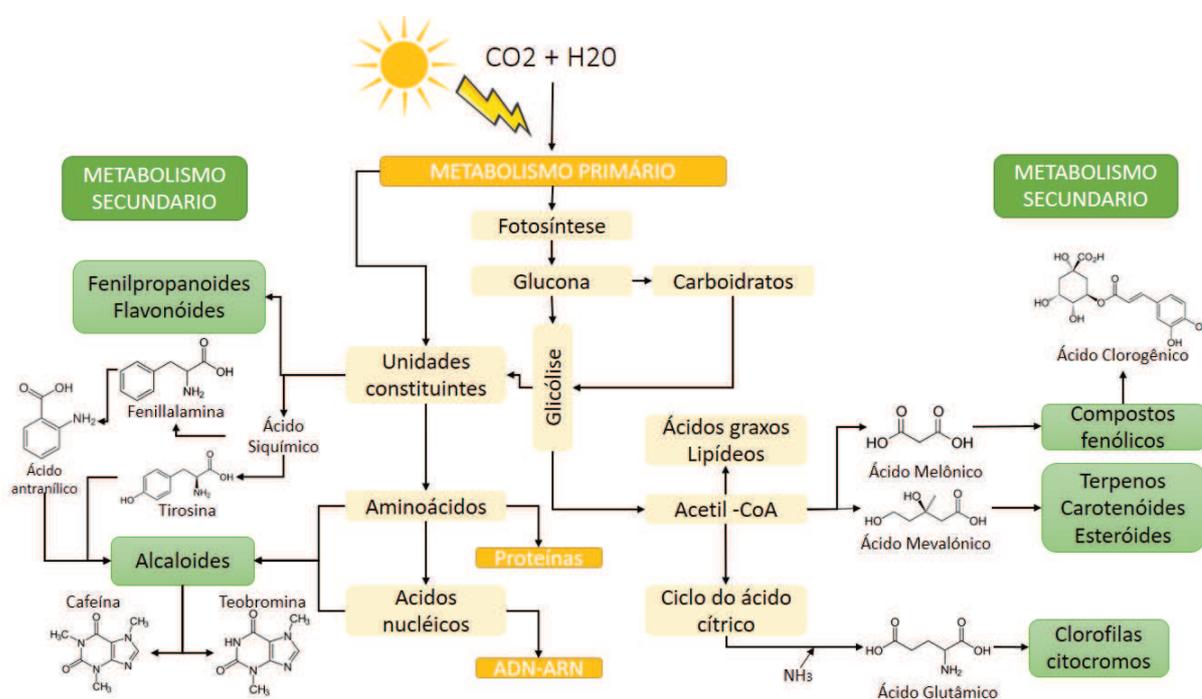
Fonte: Adaptado de Rosa; Meireles (2009)

Então os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo inclui características específicas do material, como massa específica, superfície específica, diâmetro do poro, porosidade, geometria e teor de umidade. O segundo grupo inclui parâmetros do processo como pressão e temperatura de extração, vazão do solvente e pressão de separação (MARTÍNEZ; VANCE, 2008).

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA ERVA-MATE

As plantas de erva-mate produzem compostos químicos através de processos metabólicos primários e secundários, conforme a Figura 3. Os processos primários são responsáveis pela sobrevivência do vegetal, permitindo a ocorrência de processos essenciais como a fotossíntese e a respiração. Os secundários estão relacionados à adaptação e propagação da planta, associado ao processo de assimilação de nutrientes, transporte de solutos ou síntese de proteínas, carboidratos ou lipídeos, sendo responsáveis pela defesa contra herbívoros e microrganismos; proteção contra raios UV e produção de cor e aroma para atrair insetos polinizadores ou animais que espalham seus frutos. Nem todos os metabólitos secundários são encontrados em todas as partes da erva-mate. Eles são sintetizados em pequenas quantidades, e não de forma generalizada, acumulando-se em todas as partes das plantas (raízes, caules, folhas, flores e frutos) (RAVEN; EVERT; EEICHHORN, 2001; GARCIA; CARRIL, 2009).

Figura 3-Elementos básicos do metabolismo primário e secundário da erva-mate e origem de alguns compostos bioativos



Fonte: Adaptado de Garcia; Carril (2009)

Os compostos presentes em extratos da erva-mate trazem benefícios à saúde, destacando atividade quimio-preventivas (prevenção de dano celular causado por doenças crônicas),

inibição da glicação, inibição do estresse oxidativo, efeito colerético (aumento do fluxo biliar) e propulsão intestinal e efeito vasodilatador (GOSMANN *et al.*, 2012).

Dentre os compostos bioativos presentes na erva-mate, destacam-se os alcaloides metilxantínicos, especialmente a cafeína e teobromina, reconhecidos por suas propriedades estimulantes do sistema nervoso central (FILIP *et al.*, 1998; BLUMENTHAL; GOLDVERG; BRIMCKMANN, 2000; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000; DERMARDEROSIAN, 2001; VIEIRA *et al.*, 2010), compostos fenólicos, com ação antioxidante (CHANDRA; DE MEJIA, 2004; BERTÉ, 2011) e um conteúdo menor de flavonoides, tais como quercetina, rutina e kaempferol (FILIP *et al.*, 2001; COELHO *et al.*, 2010; BRACESCO, 2011; SOUZA *et al.*, 2011), e entre os carotenoides a luteína, que faz parte da composição da retina humana (Tabela 3) (SILVEIRA *et al.*, 2016).

Tabela 3- Concentração dos principais compostos bioativos presentes na erva-mate (as faixas de valores referem-se a diferentes trabalhos, de plantas de diferentes variedades e tratos culturais, bem como diferentes métodos de extração)

Parte da planta	Classe	Composto	Quantidade(%)*
Folhas	Metilxantinas	Cafeína ^{4,5,6,7,8,9}	0,4-5
		Teobromina ^{4,5,7,9}	0,2-0,5
	Polifenóis	Taninos ¹	0,45-0,57
		Ácido clorogênico ^{7,8,9}	0,6-1,8
		Ácido cafeico ^{7,8}	0,033
		Ácido di-cafeoilquinico ³	0,16
		Ácido cafeoilquinico ³	4,3-4,7
		Ácido ferrulico ³	0,015-0,53
		Rutina ^{7,8,9}	0,98-1,21
		Saponinas ¹⁰	Saponinas ¹⁰

*Os valores citados referem-se aos maiores valores obtidos por diferentes técnicas de extração nas respectivas referências:

¹Donaduzzi *et al.* (2003), ²Frizon *et al.* (2015), ³Bravo; Goya; Lecumberri. (2007), ⁴Athayde *et al.* (2000) ⁵Coelho *et al.* (2007),

⁶Gnoatto *et al.* (2007), ⁷Isolabella *et al.* (2010), ⁸Turner *et al.* (2011), ⁹Dartora *et al.* (2011), ¹⁰Puangpraphant; Berhow; Mejia (2011).

Fonte: Autor (2019)

O processamento industrial da erva-mate envolve diferentes fases. As folhas e caules verdes são submetidos a inativação térmica (sapeco), secagem e envelhecimento forçado ou natural e moagem (cancheamento). Estes processos podem alterar a composição dos compostos bioativos durante e após os estágios, onde o conteúdo de compostos fenólicos é maior, enquanto que xantinas decrescem, quando comparados com folhas in natura (DARTORA *et al.*, 2011).

A atividade antioxidante da erva-mate é devido a presença dos compostos fenólicos, sendo que o potencial da atividade antioxidante não depende somente da quantidade, mas também do tipo destes compostos (VIEIRA *et al.*, 2010). Os principais polifenóis presentes na erva-mate são os derivados de cafeóleo (ácidos clorogênico, 3,5-dicafeoilquinico, 4,5-dicafeoilquinico e 3,4-dicafeoilquinico) e ácido cafeico (HECK; DE MEIJIA, 2007, DARTORA *et al.*, 2011). Os derivados do ácido dicafeoilquinico têm sido relacionados com vários efeitos biológicos benéficos (reductor do colesterol, anti-mutagênico, anti-inflamatório e antiviral).

Macedo *et al.* (2011) mostraram que a adição da enzima tanase no extrato erva-mate, antes e após a reação de biotransformação enzimática catalisada pela tanase, provou o aumento o poder antioxidante pelo ácido clorogênico em 43%. Assim, os autores sugerem que a enzima foi capaz de proteger o ácido clorogênico e que os produtos dessa reação contribuíram para o aumento do poder antioxidante desta bebida.

A infusão de erva-mate contém diferentes compostos de interesse industrial, como por exemplo o fitol, o esqualeno, as vitaminas (A, C e E), o estigmasterol, destacando-se pelas diversas propriedades diuréticas, antioxidantes, estimulantes, anti-inflamatórias, antirreumáticas e tônicas (GIRARDI, 2010). Também contém saponinas, que são responsáveis pela espuma vista quando a água é adicionada ao mate. Estudos *in vitro* realizados por Puangraphant; Berhow; Mejia (2011) mostraram que as saponinas presentes em folhas de erva-mate impedem inflamação e câncer de cólon.

A peroxidase é uma importante enzima das plantas. A importância da polifenol oxidase se destaca, por apresentar a propriedade de oxidar compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são os substratos utilizados pelas enzimas peroxidase e polifenol oxidase. O produto da oxidação destas enzimas, são considerados como potentes bactericidas e fungicidas (ZHENG-CUIMING *et al.*, 1999). Schinella *et al.* (2000) estimularam o estresse oxidativo, rompendo a estrutura celular, obtendo atividade de peroxidase relacionada à concentração do polifenóis no extrato erva-mate comercial.

Os frutos da erva-mate destacam-se pelo seu potencial antioxidante. O fruto amadurecido, de coloração vermelha, possui compostos fenólicos, como as antocianinas. Segundo Fernandes *et al.* (2016) extratos etanólico acidificados de frutos de erva-mate foram capazes de provocar uma redução de 36% e 42% dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos.

Bravo *et al.* (2014) verificaram que extratos etanólico acidificados de produtos comerciais de erva-mate foram capazes de reduzir glicerídeos totais, colesterol total e LDL, de ratos.

Os polissacarídeos também são encontrados na planta. Segundo Maria-Ferreira *et al.*, (2013) a administração oral de polissacarídeos de erva-mate, inibiu as lesões gástricas induzidas em ratos. Os dados indicam o papel terapêutico dos polissacarídeos contra a lesão gástrica, e propõem seu uso ou de seu extrato vegetal bruto de erva-mate como um fitoterápico.

A luteína, uma substância pertencente ao grupo das xantofilas, representa o principal carotenoide presente nas folhas de erva-mate (LORANTY *et al.*, 2010) e é especialmente importante por fazer parte da composição da retina humana (TANAKA; SHNIMIZU; MORIWAKI, 2012). A luteína está presente em extratos aquosos de diferentes tipos comerciais de erva-mate. Segundo Silveira *et al.* (2016), destacam que a erva-mate moída grossa apresentou a maior quantidade do composto, quando comparada a erva-mate comercial tradicional e a erva-mate para tereré. Ainda, foi verificado que com o aumento da temperatura da água para preparar o chimarrão favorece na migração da luteína, aumentando assim em aproximadamente 50% o conteúdo presente no extrato ingerido pelos consumidores.

Comparando trabalhos de Filip *et al.* (2009) e Peres *et al.* (2013), é possível verificar que a concentração dos pigmentos responsáveis pela cor (rutina e derivados do cafeiol) variam de acordo com a parte da planta estudada, a estação do ano e processamento aplicado. Em relação à composição química, quando a planta é sujeita ao processo de beneficiamento (sapeco), foi identificadas variações como por exemplo para um derivado do cafeiol variação de 238-289 µg de 4,5-diCQA / mL para erva-mate comercial. Já os compostos norisoprenóides, que são potencialmente responsáveis pelo aroma característico especial da erva-mate seus níveis apresentam a função de sinalizar a erva-mate de diferentes regiões e etapas de processamento.

2.3 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ERVA-MATE

A extração é uma técnica de separação baseada nos diferentes graus de solubilidade dos constituintes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000). Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo, considerando a finalidade do extrato que se quer obter.

A extração é uma operação na qual compostos de interesse são retirados de uma matriz vegetal, influenciada por fatores como o tempo, a pressão e a temperatura, vazão de solvente, agitação, tamanho das partículas do vegetal e a proporção entre o que se deseja extrair (soluto) e o solvente (GERKE *et al.*, 2017). Outros fatores também podem interferir significativamente no rendimento final, como principalmente o tipo da matriz envolvida. A variação destes fatores, determina a quantidade e qualidade final do extrato (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999; CACACE; MAZZA, 2003; ASHURST, 2005; REVERCHON; DE MARCO, 2006; BUCIĆ-KOJIĆ *et al.*, 2007, GERKE, 2017). A Figura 4, apresenta um diagrama ilustrativo dos métodos de extração de compostos bioativos em plantas, em especial os observados para extratos de erva-mate.

Figura 4-Métodos de extração para obtenção de biocompostos de plantas



Fonte: Autor (2019)

A extração sólido-líquido é uma operação de transferência de massa que envolve diversos fenômenos. O processo inicia com a entrada do solvente para o interior do sólido, logo depois ocorre a difusão da solução rica no soluto para a interface sólido-líquido e, então, a passagem desta solução da superfície do sólido para a fase líquida por convecção (PRICE; SPITZER, 1993; JENSEN; ZANOELO, 2012).

De todas as variáveis do processo, o tamanho das partículas da matriz vegetal é, na maioria dos casos, a que mais interfere no rendimento. A diminuição do tamanho de partículas

facilita o acesso do solvente de extração até o soluto, reduzindo as limitações de transferência de massa, e está associada a uma quebra da parede celular e a facilidade em melhorar a difusão no soluto (LAROZE *et al.*, 2010).

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade e uma redução na viscosidade dos solventes, fazendo que com eles penetrem com maior facilidade na matriz vegetal e, com isso, melhore o processo de transferência de massa. Entretanto, o incremento da temperatura não é adequado quando as substâncias de interesse possuem instabilidade térmica, como pode ser o caso de muitos compostos bioativos. Por exemplo, compostos responsáveis pelo sabor, como linalol, são oxidados durante a secagem da erva-mate (FILIP *et al.*, 2009). Já a desidratação da planta e o processo de extração, afetam na estabilidade dos compostos fenólicos, pela degradação química e enzimática e também pela volatilização dos compostos. A decomposição térmica tem sido considerada como a principal causa de redução do teor de fenóis, posto que, o teor fenólico total diminui com o aumento da temperatura (MOLIN *et al.*, 2014).

O tempo de extração varia em função da rigidez dos tecidos do material vegetal e da natureza das substâncias a extrair. E a agitação influencia diretamente na redução do tempo de extração, como agente acelerador, por exemplo. Considerando que um o processo de extração depende de fenômenos de difusão e, que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver seja constante, quanto maior o fluxo de solvente maior a taxa de extração. Assim, tempo e agitação influenciam na velocidade da difusão (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2000).

A escolha entre os tipos de extração está intimamente ligada aos objetivos da mesma. Se o interesse está no aproveitamento de sólidos, para fins industriais, prefere-se métodos que forneçam maior quantidade de matérias e, portanto, processos mais rigorosos e intensivos de extração. Geralmente, métodos convencionais são empregados utilizando uma grande quantidade de solvente que, além de possuírem gasto energético para a separação das fases, a manipulação de grandes quantidades de solventes poluidores pode representar uma dificuldade adicional para o controle ambiental, seja da qualidade do ar, dos efluentes líquidos ou rejeitos sólidos (LUZ, 1998; BRAGA, 2005).

Analisando os trabalhos de Schubert *et al.* (2006) e Gnoatto *et al.* (2007) observa-se que a eficiência da extração de metilxantinas da erva-mate depende da sua solubilidade nos solventes empregados. Utilizando água como solvente, a extração por decocção mostrou-se mais eficiente que a extração quando convencional por Soxhlet. No entanto, melhores rendimentos de metilxantinas foram obtidos conjugando o método de extração com pré-

tratamento ácido e por decocção. A utilização de solução ácida leva à protonação das moléculas de cafeína e teobromina, proporcionando um aumento na solubilidade em água de ambas as moléculas, a qual é incrementada pela elevação da temperatura. A Tabela 4, por sua vez, apresenta um resumo de aplicações de diferentes métodos de extração para a obtenção de biocompostos de erva-mate. Para a obtenção destes extratos são utilizados solventes orgânicos (tetracloreto de carbono, diclorometano, clorofórmio, isopropanol), e/ou soluções aquosas (alcalinas ou ácidas).

Tabela 4- Diferentes técnicas de extração verificadas na literatura para a obtenção de biocompostos da erva-mate

Matéria Prima	Método de Extração	Tipo de solvente	Biocompostos	Quantificação extratos	Referências
Erva-mate comercial	Infusão	Água	Ácido cafeico	1,65- 1,73 mg/g	Bravo <i>et al.</i> , 2014
			Ácido cafeoilquinico	43,38- 47,57 mg/g	
			Ácido ferruloilquinico	0,15- 0,53 mg/g	
			Ácido Di-tricafeoilquinico	30,65- 30,92 mg/g	
			hidroxicinamoilquinico	0,52- 1,05 mg/g	
Flavonóides	4,73- 5,01 mg/g				
Folhas	Sólido-líquido	Água	Rutina	40 mg/L	Gerke <i>et al.</i> , 2017
			Teobromina	639,8 mg/L	
			Ácido Clorogênico	103,6 mg/L	
			5-O-ácido cafeoilquinico	449,2 mg/L	
Frutos	Sólido-Líquido	Etanol (70%)/água (30%)	Antocianinas	17,52 mg / g	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
			Flavonoides	100,98 mg / g	
			Ácido cafeico	15,72 mg / g	
			Quercitrina	15,91 mg / g	
			Ácido clorogênico	13,58 mg / g	
			Cafeína	8,04 mg / g	
			Ácido gálico	5,39 mg / g	
			Teobromina	2,56 mg / g	
			Catequina	2,17mg / g	
Frutos	Sólido-Líquido	Etanol/HCl (2%)	Antocianinas	43,79 mg / g	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
			Flavonoides	122,94 mg / g	
			Ácido cafeico	21,49 mg / g	
			Quercitrina	18,96 mg / g	
			Ácido clorogênico	15,85 mg / g	
			Cafeína	8,11 mg / g	
			Ácido gálico	6,01 mg / g	
			Teobromina	4,06 mg / g	
			Catequina	2,41 mg / g	

Frutos	Supercrítica	CO ₂	Compostos Fenólicos Totais	0,09EAG/g	Fernandes <i>et al.</i> , 2017
			Antioxidantes -DPPH	13,46 IC ₅₀ mg/mL	
			Cafeína	54,17 mg/L	
			Teobromina	0,93 mg/L	
			Ácido Palmítico	6,04 mg/L	
Frutos	Supercrítica	Propano	Compostos Fenólicos Totais	0,093 EAG/g	Fernandes <i>et al.</i> , 2017
			Antioxidantes -DPPH	20,14 IC ₅₀ mg/mL	
			Cafeína	163,28 mg/L	
			Teobromina	2,45 mg/L	
			Ácido Palmítico	11,34 mg/L	
Folhas	Supercrítica	CO ₂	Cafeína	58,95 – 350,94 mg/g	Esmelindro <i>et al.</i> , 2004
			Teobromina	0,312 – 4,14 mg/g	
Folhas	Supercrítica	CO ₂	Cafeína	177 mg/g	Cassel <i>et al.</i> , 2010
			Teobromina	1,4 mg/g	

Fonte: Autor (2019)

Faggion *et al.* (2017), investigaram a influência da agitação sobre a extração em folhas de erva-mate dispersas em água. A cinética da extração indicou que a transferência de soluto é controlada por difusão para velocidades de agitação igual ou superior a 500 rpm, enquanto que resultados opostos, para velocidades de agitação abaixo de 500 rpm, sugerem a importância das resistências convectivas e difusivas no mecanismo de transporte de massa. A tendência global na busca por tecnologias menos agressivas ao meio ambiente, tem impulsionado os estudos e aplicações industriais de tecnologias envolvendo fluidos supercríticos, uma vez que a maioria de suas aplicações pode utilizar como solventes substâncias inofensivas ao meio-ambiente e à saúde (PERRUT, 2001).

O CO₂ supercrítico é mais apropriado como solvente nas extrações de compostos de alto valor agregado provenientes de produtos naturais. Devido a sua característica apolar, é mais indicado adequado para a extração de antioxidantes como carotenoides e outros relativamente lipofílicos. No caso dos antioxidantes polifenólicos, com características polares e conseqüentemente menos solúveis no CO₂, é necessário o uso de cossolventes a fim de melhorar o processo de extração (TSAO; DENG, 2004; DIAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

Cardozo Junior *et al.* (2003) investigaram o grupo de compostos presentes em erva-mate, as metilxantinas, com predominância de cafeína, teobromina e traços de teofilina. Como forma alternativa de obtenção das metilxantinas utilizaram a extração por fluido supercrítico. Os teores médios de metilxantinas, correspondendo à soma de cafeína e teobromina, foram de 8,906 - 19,112 mg/100 g de extrato de diferentes progênies de erva-mate do estado do Paraná. Esta extração caracteriza-se pela obtenção de produtos de elevada qualidade, sem as inconveniências de resíduos de solventes e alterações nas propriedades do extrato presente na extração convencional.

Fernandes *et al.* (2017) realizaram a extração de compostos bioativos de frutos de erva-mate, e obtiveram como biocomposto principal a cafeína com 163,28 mg/g por extração com CO₂ supercrítico e 54,17 mg/g por extração com propano pressurizados. A atividade antioxidante mais eficiente foi para o extrato supercrítico usando CO₂. O rendimento total de extrato com solvente CO₂ apresentou-se inferior ao propano, mas resultou em um extrato 66% mais concentrado em cafeína, sobressaindo a qualidade do extrato supercrítico de erva-mate.

Vieitez, *et al.* (2018) obtiveram extratos com CO₂ supercrítico de boldo (*Peumus boldus*), cedro (*Aloysia citrodora*), coníferas (*Maytenus ilicifolia*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e pitanga (*Eugenia uniflora*) que mostrou um efeito antioxidante positivo, embora tenha sido menor do que expressa por alecrim ou antioxidantes sintéticos, obtidos em diferentes condições de extração. O rendimento dos extratos com extração supercrítica com

CO₂ para todas as matrizes vegetais em temperatura de 50°C em pressões de 30 e 40 MPa sem o uso de cossolvente variaram de 0,8% a 2,8% e apresentaram presença de fenólicos de 11,9-45,2 mg GAE/g extrato.

Grujic, *et al.* (2012) desenvolveram e validaram uma metodologia para HPLC para identificação de ácido clorogênico (5-CQA) e posterior utilizaram alta pressão com CO₂ para extração de folhas de erva-mate em diferentes pressões (5-10 MPa) e com adição do cossolvente etanol (40, 50 e 60%). O solvente de extração mais eficiente foi CO₂ líquido com etanol aquoso (40%) utilizando uma pressão de extração de 100 bar.

Cassel *et al.* (2010) realizaram extrações de *Ilex paraguariensis* St. Hil.- folhas com CO₂ supercrítico obtiveram rendimento máximo de 1 % na temperatura de 40 °C para todas as pressões (12, 15, 17 e 20 MPa). O efeito da pressão de extração foi menos pronunciado, o que pode ser explicado pelo fato de que existe uma forte variação na densidade na vizinhança do ponto crítico de CO₂ (PERRUT *et al.*, 1997).

A tecnologia supercrítica representa uma técnica de extração que busca o aumento da qualidade através da exploração da seletividade do processo (FRANÇA *et al.*, 1999; BRUNNER, 1994).

As técnicas auxiliares a extração são alternativas quando combinadas aos processos convencionais. Por exemplo, o método de preparação da matéria-prima para a obtenção de extrato, influencia a preservação do biocomposto de interesse bem como aumenta a quantidade de extrato obtido. Segundo Isolabella *et al.* (2010) a decocção associada a liofilização melhorou em 4 vezes os teores de sólidos solúveis em folhas secas de erva-mate do que o do extrato preparado com folhas in natura. Isso pode ocorrer devido à ruptura celular e mecânica durante o processamento.

As extrações assistidas por ultrassom vêm sendo aplicadas para obtenção de diversos compostos bioativos como antioxidantes (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010), óleo essencial (BENELLI *et al.*, 2010), ginsenosídeos (LUO; QIU; LU, 2007), entre outros (TOMA *et al.*, 2001). O ultrassom utiliza ondas em torno de 20 kHz, cuja a frequência é acima da sensibilidade da audição humana (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 2012). Os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas na matéria são os ciclos de compressão e expansão durante a propagação da onda. A melhoria da eficiência de extração de compostos orgânicos é atribuída ao fenômeno de cavitação produzido no solvente pela passagem de ondas ultrassônicas (WANG; WELLER, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2009).

A frequência do ultrassom exerce influência significativa sobre o rendimento e cinética de extração. Entretanto, esta influência é dependente da estrutura do material e do composto a

ser extraído (WANG; WELLER, 2006; TAKEUCHI *et al.*, 2009). Entre os sistemas de ultrassom usados, o mais comum é o banho ultrassônico, o qual surgiu inicialmente para fins de limpeza. Embora este seja um método simples e de fácil utilização, apresenta como desvantagem o aquecimento do fluido que circunda o recipiente contendo a mistura sólido-líquido (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

O ultrassom é método com grande potencial para auxiliar na extração de compostos fenólicos em matrizes vegetais, sendo que o processo pode ser otimizado com o aumento do tempo de sonicação. Serafim (2016), observou que o extrato de erva-mate obtido com assistência de um banho com ultrassom, aplicado em linguiça suína frescal, apresentou a melhor capacidade antioxidante com os parâmetros de 60 °C / 10 min.

A aplicação de um processo de separação/concentração por membrana, posterior aos processos convencionais de extração, é uma alternativa promissora. Gerke *et al.* (2017), mostraram que durante a clarificação do extrato bruto de erva-mate obtido por infusão, utilizando membranas porosas, não provocou perdas significativas de compostos bioativos (ácido clorogênico, rutina, cafeína e teobromina). Os autores também verificaram que a membranas de microfiltração de polieterimida possuem menores coeficientes de rejeição de compostos bioativos, na ordem de 11,0% a 15,5%, em comparações a membranas de microfiltração de α -alumina ou membranas de ultrafiltração polietersulfona.

Negrão-Murakami *et al.* (2017) mostraram que a aplicação de membranas de nanofiltração foi capaz de reter os compostos bioativos presentes em extratos aquosos de erva mate. Um aumento significativo no conteúdo de compostos fenólicos totais (338%), ácido clorogênico (483%), teobromina (323%), cafeína (251%), clorofila (321%), taninos condensados (278%) e saponinas (211%) no extrato concentrado de mate. Consequentemente, o extrato de erva-mate concentrado apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* que o extrato de mate normal.

2.4 Cinéticas de Extração –Curvas Globais

O processo mecânico consiste basicamente em quatro etapas: preparação da solução supercrítica, ajuste das condições da pré-expansão, expansão rápida através de um orifício ou capilar, recuperação do produto na câmara de expansão (WEBER; THIES, 2002). O controle da pressão em extração supercrítica com CO₂ é o mais importante parâmetro operacional pois, a densidade do fluido é extremamente influenciada pela mesma, acarretando uma possível alteração na eluição (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001).

Na fase supercrítica, o efeito da temperatura é muito complexo, pois surge o fenômeno de retrogradação, que indica a inversão das isothermas de solubilidade, e é representada pela influência da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente na solubilidade do soluto no fluido supercrítico. Ou seja, o efeito da temperatura a uma pressão constante, é devido a dois mecanismos: um aumento na temperatura do processo aumenta a solubilidade devido ao efeito da pressão do vapor do soluto e, reduz a solubilidade devido à diminuição da densidade solvente. Estes efeitos opostos resultam na inversão das isothermas de solubilidade (MICHIELIN *et al.*, 2005, PEREIRA; MEIRELES, 2010). Sabe-se que com o aumento do grau de saturação, o tamanho da partícula resultante diminui, pois, acarreta em uma nucleação dominante (BRUN *et al.*, 2012).

Projetos e otimização de processos a alta pressão requerem o conhecimento de parâmetros como solubilidade e coeficiente de transferência de massa, bem como a dependência desses parâmetros com a densidade do solvente empregado. Para isso necessita-se de informações sobre a termodinâmica do sistema e de informações sobre os aspectos cinéticos do processo. Do ponto de vista termodinâmico é preciso relacionar a concentração de soluto na fase supercrítica como uma função da densidade do solvente e da composição do extrato. Por outro lado, os aspectos cinéticos estão relacionados com a taxa de transferência de soluto das partículas sólidas para a fase supercrítica (SOVOVÁ *et al.*, 2001; DÖKER *et al.*, 2004).

Existem dois modos de operação de extratores com fluido supercrítico: o método dinâmico e o método estático. No método dinâmico o solvente escoia continuamente através de um leito de partículas, geralmente sólidos formando um leito fixo, onde o soluto encontra-se presente. O solvente saturado deixa o extrator (célula de equilíbrio) sendo despressurizado à pressão ambiente por uma válvula micrométrica aquecida. À pressão atmosférica o soluto condensa e é coletado. A coleta do soluto pode ser feita no final de um certo tempo ou em intervalos de tempo pré-determinados (McHUGH; KRUKONIS, 1986; MICHIELIN, 2005). O método estático caracteriza-se pelo carregamento simultâneo do soluto e do fluido supercrítico na célula, permanecendo em contato até que o equilíbrio seja estabelecido.

A partir do método dinâmico pode-se obter as curvas de extração (GUIGARD *et al.*, 2001). A curva de extração pode ser utilizada para determinar parâmetros de processo como: tempo total de extração, caracterização das diferentes etapas da extração que serão posteriormente empregadas para a determinação do rendimento global de extração, determinação da solubilidade e modelagem da transferência de massa do sistema (SILVA, 2004).

A curva de extração se caracteriza como um gráfico da massa acumulada de extrato em função do tempo de extração. A curva obtida depende dos parâmetros de processo e dos fenômenos que ocorrem no leito fixo durante a extração. Desta forma, é difícil fazer a comparação entre curvas obtidas a partir de matérias-primas diferentes e de diferentes equipamentos (BRUNNER, 1994).

Durante o processo de extração, a taxa de obtenção de extrato não é uma função linear do tempo. Para classificá-los, é necessário visualizar as formas típicas de rendimento global que envolve a quantidade de material extraído e é calculada na relação entre a massa total de extrato e a massa inicial da amostra em base seca e/ou em função da massa de CO₂ consumida (ALBUQUERQUE, 2008). O rendimento global promove informações para analisar os efeitos da temperatura e pressão no comportamento do processo de extração. Esta análise pode ser feita em termos de rendimento global de extração como um todo ou para um componente específico presente no extrato. O rendimento global está intimamente relacionado com a solubilidade do soluto no fluido supercrítico (PEREIRA; MEIRELES, 2010)

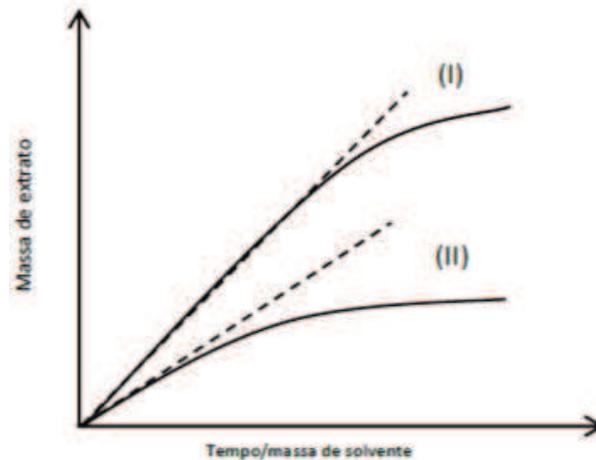
O rendimento global é um parâmetro importante na modelagem matemática da curva de extração global, que representa o acúmulo de extrato versus o tempo ou o consumo de solvente. Na maioria dos modelos o rendimento global é um parâmetro de ajuste ou é estimado por extrapolação das curvas globais de extração. A habilidade para prever as curvas globais de extração, conhecendo os parâmetros do processo, é de fundamental importância tanto no projeto como na otimização de uma planta industrial. A modelagem matemática é provavelmente a principal ferramenta de predição, que tem por objetivo a estimativa dos parâmetros envolvidos no processo (QUISPE-CONDORI, 2005).

A diferença entre os diferentes modelos apresentados na literatura está na interpretação de cada fenômeno. Dentre os modelos mais estudados estão de Crank (1975), Tan; Liou (1989), Goto; Sato; Hirose (1993), Sovová (1994) e França; Meireles (2000). A Figura 5, representa dois tipos de curvas de extração global na extração supercrítica.

Na curva global de extração tipo I, observa-se inicialmente uma taxa de extração constante, seguida por um decréscimo apenas no final do processo, com o decorrer da extração. Curvas deste tipo representam cinéticas de extração a partir de matrizes vegetais com alto teor de material extraível e/ou fácil acesso ao solvente. Na curva global de extração tipo II, observa-se que no início da extração ocorre uma diminuição progressiva na taxa de extração. Este tipo de curva representa a extração de substratos com baixo teor de material extraível e/ou de difícil acesso ao solvente (CAVALCANTI, 2013). O tipo II, também corresponde à segunda parte da curva global de extração Tipo I. Exemplos das curvas global de extração Tipo II são as extrações

de cafeína do café (BRUNNER, 1994), gengibre (ZANCAN *et al.*, 1997), erva doce (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Figura 5- Formas típicas das curvas globais de extração tipo I e tipo II.



Fonte: Adaptado de Cavalcanti (2013)

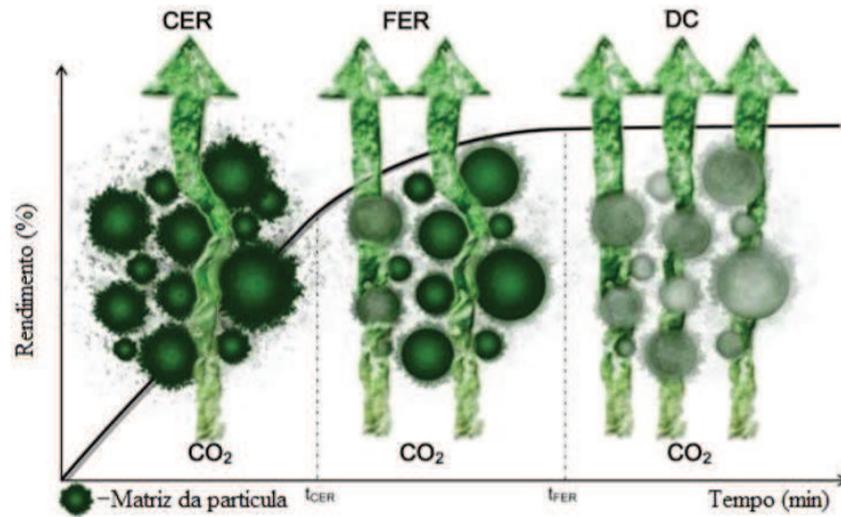
Para ambos os tipos de curvas globais de extração (embora não tão diferenciado do Tipo II), a taxa de extração pode ser dividida em três períodos (BRUNNER, 1994; FERREIRA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2002). Cada período é controlado por diferentes mecanismos de transferência de massa (SOVOVÁ, 1994; TALANSIER *et al.*, 2008; MEZZOMO; MARTÍNEZ; FERREIRA, 2009; PEREIRA; MEIRELES, 2010). As curvas de extração são divididas em três períodos:

- a. taxa de extração constante (CER- *Constant Extration Rate*), onde a retirada de extrato da superfície externa da partícula ocorre a uma velocidade aproximadamente constante, por um fenômeno de convecção;
- b. taxa de extração decrescente (FER – *Falling Extration Rate*), onde começa a aparecer a resistência à transferência de massa na interface sólido - fluido. Nesse período prevalecem tanto a transferência de massa por convecção como por difusão;
- c. taxa de Difusão constante (DC), Taxa de extração lenta, caracterizada pela retirada do extrato através do mecanismo de difusão.

Na Figura 6, há a representação da curva de extração da matriz da partícula em cada período com as três etapas distintas da extração conforme apresentado anteriormente, duas retas necessárias para a determinação das variáveis respostas: taxa de transferência de massa por

unidade de área seccional para o período CER, duração do período CER e rendimento de extração no período CER .

Figura 6- Representação da curva de extração e matriz da partícula em cada período

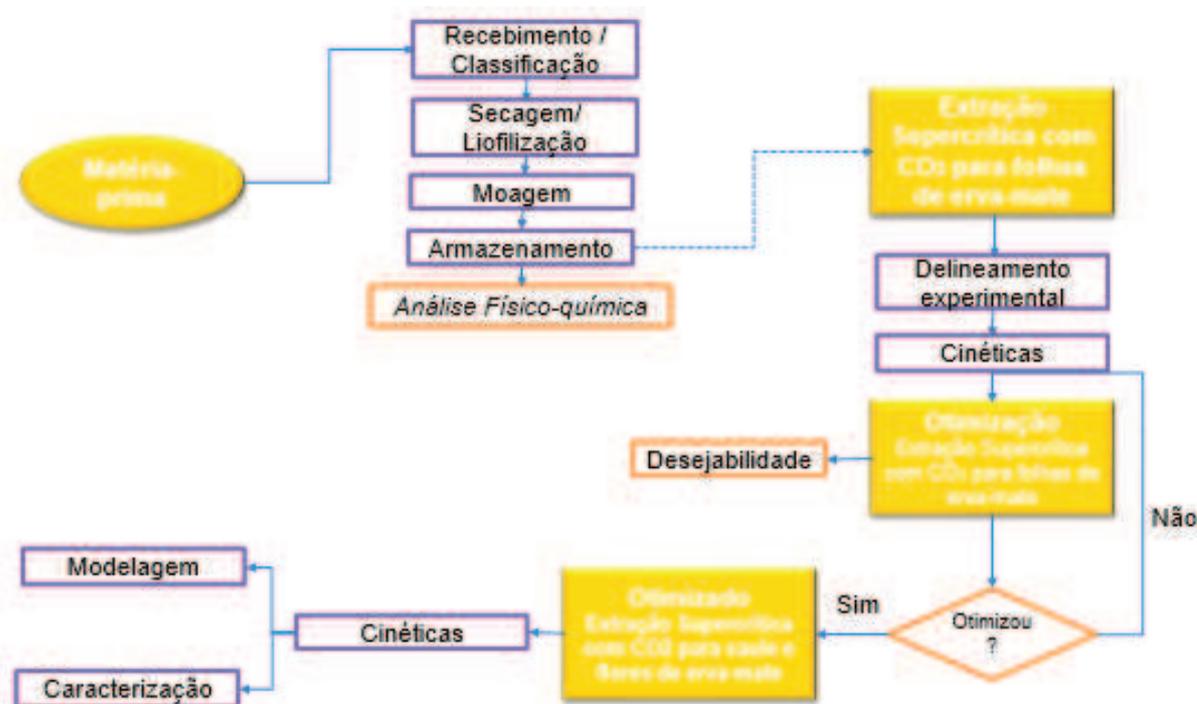


Fonte: Adaptado de (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016)

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 7 apresenta um fluxograma metodológico do presente trabalho. As etapas deste estudo foram a caracterização e o preparo das matérias-primas, a aplicação da extração supercrítica com CO₂ para a obtenção dos compostos bioativos, a otimização e modelagem do processo e a caracterização dos extratos obtidos.

Figura 7- Fluxograma metodológico da extração supercrítica de biocompostos da erva-mate



Fonte: Autor (2019)

3.1 AMOSTRAS DE ERVA-MATE

As amostras foram cedidas por um produtor da cidade de Ilópolis-RS, região de Santo Antônio, coordenadas latitude: -28,93° e longitude: -52,07°. O erval é área não sombreada, cultivado sob técnicas convencionais de manejo. As folhas e os caules foram colhidos no mês de julho/2018 e as flores colhidas no mês de outubro/2018. Foram separadas as partes não íntegras, homogêneas e secas em secador de bandejas com ar forçado na temperatura de 25°C por 24 h para folhas e 48 h para caules. As flores ficaram em ultrafreezer a -18°C por 24h após foram liofilizadas (Liofilizador LS3000- Terroni) por 48 h. Após, as amostras foram moídas (TE-631/3- TECNAL) e as partículas padronizadas em um jogo de 14 a 200 mesh

(Tyler). As amostras foram armazenadas à vácuo em pacotes em polipropileno em temperatura de 4 °C até o uso, o que ocorreu em um período máximo de 15 dias.

As matérias-primas foram caracterizadas de acordo com o teor de umidade, cinzas, proteína bruta, fibra bruta, lipídeos e carboidratos, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Além destas, as matérias-primas foram caracterizadas quanto ao diâmetro de partícula, massa específica real, massa específica aparente e porosidade do leito de partículas, propriedades estas que são importantes em operações em leitos fixos. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5-Descrição dos métodos e resultados da caracterização físico-químicos de folhas, caule e flores de erva-mate

Parâmetro	Método	Matérias-primas		
		Folha	Caule	Flor
Umidade	012/IV Perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105°C (IAL, 2008)	13,54%	19,02%	10,41%
Cinzas	018/IV Resíduo por incineração – Cinzas (IAL, 2008)	5,58%	4,29%	8,69%
Proteína Bruta	036/IV Protídios – Método de Kjeldahl clássico(IAL, 2008)	13,05%	6,78%	14,62%
Fibra Bruta	044/IV Fibra bruta (IAL, 2008)	48,01%	45,45%	53,27%
Lipídios	032/IV Lipídios– Extração direta em Soxhlet (IAL, 2008)	5,08%	1,81%	12,51%
Carboidratos	Foi estimada por diferença (IAL, 2008)	14,74%	22,66%	0,5 %
Diâmetro da partícula	Peneiramento com peneiras série Tyler de mesh -14/200	75 µm	77 µm	72 µm
Massa específica real	Técnica de picnometria líquida usando hexano (g/cm ³)	1,124	1,068	1,1081
Massa específica aparente	Volume ocupado de leito (g/cm ³)	0,2959	0,3233	0,1242
Porosidade do leito fixo de partículas	Volume de vazios do leito	74%	70%	89%

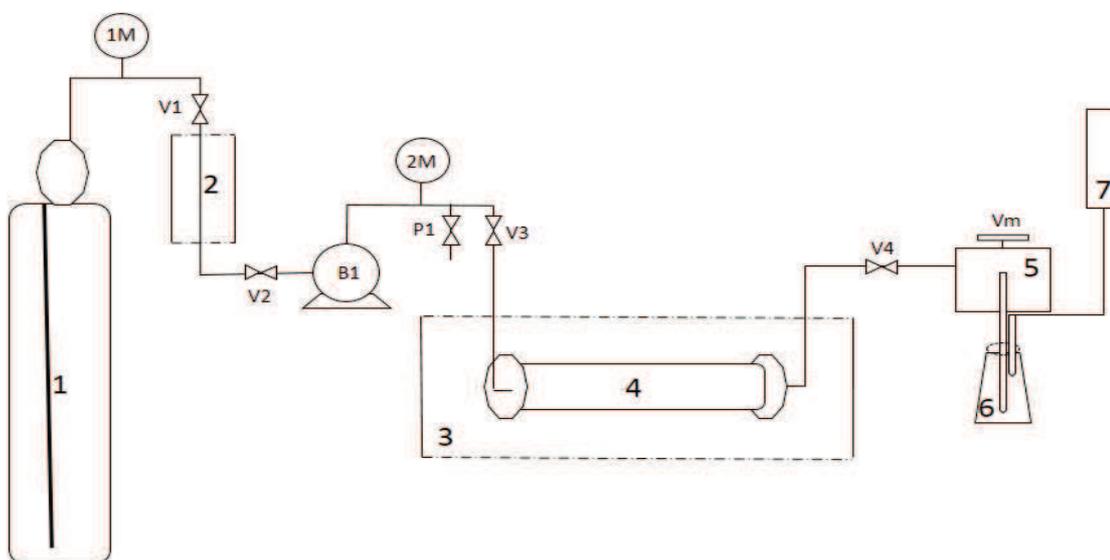
Fonte: Autor (2019)

3.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

3.2.1 Descrição da Unidade de Extração Supercrítica

O equipamento de extração supercrítica utilizado foi desenvolvido pela empresa MAQ'NÁGUA/SP, nº série: BR-002-PL, ano de fabricação 06/2017 dentro das especificações da norma de fabricação ASME SEC VIII-DIV.1. A unidade de extração foi construída em aço inoxidável 316 L. O sistema consiste em um cilindro de dióxido de carbono (CO_2) com tubo pescador, um banho termostático de circulação para refrigeração, bomba pneumática com cabeçote resfriado, um banho termostático, uma válvula micrométrica tipo agulha aquecida, célula extratora. A célula extratora consiste de um cilindro de aço inoxidável de 32,9 cm de comprimento, 2,0 cm de diâmetro interno útil com volume de 100 ml. As extremidades, uma tela com malha de #200 mesh era usada para conter a fase sólida.

Figura 8- Esquema do aparato experimental de extração com fluido supercrítico CO_2



1) Cilindro de CO_2 com tubo pescador; 1M) Manômetro, pressão do cilindro, V1) Válvula de passagem de CO_2 ; 2) Banho termostático de circulação para refrigeração; V2) Válvula de passagem de CO_2 líquido; B1) Bomba de líquido pneumáticas; 2M) Manômetro, pressão do sistema; P1) Purga do sistema de CO_2 ; V3) Válvula de alimentação; 3) Banho termostático de aquecimento; 4) Célula extratora; V4) Válvula de passagem solvente/soluto; Vm) Válvula micrométrica; 5) Bico aspersor saída da amostra; 6) Frasco coletor; 7) Fluxômetro.

Fonte: Autor (2019)

No sistema, representado na Figura 8, o cilindro de CO_2 (1) alimenta a linha de extração onde está situado o manômetro 1M através da abertura da válvula V1. A linha de solvente (CO_2) passa por um banho termostático de circulação (2) para refrigeração, garantido que o solvente

permaneça em estado líquido. Então, a bomba pneumática pressuriza o CO₂ na condição de trabalho (verificado no manômetro 2M), encaminhando o CO₂ para a célula de extração (4). A célula de extração fica imersa em banho termostático (3) que controla a temperatura de extração. O controle da vazão do sistema é realizado através da válvula V4 e da válvula micrométrica (Vm) tipo agulha aquecida (5). O soluto é coletado em frascos âmbar (6) e o fluxo de saída de CO₂ é medido através medidor através de um fluxometro (7).

3.2.2 Condução Experimental

O sistema foi alimentado com 50 g de matéria-prima, adicionada a célula de extração. Aguardou-se até a temperatura atingir a condição experimental (35,9°C a 64,1°C). Pressurizou-se o sistema com CO₂ (White Martins 99,99%) na condição experimental (15 a 33 MPa), mantendo-se em condições estáticas por 2 horas. Então, iniciou-se a extração dinâmica, com vazão de CO₂ de 7,92 g/min. O banho de refrigeração do CO₂ (2) foi mantido a 6 °C e a válvula micrométrica (Vm) foi mantida a 65 °C. Em intervalos pré-determinados a massa de amostra coletada era pesada, a fim calcular o rendimento de extração, de acordo com a equação 1:

$$R = \frac{m_{EXT}}{F_0} * 100\% \quad (1)$$

sendo, R o rendimento de extração (%), m_{EXT} a massa de extrato obtido (g) e F_0 a massa da amostra alimentada no sistema.

3.2.3 Análise dos dados e Estratégia de Otimização da Extração Supercrítica

Como estratégia para a otimização da obtenção de biocompostos de folhas de erva-mate por extração com fluido supercrítico foram utilizadas técnicas sequencias de planejamento experimentais. Para isso, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), com duas variáveis independentes, a temperatura (X_1) e a pressão (X_2), adicionado de pontos axiais, de acordo com Montgomery; Ruger, (2003), variando em níveis conforme apresentados na Tabela 6. A matriz completa do delineamento é apresentada na sessão dos resultados.

Tabela 6-Níveis reais e codificados das variáveis pressão (X_1) e temperatura (X_2) utilizados no estudo de extração supercrítica com CO_2 em folhas de erva mate

Níveis	Pressão (MPa, X_1)	Temperatura ($^{\circ}C$, X_2)
-1,421	11,9	35,9
-1	15	40
0	22,5	50
1	30	60
+1,421	33	64,1

Fonte: Autor (2019)

O modelo cinético proposto por Andrich *et al.* (2005) foi utilizado para correlacionar os dados de extração para cada experimento realizado no planejamento proposto. O modelo considera uma taxa de extração de primeira ordem, sendo limitado a máxima quantidade de extrato possível a ser extraído em determinada condição. A partir dele, foram calculados os valores do rendimento global (R_{∞}) e constante cinética de extração (k). A equação 2 apresenta o modelo cinético proposto por Andrich *et al.* (2005), com modificações:

$$R = R_{\infty} \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)}) \quad (2)$$

sendo, R o rendimento (g/g) em um tempo “ t ” qualquer (min), R_{∞} o rendimento global (g/g) quando $t \rightarrow \infty$ e k a constante cinética (min^{-1}). R_{∞} e k calculados por ajuste da equação 2 aos dados experimentais utilizando o método *Generalized Reduced Gradient* (GRG não linear) da função complementar SOLVER do MS Excel®, através da minimização da função objetivo “Soma dos Quadrados dos Resíduos” (equação 3)

$$F_{obj} = \sum (y_{exp} - y_{mod})^2 \quad (3)$$

sendo, y_{exp} e y_{mod} os valores experimentais e ajustados pelos modelos do rendimento de extração.

Além disso, para a definição das etapas de transferência de massa, bem como o rendimento de extrato em cada uma delas, os modelos *Spline* propostos por Meireles (2008) e Jesus *et al.* (2013) foram utilizados, conforme as equações 4, 5 e 6:

quando $t < t_{CER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (4)$$

quando $t_{CER} < t < t_{FER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_2 \times AL_1 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (5)$$

quando $t > t_{FER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_2 \times AL_1 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_3 \times AL_2 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (6)$$

sendo, b_0 o coeficiente linear da linha de taxa de extração constante (CER, em g/g), b_1 o coeficiente de inclinação da linha reta CER (g/g·min), fisicamente relacionado com a massa de extrato obtida no tempo CER (m_{CER}), b_2 o coeficiente de declividade da taxa de extração no período FER (g/g·min), b_3 o coeficiente de inclinação da difusão controlada (g/g·min), Q_{CO_2} é a vazão mássica de CO_2 (g/min), F_0 a massa de amostra, AL_1 e AL_2 parâmetros relacionados aos tempos máximos t_{CER} e t_{FER} , respectivamente, em que:

$$AL_1 = t - t_{CER} \quad (7)$$

$$AL_2 = t - t_{FER} \quad (8)$$

Desta forma, os parâmetros b_n e AL_n dos modelos foram calculados através de um algoritmo que implementado no MS Excel® utilizando o método *Generalized Reduced Gradient* (GRG não linear) da função complementar SOLVER, através da minimização da função objetivo “Soma dos Quadrados dos Resíduos” (equação 3). O algoritmo foi baseado nos trabalhos de Santos (2007), Santana (2013) e Santana (2016). O rendimento de extrato no período de taxa constante (R_{CER}) foi calculado substituindo o tempo por t_{CER} na equação 4.

O delineamento proposto para o estudo foi analisado utilizando como variáveis dependentes os valores obtidos do rendimento no período de taxa de extração constante (R_{CER}), rendimento global (R_∞), constante cinética (k), ajustando a um modelo polinomial de segunda ordem para a correlação dos dados, gerando superfícies de resposta (MONTGOMERY, RUGER, 2003), de acordo com a equação 9:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{\substack{i,j=1 \\ i < j}}^k \beta_{i,j} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 \quad (9)$$

sendo, β os coeficientes do modelo estatístico e X_i as variáveis independentes analisadas.

Os efeitos principais, de interação e quadráticos das variáveis independentes foram testadas por análise de variância (ANOVA, software livre) a uma probabilidade do Erro Tipo I menor 5% ($p < 0,05$).

3.2.4 Otimização multi-resposta com a função *desirability* de Derringer

Após a análise do DCCR, as condições experimentais otimizadas para a obtenção das melhores respostas de capacidade de adsorção e remoção foram obtidas utilizando a função *desirability* de Derringer. Esta função tem por objetivo encontrar as condições de operação que garantam o cumprimento dos critérios para todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, proporcionar o melhor desempenho possível na resposta conjunta (VERA CANDIOTI *et al.*, 2014).

Neste método primeiramente cada resposta y_i deve ser convertida em função individual *desirability* – d_i , que varia em uma faixa de $0 \leq d_i \leq 1$. Se a resposta for desejada, $d_i = 1$, já se a resposta estiver fora da região aceitável $d_i = 0$. Desta forma, a escolha das variáveis independentes é feita tentando alcançar o maior valor possível de *desirability* global, conforme equação 10:

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3 \dots d_n)^{1/n} \quad (10)$$

sendo n o número de variáveis de resposta.

Se o valor de T_d para a resposta y for um valor máximo teremos, equação 11:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T_d-L}\right)^s & L \leq y \leq T_d \\ 1 & y > T_d \end{cases} \quad (11)$$

em que L é o valor aceitável para a resposta e s é o peso, que quando igual a um, a função *desirability* é linear. Escolhendo $s > 1$, mais ênfase será dada aos pontos próximos ao valor alvo escolhendo $s < 1$, isso será menos importante.

Se o valor T_d para a resposta y for um valor mínimo teremos, como na equação 12:

$$d = \begin{cases} 1 & T_d < y \\ \left(\frac{U-y}{U-T_d}\right)^t & T_d \leq y \leq U \\ 0 & y > U \end{cases} \quad (12)$$

em que U é o maior valor aceitável para a resposta e t é o peso.

A função bilateral *desirability* é aquela em que o valor desejado T_d está localizado entre os limites inferior L e superior U , sendo definida pela equação 13:

$$d = \begin{cases} 0 & y < L \\ \left(\frac{y-L}{T_d-L}\right)^s & L \leq y \leq T_d \\ \left(\frac{U-y}{U-T_d}\right)^t & T_d \leq y \leq U \\ 0 & y > U \end{cases} \quad (13)$$

O processo de otimização multi-resposta foi realizado selecionando a opção “*profile and desirability*” do *software* STATISTICA 7.0. Finalmente, as condições experimentais ótimas foram reproduzidas para comprovar os resultados obtidos.

3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS

As amostras disponíveis para a caracterização foram coletadas in natura, pós extração após 200 min. e extrato dos primeiros 10 min. de extração supercrítica para todas as matérias primas folhas, caule e flor. Primeiramente, foram diluídas em metanol grau HPLC para análise cromatográfica, após esta mesma diluição foi utilizada para a realizar as demais análises (fenólicos totais e de antioxidante). Com exceção, da análise de FTIR que foi usado os extratos puros de cada matéria-prima folhas, caules e flores.

3.3.1 Caracterização de Grupamentos Funcionais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As caracterizações de grupamentos funcionais foram determinadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de infravermelho dos extratos foram registrados sem qualquer preparação de amostra, usando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Agilent, Cary 630) na faixa espectral de 4.000 a 650 cm^{-1} . Amostras extraídas foram medidas utilizando um acessório de amostragem ATR Cary

630 FTIR e um diamante de 1 ressaltado. O sensor ATR de diamante foi limpo com acetona ou álcool etílico antes de cada medição da amostra. Cada espectro foi resultado da co-adição de 48 scans na resolução de 4 cm⁻¹. O software MicroLab foi usado para coletar os dados e criar um método para futuras análises de amostras desconhecidas.

3.3.2 Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.3.2.1 Preparo das amostras

Para as matérias-primas in natura e após a extração, 1 g de amostra foi misturada a 10 mL de metanol (HPLC) (exceto para a folha in natura, que foi usado 20 mL por conta da pigmentação) e deixado em contato por 1 h. Posteriormente, 1 mL do extrato obtido na etapa anterior foi diluído em 10 mL de metanol. As soluções foram filtradas com papel filtro e em membranas de porosidade 0,45 µm (Millipore) antes de serem injetadas no sistema., conforme Tabela 7:

Tabela 7-Preparo das amostras para análises cromatográficas

Amostras	Massa amostra (g)	1º Diluição em Metanol (mL)	2º Diluição em Metanol (mL)	Concentração de Amostra (µg/mL)
Folhas <i>in natura</i>	1,1055	20	10	5527,5
Folhas pós extração	1,0062	10	10	10062
Extrato das folhas após 10min	0,2376	10	10	2376
Extrato das folhas após 1h 40min	0,2471	10	10	2471
Caule <i>in natura</i>	0,5577	10	10	5577
Caule pós extração	0,8766	10	10	8766
Extratos do caule	0,356	10	10	3560
Flor <i>in natura</i>	0,5347	10	10	5347
Flor pós extração	0,5035	10	15	3356,67
Extrato das flores	0,1634	10	10	1634

3.3.2.2 Condições cromatográficas

A caracterização dos extratos, obtidos foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Flexar, Perkin Elmer), contendo bomba binária com gerenciamento de solventes e degaseificador, com injetor automático Auto sampler Flexar LC (volume de injeção foi de 20 µL), e com detector de comprimento de onda variável Flexar PDA, ajustado em 280 nm. Os dados das áreas dos picos foram integrados em Software Chromera. Os comprimentos de onda 330 e 225 nm também foram monitorados. Para fase estacionária, foi utilizada uma coluna ACE

C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Para a fase móvel, foi utilizado acetonitrila (grau HPLC) (solvente B) e água ultrapura (obtida em sistema Direct-Q da Millipore®) pH 3,1 ajustado com ácido fosfórico (solvente A), em modo de eluição gradiente. Durante 7 minutos foi utilizado as proporções (89:11, A : B), após este período (85:15, A:B) por 6 minutos, em seguida (91:9, A:B) por 6 minutos e para finalizar (89:11, A:B) por 2 minutos. O fluxo de fase móvel foi de 0,8 mL.min⁻¹. As injeções foram feitas de modo gradiente. A metodologia validada por Favaretto (2014), foram pesquisadas as substâncias químicas de referência (SQR) ácido ferúlico (99%, Sigma Aldrich, lote STBC5005V), cafeína (Sigma Aldrich, lote C0750), ácido clorogênico (>95% Sigma Aldrich, lote SLBS0103V) e teobromina (>99% Sigma Aldrich, lote BCBS1162V). Para o preparo das fases móveis utilizou-se água ultrapurificada obtida pelo Sistema Directi-Q – Millipore® / Millipore Corporation (EUA), acetonitrila e metanol grau HPLC e ácido fosfórico e acético grau PA. As soluções das SQRs contendo 1000 µg/ mL foram preparadas dissolvendo 0,01 g de cada SQR em balão volumétrico de 10 mL com metanol grau HPLC. De cada uma das SQRs foram construídas curvas de calibração prévias no mesmo dia da avaliação, no intervalo de 50 a 150 µg / mL. As avaliações quantitativas de cada composto representado pelos picos cromatográficos foram calculadas conforme equação 14, para quantificar o composto detectado da amostra analisada é denominado por meio das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas.

$$\frac{100 \times C_p \times A_a}{C_a \times A_p} = \% \text{ do composto, m/m} \quad (14)$$

Sendo: Ca: concentração da amostra, Aa: área do pico da amostra, Ap: área do pico do padrão, Cp: concentração prática.

Para detecção de rutina, catequina e epicatequina foi utilizada a metodologia conforme Scheffer-Basso *et al.* (2018). As substâncias químicas de referência (SQR), da marca SigmaAldrich, catequina (lote BCBC2740), epicatequina (lote BCBC8078V), rutina (lote BCBD8327V), foram preparadas na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, em metanol. Os extratos foram preparados na concentração de 10 mg.mL⁻¹ em metanol e filtrados em membrana de 0,45 µm. Foi utilizada uma coluna C18 Brownlee (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel para rutina, catequina e epicatequina foi acetonitrila : água pH 3,0 18:82 v/v. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL.min⁻¹ e para o ajuste do pH foi utilizado ácido fosfórico. O comprimento de onda de máxima absorção foi de 260 nm para quercetina e de 280 nm para rutina, catequina e epicatequina.

3.3.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante por FRAP

A atividade antioxidante foi avaliada através de redução dos íons de ferro FRAP (*Ferric Redducing Antioxidant Power*), que mede a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizado de acordo com Benzie, Strain (1996) com modificações de Arnous; Makris; Kefalas (2002). Para a realização do ensaio, uma alíquota de 200 µL de amostra (extrato) foi adicionado ao tubo juntamente com 200 µL de solução de cloreto férrico 3 mM. Os tubos foram deixados em repouso durante 30 minutos em banho-maria a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 3600 µL da solução de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine- TPTZ nos tubos com as amostras e no branco e deixado em ambiente escuro durante 10 minutos para a reação. Após os 10 minutos, o espectrofotômetro foi zerado com o branco e após realizado a leitura das amostras em 620 nm. A quantificação foi feita com base em uma curva padrão de ácido gálico (APÊNDICE D), e os resultados foram expressos em µg / g de amostra.

3.3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (FT)

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais das diferentes amostras foi realizada por meio da reação de oxirredução com Reagente de Folin – Ciocalteu (RFC) o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis.

Em ambiente escuro foram adicionados em tubos de ensaio 1 mL do extrato diluído em metanol, 5 mL de água destilada e 1 mL etanol. Após foi adicionado 0,5 mL de RFC agitou-se por 3 segundos e adicionou-se 1 mL de solução aquosa com 7,5% de carbonato de sódio (Na₂CO₃), agitou-se novamente para alcalinizar a solução. Deixa-se em repouso a solução em temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 1 hora e efetua-se as leituras a 765 nm. Foi preparado um branco conduzido sob as mesmas condições, substituindo o extrato pela mesma quantidade de metanol. Foram realizadas em espectrofotômetro (eppendorf- BioSpectrometer) e leituras em triplicata da absorbância. (SINGLETON; ROSSI, 1965). A quantificação foi feita com base em uma curva padrão de ácido gálico (APÊNDICE E), e os resultados foram expressos em µg / g de amostra.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As características das folhas antes e após a extração bem como dos extratos obtidos, em relação à composição, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente, através de análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o complemento Análise de Dados VBA do Microsoft Excel.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, primeiramente, são apresentados e discutidos os resultados referentes ao rendimento do extrato, obtido via tecnologia de extração supercrítica, utilizando CO₂ supercrítico. Juntamente, são discutidos os efeitos dos parâmetros pressão e temperatura no rendimento dos extratos. Posteriormente, as curvas globais de extração com suas respectivas modelagens cinéticas. Por fim, são apresentados os resultados da composição química das matérias-primas e dos extratos supercríticos.

4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM CO₂ (ES-CO₂) FOLHAS DE ERVA-MATE

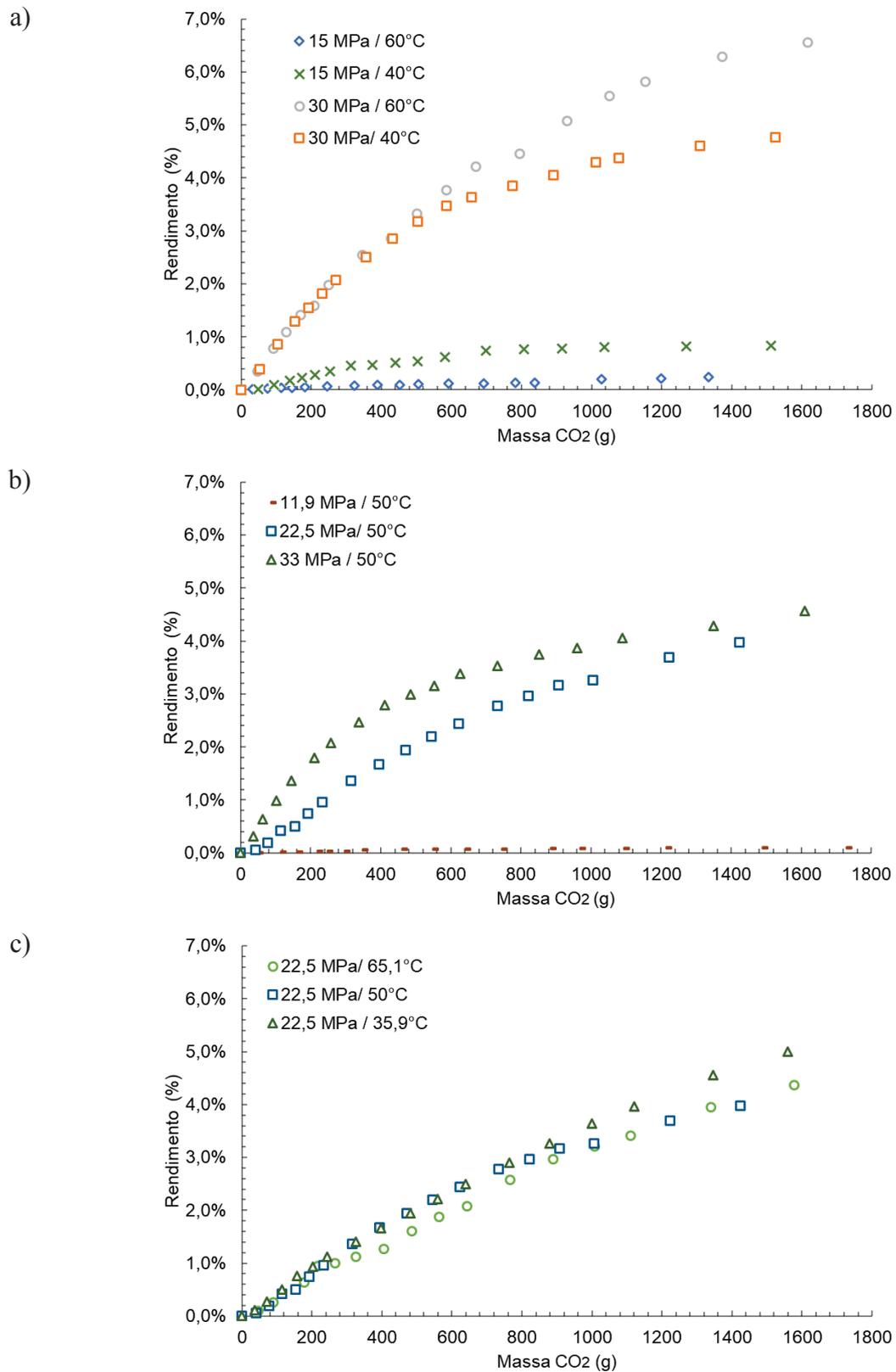
Com base nas observações visuais dos extratos de erva-mate, o mesmo apresentou coloração amarela e viscoso com aspecto ceroso, seu aroma teve semelhanças ao tradicional “chimarrão”, porém com maior intensidade. Estas características se aplicam para todos os extratos (folhas, caule e flores), com diferenças na viscosidade.

A cinética da extração de folhas de erva-mate, compreende no ganho de massa em função do tempo. Como o fluxo de massa de dióxido de carbono foi mantido constante em 4 L.min⁻¹, desta forma, o tempo de extração é facilmente convertido em massa de dióxido de carbono utilizado. Assim, as coordenadas das curvas expressam o rendimento de extração por massa de dióxido de carbono que fluiu através da célula extratora.

As curvas de extração obtidas em diferentes condições de pressão e temperatura estão apresentadas na Figura 9, demonstrando o comportamento típico para ES-CO₂ em função das variáveis de processo aplicadas.

Como pode ser visto, as taxas de extração foram superiores no início do processo, e apresentam uma rápida redução na taxa de extração nos instantes seguintes. Curvas deste tipo representam cinéticas de extração tipo I, quando a matriz vegetal apresenta material extratível de fácil acesso ao solvente (CAVALCANTI, 2013). A primeira etapa é a extração do óleo de fácil acesso, onde a resistência à transferência de massa deve-se a fase solvente (CER); a segunda etapa é o esgotamento do óleo de fácil acesso do material particulado do início da célula extratora, iniciando o processo difusivo (FER); e a terceira é caracterizada pelo processo difusivo, onde há o esgotamento do óleo de fácil acesso ao longo de todo o leito de partículas.

Figura 9- Cinéticas de rendimento de extração em diferentes condições de pressão e temperatura, delineadas de acordo com DCCR para ES-CO₂ aplicada a folhas de erva mate



Fonte: Autor (2019)

Cassel *et al.* (2010) observaram comportamentos cinéticos similares aos observados neste estudo para a ES-CO₂ aplicado a folhas de erva-mate. Outros autores também relatam curvas de extração semelhantes a estas para diferentes matrizes sólidas, tais como, bagaço de soja (ALVAREZ *et al.*, 2019), folhas de rabanete (GOYENECHÉ *et al.*, 2018), frutos de erva-mate (FERNANDES *et al.*, 2017), sementes de coentro (ZEKOVIĆ *et al.*, 2017), *Eupatorium intermedium* (CZAIKOSKI *et al.*, 2015), erva doce (RODRIGUES *et al.*, 2002), gengibre (MESOMO *et al.*, 2012) e café (BRUNNER, 1994).

Conforme a Figura 9, o CO₂ supercrítico é manipulado em termos de pressão e temperatura, com o objetivo de encontrar o ponto onde há maior poder de solvatação para a substância desejada (ROSA; MEIRELES, 2009). Na Figura 9.c observa-se que a pressão exerce influência pronunciada sobre o rendimento de extração que é deslocado para maiores conversões. Este efeito pode ser explicado em termos do aumento do poder solvente e como consequência aumento da densidade de solvente. Os resultados mostram que a inclinação da reta correspondente a etapa de taxa constante de extração, aumenta com o aumento da pressão, isto porque, com o aumento da pressão, o óleo de fácil acesso presente na superfície das partículas é rapidamente extraído e dissolvido na fase fluida devido ao aumento do poder de solvatação do dióxido de carbono. A solubilidade de um soluto num solvente é governada pelas forças intermoleculares entre as moléculas envolvidas, que faz com que se comporte como uma fase extremamente móvel, capaz de se misturar rapidamente com outras substâncias (BRENNECKE; ECKERT, 1989, CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001).

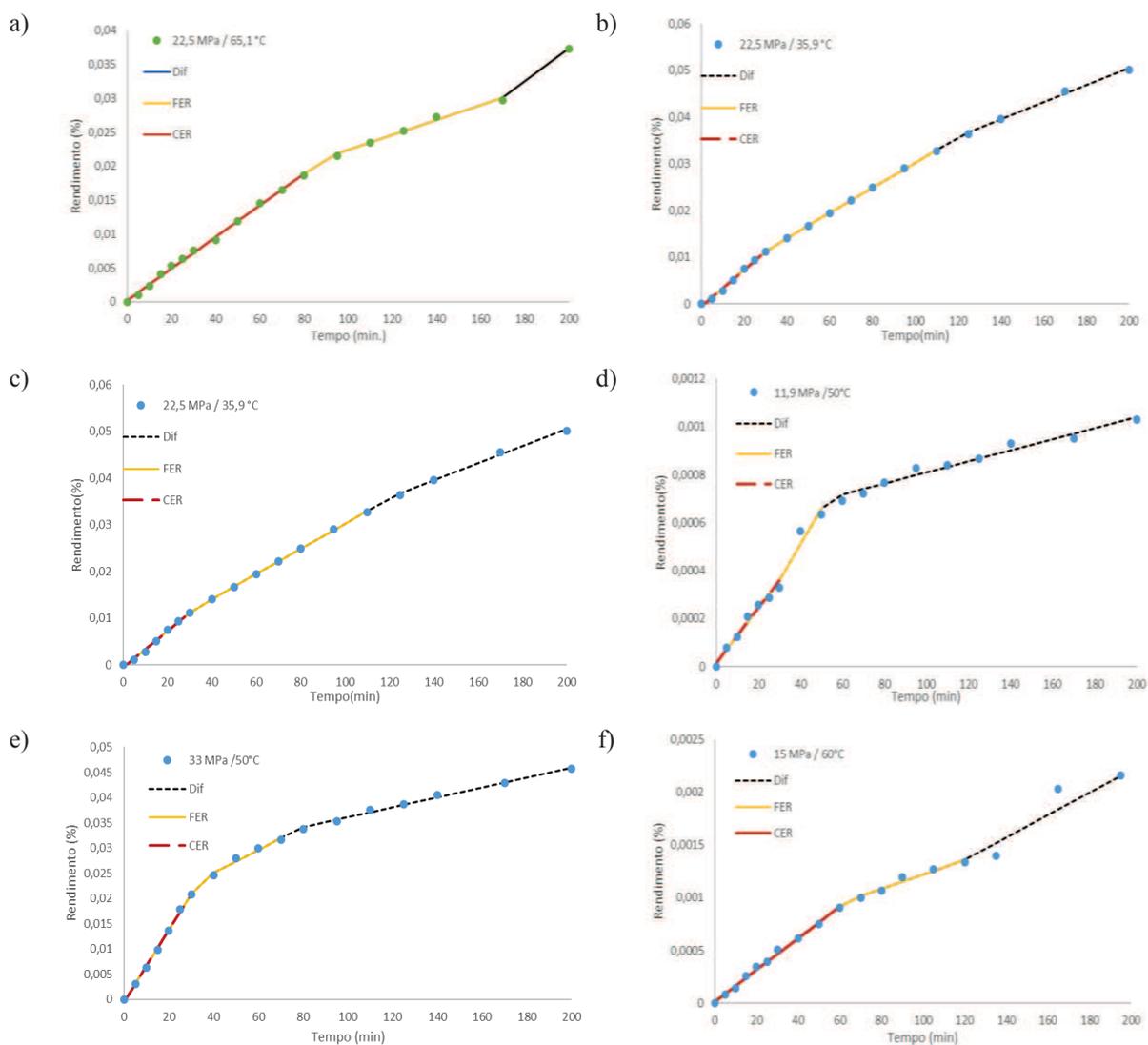
Em pressões acima de 22,5 MPa, Figura 9.a e 9.b a pressão de extração faz com que o rendimento de extração seja superior durante toda a extração. Possivelmente, por haver uma interação soluto/solvente facilitando a separação dos componentes acarretando uma possível alteração na eluição (CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001). Esta interação soluto/solvente é fortemente promovida pela proximidade entre as moléculas e, portanto, pela densidade da fase fluida. A densidade pode ser alterada pela variação da pressão e/ou temperatura (ROSA; MEIRELES, 2009; BRUN *et al.*, 2012). Em pressões muito elevadas, a maior influência na solubilidade é dada pela alteração da pressão de vapor do soluto com a temperatura, e não mais pela variação de densidade. Portanto, quanto maior a densidade, maior será o poder de extração de um fluido (REVERCHON *et al.*, 1995).

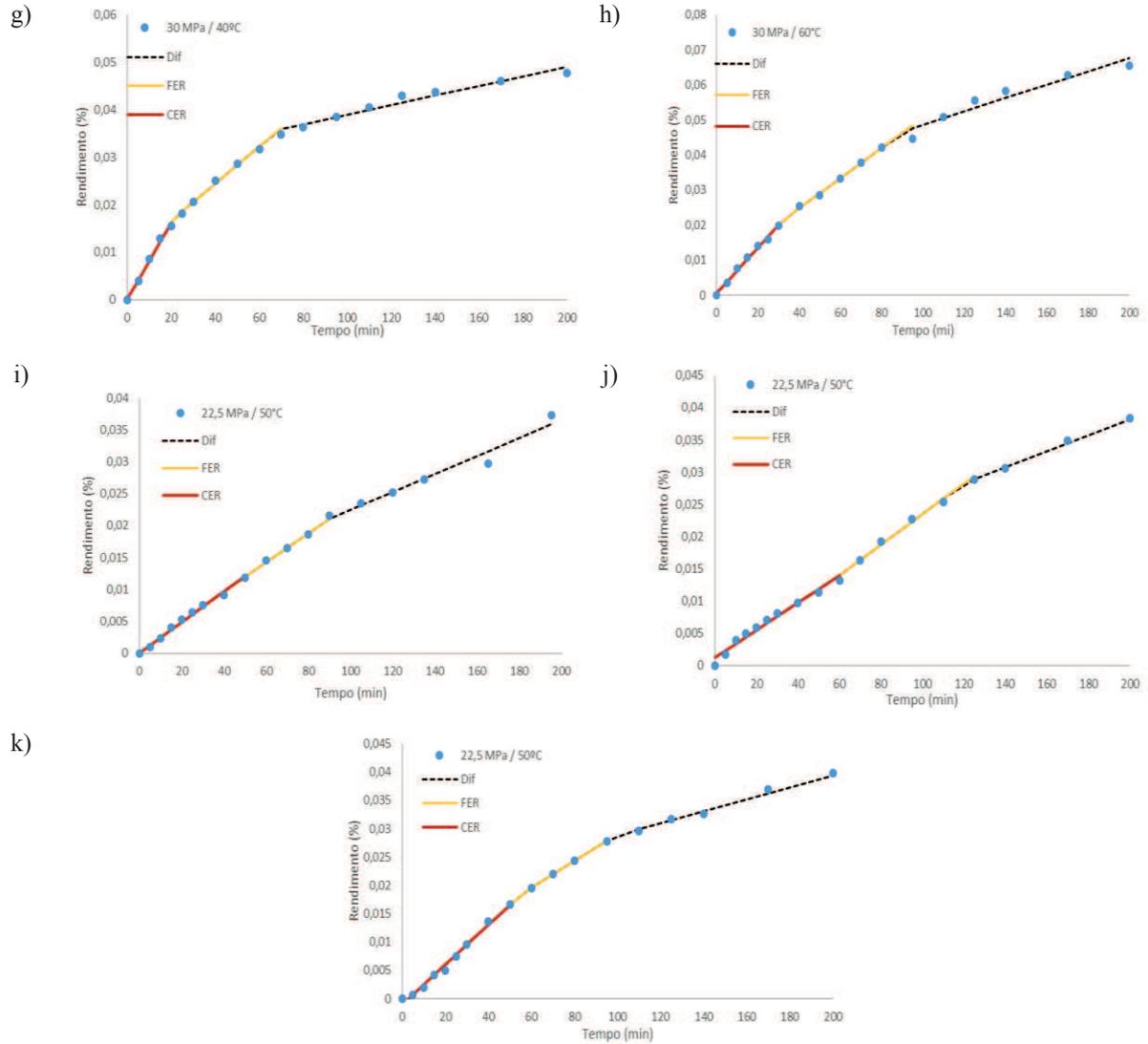
Já em relação a temperatura, observa-se que na condição intermediária de pressão (22,5 MPa) não é evidenciado o efeito da temperatura sobre as cinéticas (Figura 9.c). Na pressão de 15 MPa o rendimento de extração é diminuído quando a temperatura é aumentada. Já a 30 MPa o incremento da mesma favorece a obtenção de extratos da folha de erva-mate (Figura 9.a). A

temperatura apresenta efeito complexo tanto na densidade de CO₂ quanto na pressão de vapor do soluto, mas que converge ao maior rendimento quando maior a pressão do sistema (ZEKOVIĆ *et al.*, 2017). Ela tem relação sobre a solubilidade de compostos com maiores pesos moleculares, o que evidencia a importância do entendimento das interações soluto-soluto (PERRUT *et al.*, 1997). Resultados similares a estes foram relatados por Esmelindro *et al.* (2005).

A partir das cinéticas de extração os modelos cinéticos de primeira ordem (eq. 2) foram aplicados de acordo com o que foi proposto por Andrich *et al.* (2005) e ao modelo *Spline* (eq. 4, 5 e 6) propostos por Meireles (2008) expressos na Figura 10.

Figura 10-Cinéticas de rendimento de extração em diferentes condições de pressão e temperatura, delineadas de acordo com DCCR para ES-CO₂ aplicada a folhas de erva mate





Fonte: Autor (2019)

Os resultados foram obtidos a partir do ajuste dos modelos aos dados experimentais, e utilizados para a análise dos dados deste planejamento que estão apresentados na Tabela 8.

Considerando os experimentos realizados nesta etapa do trabalho, observa-se que no ensaio 11, o qual utilizou uma pressão de 22,5 MPa e 64,1 °C foi o que proporcionou o maior rendimento global (R_{∞}) de 8,88%. Porém, para o rendimento no período de taxa constante de extração (R_{CER}) o melhor resultado é observado para a temperatura de 50°C, ensaios 5,6 e 7.

Tabela 8-Matriz do planejamento experimental e seus respectivos resultados de rendimento na etapa de taxa constante (R_{CER}), constante cinética (k) e rendimento global (R_{∞}) da ES-CO₂ sobre folhas de erva-mate

Ensaio	X ₁ (Pressão, em MPa)	X ₂ (Temperatura, em °C)	R _{CER} (%)	k (10 ⁻³ min ⁻¹)	R _∞ (%)
1	-1 (15)	-1 (40)	0,39	15,232	0,90
2	-1(15)	+1(60)	0,10	4,231	0,36
3	+1(30)	-1(40)	1,72	18,606	4,76
4	+1(30)	+1(60)	2,17	9,504	7,81
5	0(22,5)	0(50)	1,25	4,038	6,63
6	0(22,5)	0(50)	2,92	4,212	6,74
7	0(22,5)	0(50)	1,84	7,639	5,12
8	-α (11,925)	0(50)	0,04	16,233	0,10
9	+α (33,075)	0(50)	2,37	18,587	4,44
10	0(22,5)	-α (35,9)	1,19	3,793	8,30
11	0 (22,5)	+α (64,1)	2,13	4,186	8,88

Fonte: Autor (2019)

Desta forma, os resultados da Tabela 8 foram submetidos a análise de variância para verificações dos efeitos significativos sobre as respostas, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - ANOVA do rendimento na etapa de taxa de extração constante (R_{CER}), constante de transferência de massa (k) e rendimento global (R_{∞})

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	P
Rendimento da taxa de extração constante (R_{CER})					
X ₁ (L)	5,631224	1	5,631224	27,08971	0,003453*
X ₁ (Q)	2,204192	1	2,204192	10,60354	0,022538*
X ₂ (L)	0,276201	1	0,276201	1,32870	0,301150
X ₂ (Q)	0,884620	1	0,884620	4,25558	0,094085
X ₁ ·X ₂	0,139692	1	0,139692	0,67201	0,449649
Resíduo	1,039366	5	1,039366		
TOTAL	9,570713	10			
Constante de transferência de massa (k)					
X ₁ (L)	0,000018	1	0,000018	1,37070	0,294447
X ₁ (Q)	0,000230	1	0,000230	17,57921	0,008549*
X ₂ (L)	0,000051	1	0,000051	3,86535	0,106461
X ₂ (Q)	0,000001	1	0,000001	0,08043	0,788085
X ₁ ·X ₂	0,000001	1	0,000001	0,06880	0,803552
Resíduo	0,000065	5			
Total	0,000398	10			

Rendimento global (R_{∞})					
X₁ (L)	38,0322	1	38,0322	14,55958	0,012428*
X₁ (Q)	33,6703	1	33,6703	12,88976	0,015704*
X₂ (L)	1,3821	1	1,3821	0,52912	0,499597
X₂ (Q)	2,9365	1	2,9365	1,12418	0,337529
X₁·X₂	3,2061	1	3,2061	1,22736	0,318348
Resíduo	13,0609	5			
Total	102,0837	10			

SQ: Soma dos quadrados, GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados; F: Fator de Fischer; p: nível de significância; X₁ Pressão (MPa); X₂ Temperatura (°C); L: Linear; Q: quadrático; *significativos.

A partir da ANOVA (Tabela 9) verifica-se que os apenas a pressão (X₁) teve efeito significativo, tanto linear, quanto quadrático, sobre as respostas, considerando um nível de significância de 5% (p<0,05). Entretanto, o efeito linear da temperatura (X₂ (L)) sobre o rendimento global e o efeito quadrático da temperatura (X₁ (Q)) na constante cinética, tiveram probabilidade de erro tipo I inferior a 10% (p<0,10).

Desta forma, a partir da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 8, os efeitos não significativos foram retirados do modelo estatístico, um a um, partindo daquele com maior probabilidade do erro Tipo I (p), avaliando o ajuste do modelo gerado a partir do coeficiente de determinação convencional (R^2) e ajustado ($R^2_{ajustado}$). O modelo foi definido, de acordo com o maior valor de $R^2_{ajustado}$, o que os levou a retirada de parâmetros. Os modelos estatísticos gerados a partir do planejamento proposto estão apresentados nas equações 15, 16 e 17, para rendimento na etapa de taxa de extração constante (R_{CER}), constante de transferência de massa (k) e rendimento global (R_{∞}), respectivamente.

$$R_{CER} = 2,285 + 0,839 \cdot X_1 - 0,626 \cdot X_1^2 - 0,3966X_2^2 \quad (15)$$

$$k = 0,0048 + 0,0014 \cdot X_1 + 0,0065 \cdot X_1^2 - 0,0025X_2 \quad (16)$$

$$R_{\infty} = 6,166 + 2,182 \cdot X_1 - 2,446 \cdot X_1^2 + 0,722X_2^2 + 0,895X_1 \cdot X_2 \quad (17)$$

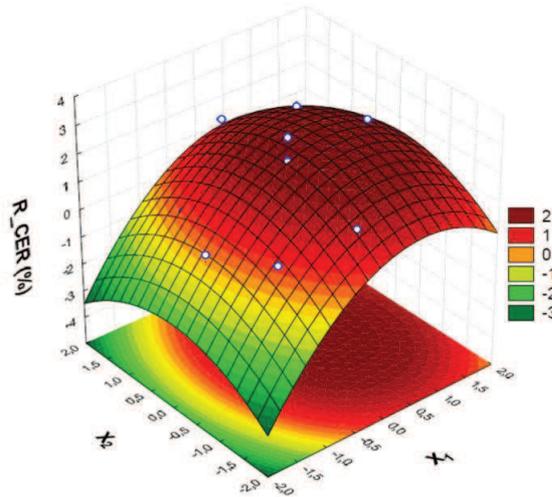
A Figura 11, apresenta as superfícies de resposta da extração supercrítica com CO₂ (ES-CO₂) das folhas de erva-mate para os parâmetros pressão e temperatura convergindo em rendimento global (R_{∞}), coeficiente de transferência de massa (k) e rendimento na etapa de extração constante (R_{CER}), obtidas a partir dos modelos estatísticos.

A resposta gerada pelo modelo de segunda ordem para o rendimento da taxa de extração constante (R_{CER}) estão apresentados na Figura 11.a. A respectiva equação (15) mostra que a pressão é um fator importante (X_1). O efeito linear da pressão (X_1) apresenta coeficientes positivos para todas as respostas, o que significa que pressões maiores produzirão maiores rendimentos.

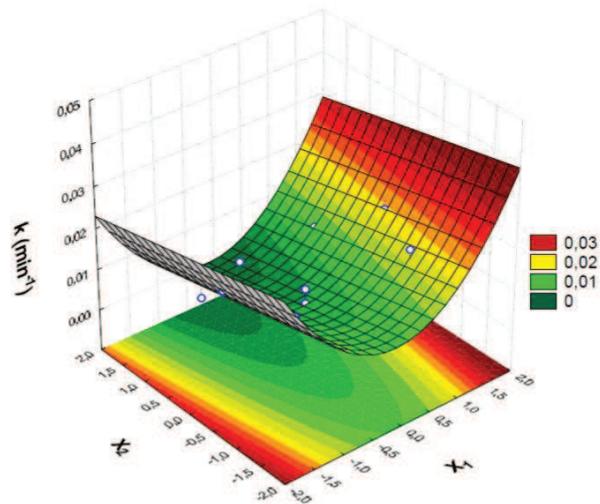
As linhas de contorno no alto da superfície, correspondem aos experimentos 4, 10 e 11 da Tabela 8, e mostram que os valores de R_{CER} preditos pelo modelo aumentam sensivelmente com aumento da pressão até um determinado ponto, entre 22,5 MPa e 30 MPa, caracterizando um domo na superfície de resposta, da Figura 11.a. Isso é característico do coeficiente relativo ao efeito quadrático da pressão (X_1^2) onde o autovalor é negativo. Conforme Perrut *et al.*, (1997), o incremento da pressão proporciona um aumento significativo no rendimento do extrato, principalmente de compostos de alto peso molecular, como aqueles que conferiram uma pigmentação amarela ao extrato. Da mesma forma, o valor negativo do efeito quadrático da temperatura (X_2^2) sugere a existência de ponto de ótimo próximo ao ponto central.

Figura 11- Superfície de resposta para ES-CO₂ para folhas de erva-mate para os parâmetros pressão (X_1) e temperatura (X_2) convergindo a) rendimento no período de taxa constante de extração (R_{CER}); b) constante de transferência de massa (k); c) rendimento global (R_{∞})

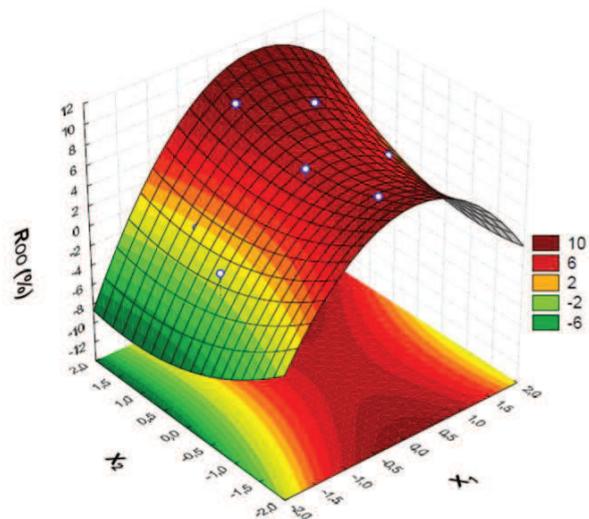
a)



b)



c)



Fonte: Autor (2019)

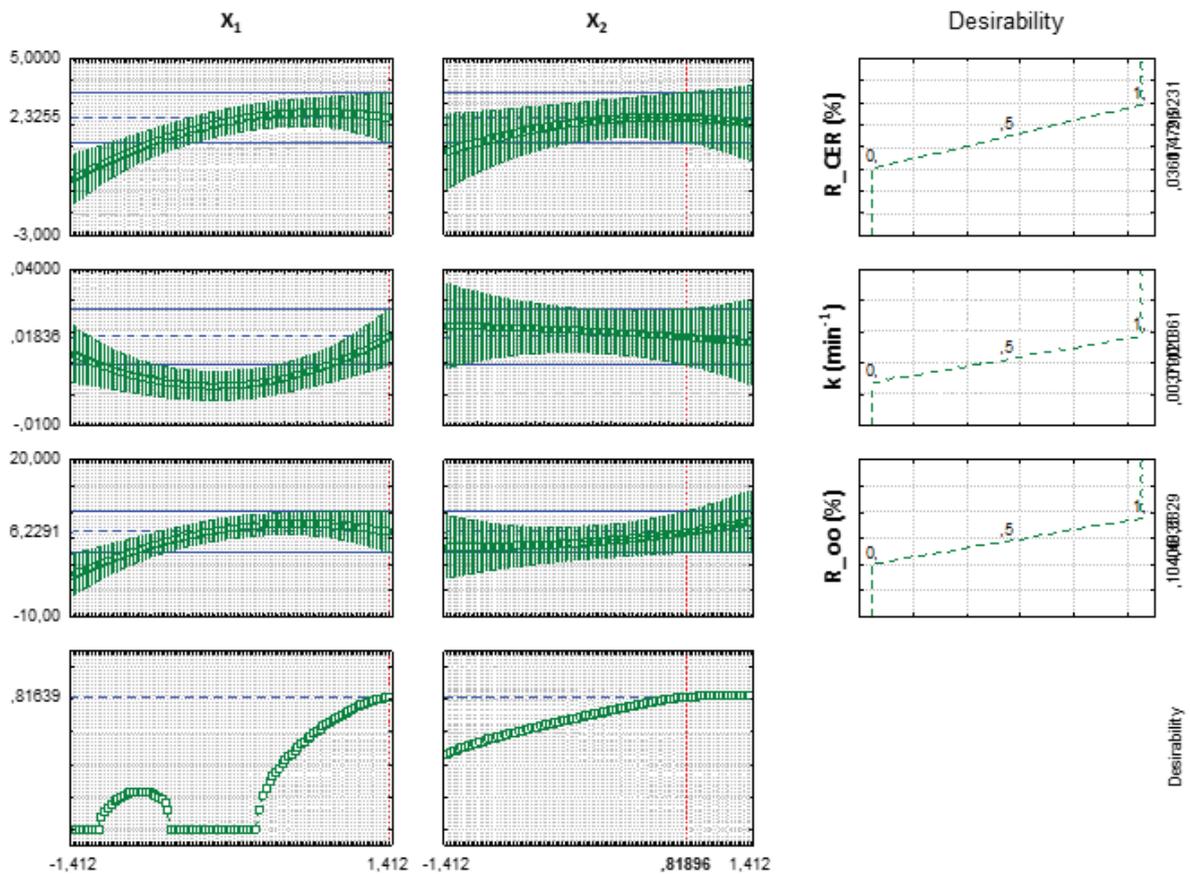
Para a constante cinética k , os valores positivos do efeito quadrático da pressão (X_1^2) configuram um vale para a superfície de resposta da Figura 11.b., que indica um ponto de resposta mínima, e quer dizer que com regiões extremas do planejamento a velocidade de extração é maior. Já os efeitos lineares da pressão e temperatura (X_1 e X_2 , respectivamente) indicam que o aumento da pressão e a redução da temperatura podem favorecer a velocidade de extração.

Ao comparar a Figura 11.a com a Figura 10.c, observa-se que a temperatura exerce influência contrária sobre o rendimento global (R_∞) e o rendimento da etapa de taxa constante (R_{CER}). Enquanto um domo é formado na primeira, um vale é formado na segunda, demonstrando que para R_{CER} as condições extremas são ruins e para R_∞ são boas. Por isso o X_2^2 da equação 15 é negativo e da equação 17 é positivo.

Operar o equipamento em uma região com baixas temperaturas obtendo um bom rendimento acarreta na garantia da integridade das substâncias termossensíveis. Desse modo, a extração supercrítica com CO_2 pode apresentar grande vantagem em relação aos métodos convencionais, nos quais algumas vezes, obrigatoriamente, devem ser usadas altas temperaturas. Ainda, com emprego de temperaturas brandas, o consumo de energia é menor o que representa uma consideração econômica e ambiental a ser analisada.

Através da análise das curvas de nível, ficou evidente que o modelo desenvolvido não é linear. Além disso, as condições ótimas são diferentes para cada uma das respostas analisadas e, também, as variáveis afetam de forma diferente cada uma delas. Com isso, buscou-se uma técnica que se adaptasse a essas condições de otimização, sendo utilizada a função de desejabilidade do programa STATISTICA 7.0, que permite, obter os valores de ótimo dos parâmetros investigados. O objetivo para aplicar essa ferramenta, foi encontrar condições que garantam a conformidade com os critérios de todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, fornece o melhor valor na resposta conjunta sendo esse valor o mais desejável. Isto é, conseguir converter as múltiplas variáveis respostas em uma única, combinando as respostas individuais em uma função composta, seguida por sua otimização (VERA CANDIOTI *et al.*, 2014). A Figura 12, mostra os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e os valores otimizados para os dois parâmetros experimentais da extração supercrítica com CO_2 obtidos para folhas de erva-mate. **-Perfis de desejabilidade da correlação das variáveis pressão e temperatura e suas respectivas respostas R_{CER} , k e R_∞**

Figura 12- Perfis de desejabilidade da correlação das variáveis pressão e temperatura e suas respectivas respostas R_{CER} , k e R_{∞}



Fonte: Autor (2019)

Sendo: X_1 : Pressão; X_2 : Temperatura; rendimento na etapa CER (R_{CER}); etapa constante de transferência de massa (k); no rendimento global (R_{∞}); perfil de desejabilidade quarto gráfico de X_1 e X_2 .

Observando a Figura 12, utilizando a metodologia de otimização simultânea, verificou-se que a linha 1, 2 e 3 representa os perfis da variação do rendimento na etapa CER (R_{CER}), na constante de transferência de massa (k) e no rendimento global (R_{∞}) em função da pressão e da temperatura. A quarta linha mostra os perfis de desejabilidade com valor de 0,81639, que é aceitável ($0 \leq d_i \leq 1$). Quanto maior o valor de D , mais conveniente é a resposta do sistema, ou seja, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo de D é a condição otimizada do sistema. As linhas verticais em vermelho, presentes nos gráficos, correspondem aos valores ótimos dos parâmetros estudados e estão localizados próximos aos níveis superiores, os valores em negrito são significativos em um nível de confiança de 95%. A Tabela 10 apresenta os valores codificados e reais das condições otimizadas pela função desejabilidade.

Tabela 10- Parâmetros investigados e seus respectivos valores otimizados

Parâmetros	Valores Otimizados	
	Codificados	Reais
X ₁ - Pressão (MPa)	+1,412	32 MPa
X ₂ - Temperatura (°C)	+0,818	58,2 °C
R _{CER} (%)		3,69
k (min ⁻¹)		0,0088
R _∞ (%)		8,78

Fonte: Autor (2019)

Fernandes *et al.* (2017) obtiveram 1,51% rendimento global de ES-CO₂ com frutos em condições de 25 MPa e 35°C. Os resultados inferiores de rendimento, quando aos obtidos neste trabalho podem ser atribuídos ao fato dos autores não terem estudado pressões superiores a 25 MPa. Conforme podemos observar na Figura 10.a, que os maiores rendimentos foram acima desta pressão em temperatura semelhante.

Czaikoski *et al.* (2015) aplicaram a extração usando CO₂ supercrítico e propano comprimido em flores de *Eupatorium intermedium*. A pressão e temperatura foram avaliadas nas faixas de 15 a 25 MPa e 30 a 80 °C. O rendimento máximo de extração foi de 5,85% a 25 MPa e 80°C. Vieitez *et al.* (2018) obtiveram rendimento máximo de extração supercrítica com CO₂ para folhas de erva-mate de 1,4 % a 30 MPa e 1,5 % a 40 MPa ambos a 50°C.

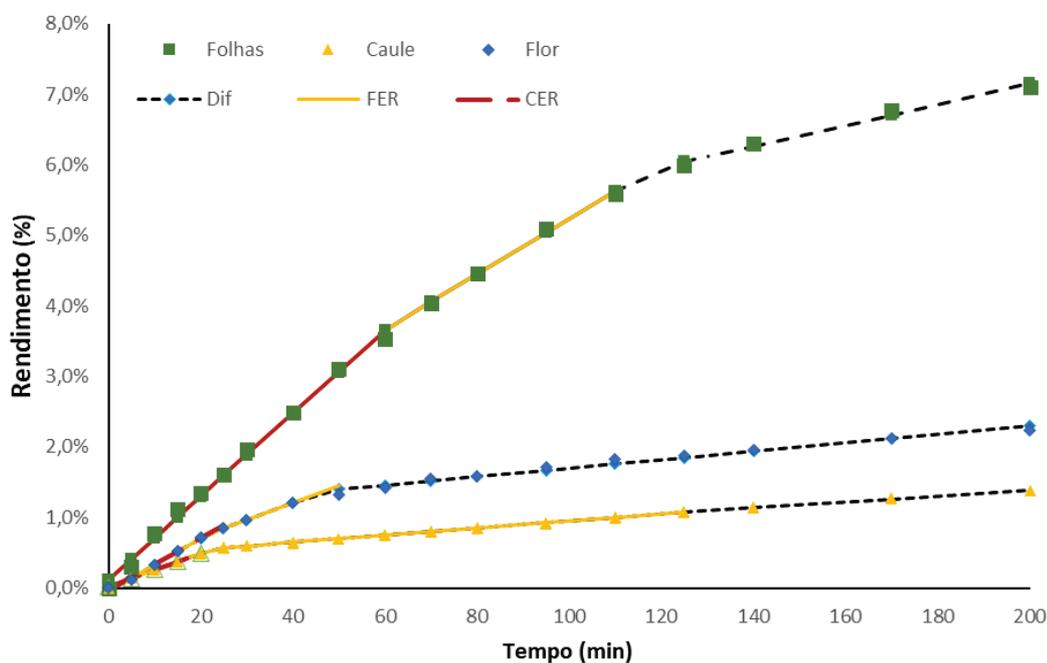
No estudo realizado por Zekovi'c *et al.* (2017), o principal objetivo foi a modelagem matemática e simulação numérica do processo de extração com fluido supercrítico de sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.). A avaliação das curvas de extração forneceu dados sobre os efeitos dos parâmetros da extração supercrítica (pressão, temperatura e vazão de CO₂) no rendimento total da extração. As condições de extração supercrítica otimizadas para a taxa inicial de extração, fase de extração controlada pela solubilidade, foi a pressão de 20 MPa, temperatura de 40 °C e taxa de fluxo de CO₂ de 0,4 kg / h. Como esperado, o efeito pressão foi mais pronunciado, causando aumento do rendimento com o aumento da densidade de CO₂. A temperatura apresentou efeito complexo tanto na densidade de CO₂ quanto na pressão de vapor do soluto e a vazão teve significância em menores pressões, mas com convergência de maior rendimento quando maior o fluxo de solvente.

4.2 CINÉTICAS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em características do material e em parâmetros de processo (MARTÍNEZ; VANCE, 2007). Entre os parâmetros de processo destaca-se o tempo de operação. Nele, as condições otimizadas de pressão (32 Mpa) e temperatura (58°C) foram aplicadas para extração de compostos de caules e flores da erva mate. Após realização dos experimentos e obtenção das respostas o modelo *Spline* (eq. 4, 5 e 6) foi ajustado aos pontos experimentais de rendimento.

As curvas cinéticas mostradas na Figura 13, representam que a maior taxa de extração e o maior rendimento de extração por extração supercrítica com CO₂ foi das folhas seguido das flores e caules.

Figura 13-- Curvas cinéticas de extração supercrítica nas condições otimizadas (32 MPa e 58°C) de folhas, caules e flores de erva-mate e as respectivas etapas de transferência de massa: CER: taxa constante (convectivo), FER: taxa decrescente e Dif: difusão constante



Fonte: Autor (2019)

As curvas obtidas para a extração, ilustraram as três fases (comportamento típico de curvas de extração). O primeiro passo da curva indica a taxa de extração constante (CER) e a segunda etapa, uma taxa de extração decrescente (FER). Além disso, o terceiro passo demonstra a difusão controlada (Dif), que é lenta, e o mecanismo de extração governante é a difusão. A

intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período de taxa constante de extração (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e terceira reta determina o final do período de taxa decrescente de extração (t_{FER}), onde a partir deste ponto inicia-se o período de extração controlado pela difusão (DC). Quando o material possui alto conteúdo de extratíveis, a transferência de massa ocorre predominantemente em velocidade constante, sendo a velocidade de extração controlada pela solubilidade do substrato no solvente (MUKHOPADHYAY, 2000). Outros pesquisadores observaram a mesma tendência aplicado a extração supercrítica em plantas (MESOMO *et al.*, 2012; CZAIKOSKI *et al.*, 2015).

Observa-se também que é no momento inicial da extração a maior quantidade de obtenção de extrato. Isto se deve, ao fluido supercrítico que flui continuamente através das partículas, arrastando os componentes extraíveis devido ao efeito da convecção. Por isso, neste intervalo, se obtém compostos de maior peso molecular contidos na superfície da planta, conforme sugere Reverchon, (1997) e Rai; Mohanty; Bhargava, (2016). A Tabela 11, apresenta os parâmetros cinéticos de extração.

Tabela 11- Parâmetros cinéticos do modelo Spline aplicados as cinéticas de extração supercrítica de folhas, caules e flores de erva-mate

Matéria Prima erva mate	Folhas	Caule	Flor
R_{∞} (%)	8,78	1,27	2,17
b_0 (g/g)·10³	1,213	0,170	-0,359
b_1 (g/g·min)·10³	3,72	1,51	2,33
b_2 (g/g·min)·10³	-1,24	-1,19	-1,14
b_3 (g/g·min)·10³	-1,542	-0,069	-0,822
t_{CER} (min)	60,59	22,69	23,89
t_{FER} (min)	117,91	133,34	66,30
Y_{CER} (g extrato/g CO₂)·10³	3,84	1,56	2,23
R_{CER} (%)	3,69	0,56	0,85
QM·10⁷	7,14	20,3	2,08
R^2	0,999	0,999	0,997

Fonte: Autor (2019)

No caso das folhas de erva-mate, o rendimento de extração aumenta gradativamente com o decorrer da extração, atingindo 3,69% aos 60 min de extração (Tabela 11). Este valor coincide com o valor predito pelo modelo estatístico (Tabela 9) e corresponde ao rendimento da etapa convectiva (CER), sendo cerca de 44% dos compostos passíveis de serem extraídos nesta condição. No caso dos caules e das flores o rendimento da etapa convectiva (CER)

corresponde a 0,56% (após 22 min) e 0,85% (após 23 min), respectivamente, demonstrando que esta etapa corresponde a extração de em torno de 45% dos compostos extraíveis da erva mate por CO₂ supercrítico.

Além disso, verifica-se que as duas primeiras etapas da curva de extração (CER e FER) representam mais de 70% do rendimento global, sendo que aproximadamente 40% da eficiência do processo é devida à etapa de taxa constante de extração (CER) e o restante a taxa decrescente (FER). Estes resultados estão no intervalo de rendimentos sugerido por Pereira; Meireles (2010) e Jesus *et al.* (2013), ao justificar a relevância no período CER, uma vez que os fenômenos ocorrem ao longo do processo, assim como as características da matéria-prima, podem ser explicados pelo modelo.

Os valores de t_{CER} e R_{CER} representam aproximadamente o tempo mínimo que um ciclo SFE deve durar e o rendimento mínimo de extração esperado em uma dada condição de processo (MEIRELES, 2008). Com esses parâmetros inicial pode-se prever o *scale-up* e a viabilidade econômica do processo pode ser investigada, fazendo a estimativa do custo de fabricação, como descrito por Rosa e Meireles (2005). O parâmetro t_{CER} , pode ser usado como uma estimativa inicial do tempo de ciclo quando se realizam investigações exploratórias sobre a viabilidade econômica do processo extração supercrítica.

Já a relação mássica de extrato obtido por solvente utilizado no período da etapa constante de extração a taxa constante (Y_{CER}) é de $3,84 \times 10^{-3}$ g/g para as folhas, $2,23 \times 10^{-3}$ g/g para as flores e $1,56 \times 10^{-3}$ g/g para os caules. Este é um importante parâmetro no dimensionamento de sistemas de extração, pois está associado com o consumo de solvente pela planta de extração. Valores de Y_{CER} , R_{CER} e t_{CER} para diferentes materiais são apresentados na Tabela 12, onde destaca-se que a erva-mate possui valores típicos observados na literatura.

Tabela 12- Comparativo dos parâmetros t_{CER} , R_{CER} e Y_{CER} com a literatura

Matéria-prima	t_{CER} (min)	R_{CER} (%)	Y_{CER} (g/g CO ₂). 10 ³	Referências
Folhas erva-mate	60,59	3,69	3,84	Este trabalho
Caule erva-mate	22,69	0,56	1,56	
Flor erva-mate	23,89	0,85	2,23	
Farelo de arroz	70	9,4	3,98	Jesus <i>et al.</i> (2013)

Em relação aos coeficientes de transferência de massa, o coeficiente b_1 apresentou a mesma grandeza para os diferentes materiais (10⁻³). Os valores negativos de b_2 indicam uma redução da taxa de extração, proporcional entre as folhas, caules e flores. Já o valor de b_3 é, em módulo, duas ordens de grandeza maior para as folhas que para os caules, indicando que a etapa

difusiva na folha é mais predominante e importante que no caule ou que nas flores. Este perfil é característico quando já não há material extratável disponível e o arraste de extrato é menor devido a transferência de massa ser menor.

A extração com fluidos supercríticos é uma operação unitária por contato que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos. (PEREDA; BOTTINI; BRIGNOLE, 2008) O rendimento tende a ser maior para s flores devido a maior presença de lipídeos.

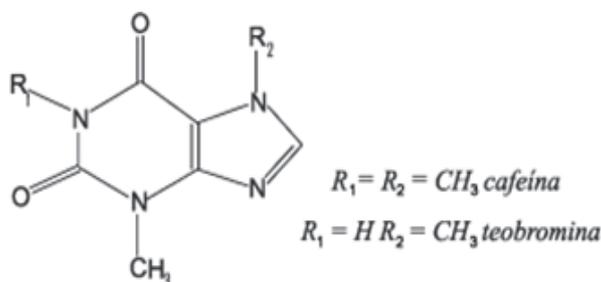
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS

Em complementação ao estudo de otimização do processo de extração, os extratos também foram caracterizados com relação a presença de terpenos, e sua indicação de respectiva atividade antioxidante, e quantitativamente quanto a concentração de compostos fenólicos presentes.

4.3.1 Caracterização de Grupamentos Funcionais por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

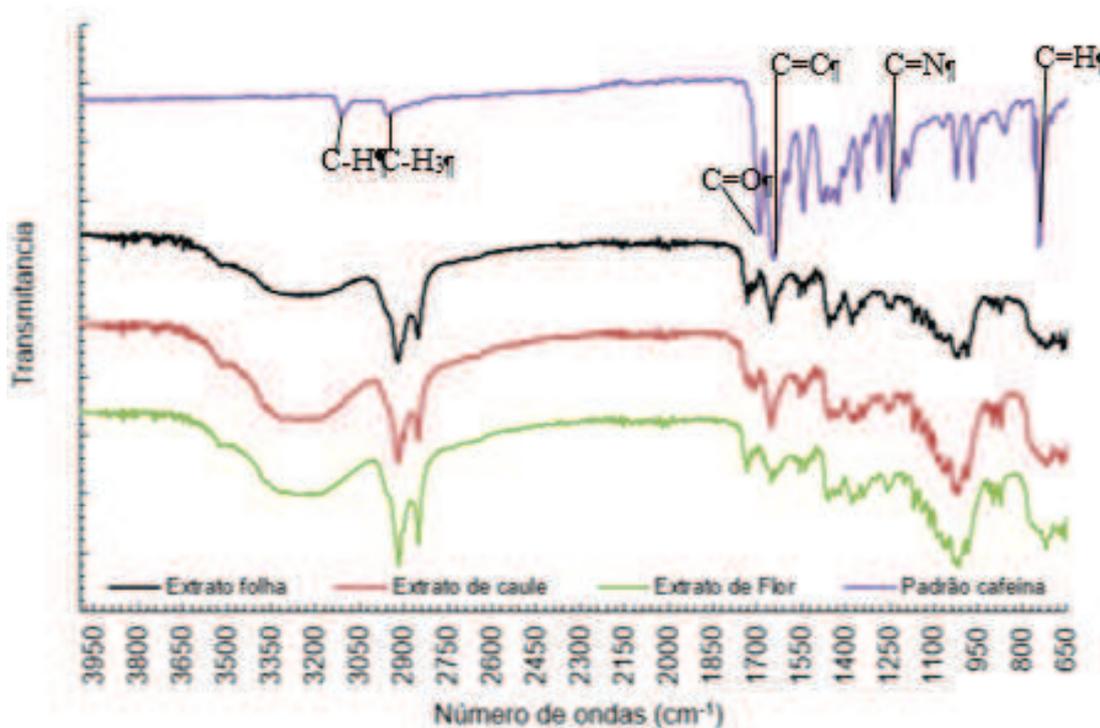
A cafeína é um alcaloide, identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina (Figura 14), e radicais semelhantes da teobromina, o que caracteriza a migração dos elementos na quantificação cafeína-teobromina. A Figura 15 apresenta os espectros de infravermelho, para os comprimentos de onda obtidos por FTIR, tanto para o padrão cafeína quanto para os extratos obtidos das folhas, caule e flor da erva-mate.

Figura 14-Estrutura química da cafeína e teobromina



Fonte: Adaptado de De Maria; Moreira (2007)

Figura 15-Espectro dos extratos ES-CO₂ das folhas, caules, flores e frutos da erva mate



Fonte: Autor (2019)

De acordo com os espectros de FTIR apresentados na Figura 15, observa-se na banda de 2952 cm^{-1} refere a ligação C-H da cafeína (R1 e R2). Para os extratos desta ligação é observado em 2920 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} e 2916 cm^{-1} para os obtidos de folhas, caules e flores, respectivamente. Em 2849 cm^{-1} tem-se o grupamento metil (CH_3), que para o extrato das folhas que ficou em 2851 cm^{-1} . Em 1692 cm^{-1} de comprimento de onda observa-se a ligação C=O, que para os extratos é observado em 1733 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} para os obtidos de folhas, caules e flores, respectivamente, estes picos apresentam espectros de intensidade média – forte.

Em 1643 cm^{-1} observa-se a ligação C=C para a cafeína, para os extratos de folhas, caules é observado para ambos em 1653 cm^{-1} e para as flores em 1634 cm^{-1} . Os espectros apresentaram ainda bandas em torno de 1356 cm^{-1} , características de deformação angular C-H (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Porém comparando os espectros, observou-se estas pequenas diferenças na forma, assim como na intensidade de algumas bandas, e isso se deve às interações presentes nas misturas.

O número de onda 1237 cm^{-1} se refere a ligação de C-N, sendo 1257 cm^{-1} para o extrato das folhas e 1259 cm^{-1} para caule e flor de erva-mate.

A ligação C=O apresenta os comprimentos de onda próximos tanto para cafeína quanto para os extratos, dentro da faixa de 1023-1028 cm^{-1} . E por fim a ligação C-H com intensidade fraca para cafeína em 859 cm^{-1} , com deslocamento para os extratos em 773, 760 e 767 cm^{-1} para folhas, caule e flor respectivamente.

Ao analisar os espectros, observou-se que o espectro da cafeína é muito semelhante aos espectros obtidos dos extratos da erva-mate. Além disso, a semelhança de estrutura química entre teobromina e cafeína, componente presentes nos extratos, sugere os deslocamentos de bandas. Em contrapartida, a redução da intensidade dos picos, em relação a linha de base é devido a presença de outras substâncias nos extratos, diluído as metilxantinas cafeína e teobromina.

4.3.2 Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram avaliadas as composições químicas dos extratos e suas matérias-primas antes e pós a extração supercrítica com CO_2 quando obtidas sob condições ótimas (32 MPa e 58°C). Os resultados obtidos das análises quantitativas CLAE para folhas, caules e flor de erva-mate é apresentado no APENDICE F respectivamente.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos das análises quantitativas CLAE. Foram avaliadas as composições químicas dos extratos e suas matérias-primas antes e após a extração supercrítica com CO_2 obtidas sob condições ótimas (32 MPa e 58 °C).

Os cromatogramas para folhas, caule e flores expressam similaridade dos picos, com diferentes áreas. De acordo com a caracterização cromatográfica a cafeína e teobromina como pode ser observado na Tabela 13, se destacaram em todas as amostras, sendo os dois alcaloides da família das metilxantinas.

A cafeína possui diversos benefícios principalmente com efeito estimulante cerebral, essa técnica mostrou-se extremamente promissora quando objetiva-se obter extratos com alta concentração de cafeína. Especialmente nas flores que há maior número de compostos representados pelos picos adicionais.

Os cromatogramas para as flores antes e pós extração apresentaram mais picos que as folhas e caules. Isso indica que as flores têm mais compostos químicos que as folhas. No extrato de flores de erva-mate, o composto majoritário a cafeína, foi encontrado 2 vezes mais que em folhas. Porém, as quantidades encontradas de ácido clorogênico não estão apresentadas, por apresentar uma área supraquantificada, devido a sobreposição de substâncias que eluem no

mesmo tempo de retenção, revelados pela pureza do pico calculada pelo software do detector PDA. Para resolver isso, a amostra tinha que ser purificada, porém a pequena quantidade de amostra coletada impossibilitou de refazer a análise.

Tabela 13-Conteúdo de metilxantinas e polifenóis, presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES-CO₂ de pressão 32 MPa, temperatura 58 °C

Componente	Folha	Caule	Flor
Cafeína (mg / g)			
In natura	9,287 ^a ±0,19	2,265 ^a ±0,315	61,814 ^a ±2,202
Após Extração	2,346 ^b ±0,046	2,693 ^a ±0,129	39,99 ^a ±3,366
Extrato 10 min	35,541 ^c ±0,218	63,995 ^b ±<0,001	43,096 ^b ±1,196
Extrato 1h 40 min	17,896 ^d ±0,438	-	-
Teobromina (mg / g)			
In natura	14,917 ^a ±1,769	7,299 ^a ±0,716	137,483 ^a ±3,661
Após Extração	7,076 ^a ±1,483	7,526 ^a ±0,228	99,893 ^a ±59,903
Extrato 10 min	5,483 ^a ±0,024	9,64 ^b ±<0,001	48,032 ^a ±11,586
Extrato 1h 40 min	6,431 ^b ±1,483	-	-
Catequina (mg / g)			
In natura	NI	NI	136,079±6,282
Após Extração	NI	NI	145,756±50,88
Extrato	NI	NI	NA
Epicatequina (mg / g)			
In natura	NI	NI	5,569±0
Após Extração	NI	NI	NI
Extrato	NI	NI	NA
Rutina			
In natura	NI	NI	8,415±0,129
Após Extração	NI	NI	6,805±0,086
Extrato	NI	NI	NA

*NA: Não foi possível aplicar essa metodologia ao extrato das flores de erva-mate. NI: não identificado

Fonte: Autor (2019)

Avaliando as amostras das folhas de erva-mate, todas são diferentes entre si a nível 95% de confiança. Quando observamos os extratos que foram coletados em períodos diferentes de extração, 10 min e 1h e 40min., notamos uma redução de 48% na concentração de cafeína. Isso ocorreu devido a atuação da taxa difusiva no período do segundo extrato coletado. Podemos acrescentar, que com isso os aspectos visuais também mudam quanto a cor, que passou de amarelo claro para cor mostarda escura e a viscosidade que passou de uma viscosidade inicial

com formação de fios e final com formação de grânulos. Assim, acredita-se que com na etapa difusiva a cafeína estava próxima ao esgotamento na matéria prima, o CO₂ buscou extrair outros compostos bioativos.

Os extratos obtidos via extração supercrítica são puros, concentrados, e apresentaram em todas as partes da planta da erva-mate quantidades de 35,54 a 63,99 mg de cafeína por g de extrato e 9,64 a 48,03 mg de teobromina por g de extrato, predominando as maiores concentrações de cafeína nos caules e teobromina nas flores. Este comportamento condiz com o que foi relatado por Cassel *et al.* (2010), que associa a extração supercrítica com CO₂ com potencial a descafeinação, quando apresentar maior concentração de cafeína nos extratos que na matéria-prima pós – extração. Os valores obtidos no extrato de erva-mate representam cerca 250 vezes mais concentrados que o obtido por Cardozo Junior *et al.* (2003), onde a maior concentração de cafeína obtida foi de 0,27 mg de cafeína por g de extrato de erva-mate também utilizando a extração supercrítica. Assim, a condição de temperatura e pressão de extração supercrítica otimizada pode ter colaborado com a obtenção de extratos mais concentrados.

Grande parte deste alcaloide a cafeína, é considerado um estimulador orgânico, habitualmente ingerido na forma de bebidas. Uma xícara de café pode conter em média de 80 mg de cafeína, enquanto uma lata de refrigerante cola tem em torno de 30 a 41 mg (ANDRADE *et al.*, 1995; MCNERNEY; COAD; BURKARD, 2014). Conforme Saldaña *et al.* (1999), Esmelindro *et al.* (2004), Cassel *et al.* (2010), Dartora *et al.* (2011), Fernandes *et al.* (2016) e Fernandes *et al.* (2017), a tecnologia de extração com CO₂ supercrítico aplicada a erva-mate tem maior seletividade para cafeína seguido de teobromina. Os resultados alcançados neste trabalho sugerem que a solubilidade é definida como a máxima concentração de soluto (erva-mate) dissolvido na fase solvente (GUPTA; SHIM, 2007). A cafeína possui uma interação solvente-soluto menos energética do que a teobromina, isto é, a cafeína possui um menor benefício energético para os solventes pertencentes a primeira camada de solvatação. Apesar disso, a solubilidade da cafeína é pelo menos duas ordens de grandeza superior da teobromina, reforçando a tese de que as solubilidades dessas dimetilxantinas são dependentes das interações soluto-solvente (SALDAÑA *et al.*, 1999).

A extração supercrítica pode ser considerada um dos novos métodos de extração potencialmente útil na obtenção de compostos de alto valor agregado, por fornecer extratos livres de solventes e sem o risco de degradação térmica. A seletividade do processo de extração supercrítica pode ser manipulada pela escolha do solvente, pelo controle da pressão e da temperatura do processo, fluxo de solvente e ainda, pelo uso de cossolventes (AGHEL *et al.*, 2004).

4.3.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante por FRAP e Determinação de Fenólicos Totais (FT)

Existem duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas que podem apresentar vários graus de substituintes alquila e são adicionados às matrizes sem a intenção de nutrir, mas de retardar o aparecimento de alterações oxidativas no alimento (BRASIL, 1997). Enquanto que os antioxidantes naturais podem ser sintetizados, mas sua obtenção deve ser de fontes naturais. Dentre os antioxidantes naturais destacam-se compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis (ARAÚJO, 2004). Avaliação do potencial redutor do ferro e a determinação dos fenóis totais (FT), são expressos na Tabela 14.

As amostras foram avaliadas quanto a capacidade de redução através do seu potencial antioxidante (FRAP). Os potenciais antioxidantes dos extratos de folhas, caules e flores da erva-mate foram estimados por sua capacidade de reduzir, o ferro ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) e não na captura de radicais livres como outros métodos tradicionais (MOTTA *et al.*, 2013).

Tabela 14- Concentração de fenólicos totais e ação antioxidante presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES-CO₂ de pressão 32 MPa, temperatura 58°C

Composto/Amostra	Folhas	Caule	Flor
Fenólicos Totais ($\mu\text{g. g amostra}^{-1}$)			
In natura	1,058±0,144	0,48±0,051	0,914±0,029
Após extração	0,838±0,026	0,509±0,013	0,042±0,012
Extracto	0,254±0,122	0,101±0,025	0,249±0,046
FRAP ($\mu\text{g. g amostra}^{-1}$)			
In natura	10,618±0,15	20,263±5,06	9,845±1,785
Após extração	19,765±1,858	11,203±1,803	14,746±1,684
Extracto	1,557±0,121	4,100±0,517	1,676±0,062

Fonte: Autor (2019)

Esta técnica é a mais específica para erva-mate, pois consegue discriminar os tratamentos, havendo uma correlação da técnica de FRAP para polifenóis e flavonoides por serem mais eficazes a antioxidantes lipofílicos (por exemplo, tocoferóis, esqualeno). Os

extratos das folhas, caules e flores de erva-mate, quanto ao potencial antioxidante obtiveram valores de 1,676 a 4,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, sendo que o extrato do caule apresentou o maior valor de atividade antioxidante. Observa-se também que em duas situações há um aumento na atividade antioxidante presente na matéria-prima pós-extração das folhas e flores. Isso ocorreu devido as matérias primas permanecerem a 58°C por 200 min durante a extração, ocasionando uma ativação na ação antioxidante pela permanência.

Para a presença de fenólicos totais os extratos supercríticos de folhas, caule e flores de erva-mate, apresentam valores de 0,101 a 0,254 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de extrato, sendo o maior valor para o extrato das folhas seguido das flores de erva-mate. Mesa *et al.*, (2002) afirmam que os flavonoides estão presentes em quase todas as plantas, principalmente nas partes aéreas, mas variam qualitativamente de uma planta para outra. Rufino *et al.*, (2010) classificam o teor de polifenóis em três categorias: baixo (< 10 mg/g), médio (10-50 mg/g) e alto (> 50 mg/g), baseadas em material vegetal seco. Desta forma, considera-se baixa a concentração de fenólicos totais presentes nos extratos supercríticos de erva-mate. Porém, Fernandes *et al.* (2017) obtiveram valores de compostos fenólicos totais em torno de 0,09 mg/g, sendo aproximadamente 2,5 vezes inferior aos extratos de folhas e flores de erva mate deste trabalho.

Comparando as matérias-primas *in natura* com os extratos, tanto para as folhas, os caules e flores, pode ser observado uma queda de 73,9% para antioxidantes e 83,2% fenólicos totais. De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade, por isso os extratos apresentam valores inferiores devido a afinidade do CO₂ a compostos apolares. Assim é importante salientar, a característica de solubilidade dos fenólicos presente neste extrato, onde o caráter hidrofílico de tais substâncias melhora significativamente a resposta à oxidação. Este fato foi observado por Porter (1993), que descreveu o “paradoxo antioxidante” como um fenômeno no qual sequestradores de radicais livres hidrofílicos são antioxidantes mais efetivos do que os sequestradores de radicais livres hidrofóbicos em emulsões de óleo (MOREIRA, 1999).

Os conteúdos de compostos fenólicos reportados na literatura, por métodos convencionais de extração aquosa, variam de 75,9 a 88,5 mg.g⁻¹ de erva-mate (TURNER *et al.*, 2011), 80-95,9 mg.g⁻¹ de extrato (DONADUZZI *et al.*, 2003). Isto faz com que se compreenda a afinidade do CO₂ com os compostos apolares e justifica o uso de cossolventes para a potencialização quando a busca é por compostos polares.

5 CONCLUSÃO

A técnica de extração supercrítica com CO₂ foi aplicada para especialmente para compostos de média polaridade de diferentes partes da erva-mate. As condições de extração sobre as folhas de erva-mate foram otimizadas em 32 MPa e 58°C, obtendo-se valores ótimos de rendimento da etapa de taxa constante, constante cinética de extração e rendimento global de 3,69 %, 0,0088 min⁻¹ e 8,78%, respectivamente.

As condições otimizadas de extração foram aplicadas para a obtenção de extratos de caules e flores de erva-mate, obtendo-se rendimentos globais de 1,37% e 2,24%, respectivamente.

As cinéticas de extração foram avaliadas através do modelo *spline*, que considera três etapas de transferência de massa. O modelo ajustou-se adequadamente aos dados experimentais, apresentando coeficientes de determinação (R²) superiores a 0,99. O tempo da etapa de taxa constante (CER) foi determinado entre 23,7 e 60,6 min, sendo esta etapa responsável pela obtenção de 40 % do extrato.

A caracterização dos extratos mostrou que o CO₂ tem maior seletividade para a extração de cafeína e teobromina. Os extratos de flores, caules e flores apresentaram 35,5 e 5,5 mg/g, 63,9 e 9,6 mg/g e 43,1 e 48 mg/g de cafeína e teobromina, respectivamente. A capacidade antioxidante dos extratos e a presença de compostos fenólicos foi determinada, sendo considerada baixa, devido a baixa afinidade do CO₂ por compostos com estas características.

Em condições otimizadas a ES-CO₂ é uma técnica viável para a obtenção de extratos de erva-mate especialmente para a extração de compostos de média polaridade potencializando a cafeína nas folhas, caule e flor de erva-mate, com potencial aplicação em alimentos, contribuindo para a valoração da cadeia produtiva deste produto.

REFERÊNCIAS

- AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-11, 2004.
- ALBUQUERQUE, C. L. C. **Extração supercrítica de matrizes vegetais oleaginosas: rendimento global, cinética de extração, composição química e atividade antioxidante**. 2008. 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ALVAREZ, M. V.; CABRED, S.; RAMIREZ, C. L.; FANOVICH, M. A. Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 90–96, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.012>.
- ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H. L. C.; LOPES, W. A.; MARTINS, S., AMORIM, A. M. M.; BRANDÃO, A. M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Química Nova*. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, SP, Brasil; v.18, p. 379-81, 1995.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim CEPPA*, Curitiba, v.24, p.319-336, 2006.
- ANDRICH, G.; NESTI, U.; VENTURI, F.; ZINNAI, A.; FIORENTINI, R. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* v.107, p.381–386, 2005. DOI 10.1002/ejlt.200501130.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, p. 415, 2004.
- ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H.; CARVALHO, Pde. O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 2009.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 655-665, 2002.

ASHURST, P. R. **Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices**. 2ª edição. Blackwell Publishing Ltd, p.374, 2005.

ATHAYDE M., COELHO G.C., SCHENKEL E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**. v.55, p.853-857, 2000.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, **J. Food Eng.** v. 117, p. 426–436, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.

BARRETO Jr, A. G.; BISCAIA Jr, E. C. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de cabaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 719-722, 2005.

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

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMANIA, A.; SMANIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-141, Nov. 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of Antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERNA, A. *et al.* Supercritical CO₂ extraction of essential oil from Orange peel; effect of the height of the bed. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v.18, p.227-237, 2000.

BERTÉ, K. A. S.; IZIDORO, D. R.; DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Desenvolvimento de gelatina funcional de erva-mate. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, p.354-360, fev, 2011. ISSN 0103-8478.

BIMAKR, M.; RAHMANA, R.A.; TAIP, F.S.; GANJLOO, A.; SALLEH, L.M.; SELAMAT, J.; HAMID, A.; ZAIDUL, I.S.M. Comparison of diferente extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. **Food and Bioproducts Processing**. v.89, p.67-72, 2011.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis St. Hil* extracts are potent inhibitors of nitro sative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci**. v.77, p.345-358, 2005.

BLUMENTHAL, M.; GOLDVERG, A.; BRINCKMANN, J. Herbal Medicine: Expanded Comission and Monographs. **American Botanical Council**, 2000.

BLUM-SILVA, C.H.; CHAVES, V.C.; SCHENKES, E.P.; COELHO, G.C.; REGINATTO, F.H. The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.25, 2015.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **J Ethnopharmacol** v.136, nº.3, p. 378-384, 2011.

BRAGA, M. E. M. **Obtenção de compostos bioativos de Curcuma longa L. E Lippia alba M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo.** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BRASIL-ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 234, de março de 1998. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Erva-mate.** Acesso em <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/234_98.htm>, junho de 2017.

BRASIL-ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Da Diretoria Colegiada - Rdc Nº 166, De 24 De Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Acesso em <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>, novembro de 2017.

BRASIL - ANVISA. **Portaria no 540, de 27 de outubro de 1997. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.** [s.l: s.n.]. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES>.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**. v.40, p. 393–405, 2007. doi:10.1016/j.foodres.2006.10.016

BRAVO, L.; MATEOS, R.; SARRIÁ, B.; BAEZA, G.; LECUMBERRI, E.; RAMOS, S.; GOYA, L. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in high cholesterol fed rats. **Fitoterapia**. v. 92, p.219–229, 2014. Doi: 10.1016/j.fitote.2013.11.007.

BRENNECKE, J. F.; ECKERT, C. A. Phase equilibria for supercritical fluid process design. **AIChE Journal**, v.35, n.9, p.1409–1427, 1989.

BRUN, G.W.; MARTÍN, Á. CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; COCERO, M.J. Crystallization of Caffeine by Supercritical Anti Solvent (SAS) Process: Analysis of Process Parameters and Control of Polymorphism. **Crystal Growth; Design**. v.12, n.4, p.1943-1951, 2012. DOI: 10.1021/cg2016758.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation process**. Darmstadt, Alemanha: Steikopff, Springer, p. 387,1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing, **J. Food Eng.** v.67, p. 21–33, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>.

BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIĆ, M.; TOMAS, S.; BILIĆ, M.; VELIĆ, D. Study of solid liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 236–242, 2007.

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240–248, 2003.

CAPELETTO, C.; CONTERATO, G.; SCAPINELLO, J.; RODRIGUES, F.S.; COPINI, M.S.; KUHNA, F.; TRES, M.V.; DAL MAGRO J.; OLIVEIRA, J. V. Chemical composition,

antioxidant and antimicrobial activity of guavirova (*Campo manesia xanthocarpa Berg*) seed extracts obtained by supercritical CO₂ and compressed n-butane. **J. of Supercritical Fluids**. v.110, p.32–38, 2010.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; CARDOZO-FILHO, L.; STURION, J. A.; DONADUZZI, C. M.; URIO, H.; ZANOELO, E. F. Análise de metilxantinas em dezesseis progênes de erva mate extraídas por dióxido de carbono supercrítico. In: Congresso Sul-Americano Da Erva-Mate, cap. 3., 2003, Chapecó. Anais. Chapecó: **EPAGRI**. s. 2-6, 2003.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Quim. Nova**, v.24, n. 4, p.509-515, 2001.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 656–661, 2010. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015.

CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando líquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, f. 197, 2013.

CHANDRA S., DE MEJIA E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p.3583–3589, 2004.

COELHO, G. C.; GNOATTO, S. B.; BASSANI, V. L.; SCHENKEL, E. P. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **J. Med. Food**. v. 13, p. 439–443, 2010.

COELHO, G. C.; RACHWAL, M. F.G.; DEDECEK, R. A.; CURCIO, G. R.; NIETSCHKE, K.; SCHENKEL, E.P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 35, p. 75 -80, 2007.

CRANK, J. The Mathematics of Diffusion, **Oxford: Clarendon Press**, p.85, 1975.

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; DE PAULA SCHEER, A.; DALLA SANTA, O. R.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and biological activity of Eupatorium intermedium flower extracts obtained from SCCO₂ and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, 97, 145–153, 2015. doi:10.1016/j.supflu.2014.10.008

CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; KRUEGER, R. L.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Extraction of Campomanesia xanthocarpa fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments, *J. Supercrit. Fluids* v. 98, p. 79–85, 2015.

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

DAINTREE, L.; KORDIKOWSKI, A.; YORK, P. Separation processes for organic molecules using SCF Technologies. *Drug Delivery Applications of Supercritical Fluid Technology*, v. 60, n. 3, p. 351–72, 2008.

DALMOLIN, I. *et al.* Chemical characterization and phase behavior of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. v. 42, p. 797-801, 2010.

DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v.129, p.1453–1461, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.112.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise Quím. *Nova*, v.30, n.1, São Paulo, Jan./Feb., 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000100021>

DERMARDEROSIAN, A. The Review of Natural Products. **Facts & Comparisons**, St. Louis, 2001.

DIAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.

DÖKER, O.; SALGIN, U.; SAVAL, I.; MEHMETOGLU, Ü.; ÇALIMLI, A. Modeling of extraction of b-carotene from apricot bagasse using supercritical CO₂ in packed bed extractor. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 28, n. 1, p. 11-19, 2004.

DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v. 7, n. 2, p. 129-134, 2003.

ESMELINDRO, A. A.; , TONIAZZO, G. ; LOPES, D.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Effects of processing conditions on the chemical distribution of mate tea leaves extracts obtained from CO₂ extraction at high. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 588–592, 2005.

ESMELINDRO, A. A.; GIRARDI, J. D.; MOSSI, A.; JACQUES, R. A.; DARIVA, C. Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30°C and 175 bar. **J. Agric. Food Chem**. v. 52, p. 1990–1995, 2004.

FAGGION, H.; BENINCÁ, C.; NAVIGLIO, D.; VOLL, F. A. P.; ZANOELO, E. F. Kinetics of Pressure Cycling Extraction of Solute from Leaves of Mate (*Ilex paraguariensis*) Dispersed in Water. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, p. 406–413, 2017. DOI: 10.1080/00986445.2016.1273834.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. In: Farmacognosia da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS / Florianópolis UFSC, p. 821; cap. 10: **Introdução à análise Fitoquímica**, p. 163-179, 2000.

FAVARETTO, A. **ASPECTOS ALELOPÁTICOS, FITOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DO CAPIM-ANNONI-2**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, f. 118, 2014.

FERNANDES, C. E. F.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 81, p. 139–146, 2016.

FERNANDES, C. E. F.; SCAPINELLO, J.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DALL MAGRO, J.; PALLIGA, M.; OLIVEIRA, J. V.; TRES, M. V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 1, p. 98–104, 2017. DOI 10.1007/s13197-016-2440-4.

FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum L.*) essential oil, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-245, 1999.

FIDA MERCOSUR- **Erva-mate: história, tradição e mercado no sul do Brasil**. Acesso em Maio, 2018 < <http://fidamercosur.org/claeh/experiencias/experiencias-en-la-región/894-erva-mate-história,-tradição-e-mercado-no-sul-do-brasil>>.

FILIP, R., LOPEZ, P., COUSSIO, J., FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytother. Res.** v.12, p.129–131, 1998.

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

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**. v. 72, p. 774–778, 2001.

FILIP, R.; FERRARO, G.; BANDONI, A.L.; BRACESCO, N.; NUNES, E.; GUGLIUCCI, A.; DELLACASSA, E. Mate (*Ilex paraguariensis*). In: Filippo Imperato. (Ed.). Recent Advances in Phytochemistry. **India: Research Signpost**, p. 113-131, 2009.

FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A. Modeling the Extraction of Carotene and Lipids from Pressed Palm Oil (*Elaeis guineensis*) Fibers Using Supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 18, n. 1, p. 35-47, 2000.

FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region, **Journal of Supercritical Fluids** v. 14, p. 247-256, 1999.

FRIZON, C. N. T.; OLIVEIRA, G. A.; PERUSSELLO, C. A.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; CAMLOFSKI, A. M. O.; ROSSA, U. B.; HOFFMANN-RIBANI, R. Determination of total

phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 795-801, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.030>.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (Biologia). Série Fisiologia Vegetal, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GERKE, I. B. B.; HAMERSKI, F.; SCHEER, A. P.; SILVA, V. R. Clarification of crude extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) by membrane processes: Analysis of fouling and loss of bioactive compounds. **Food And Bioproducts Processing**, v.102, p. 204–212, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.008>

GIL-CHÁVEZ, G.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5-23, 2013.

GIRARDI, J. S. **Avaliação da influência das condições de cultivo sobre os teores de composto de interesse presentes nos extratos de erva-mate (*Ilex Paraguariensis*) obtidos por CO₂ a altas pressões**. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEZ, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., AQUIFOLIACEAE). **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p.304-307, 2007.

GOSMANN, G.; BARLETTE, A. G.; DHAMER, T.; ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; CAMARGO, E. R.; ACEDO, S.; GAMBERO, A.; GNOATTO, S. C. B.; RIBEIRO, M. L. Phenolic compounds from maté (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 156-161, 2012.

GOTO, M.; SATO, M.; HIROSE, T. Extration of Peppermint Oil by Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**. v. 26, p.401-407, 1993.

GOYENECHÉ, R.; FANOVICH, A.; RODRIGUES, C. R.; NICOLAO, M. C.; DI SCALA, K. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant

capacity and cytotoxicity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.135, p. 78–83, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.004>

GRUJIC, N. *et al.* Effects of different extraction methods and conditions on the phenolic composition of mate tea extracts. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2518-2528, 2012.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v.35, p.47–56, 1995.

GUIGARD, S. E.; HAYWARD, G. L.; ZYTNER, R. G.; STIVER, W. H. Measurement of solubilities in supercritical fluids using a piezoelectric quartz crystal. **Fluid Phase Equilibria**. v. 187-188, p. 233-246, 2001.

GUPTA, R. B.; SHIM, J. J. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. **CRC Press. Boca Raton**, p. 909, 2007.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física, Gravitação, ondas e termodinâmica**. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: LTC, v. 2: p. 296, 2012.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IAL, p. 1020, 2008. Versão eletrônica. Disponível em:<http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20>. Acesso em: 14 Jun. 2017.

ICH- International Conference on Harmonization. Grideline on the Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. 2003.

ISASF, International Society for Advancement of Supercritical Fluids, 2017. Acesso em <http://www.isasf.net/index.php?id=25>.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v.122, p. 695–699, 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.039.

JENSEN, S.; ZANOELO, É. F. Kinetics of aqueous extraction of mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p. 220–227, 2012.

JESUS, S. P., CALHEIROS, M. N., HENSE, H., MEIRELES, M. A. A. Asimplified model to describe the kinetic behavior of supercritical fluid extraction from a rice bran oil by product. **Food Public Health**, n. 3, p. 215–222, 2013.

KANG, Y. R.; LEE, H. Y.; KIM, J. H.; MOON, D. I.; SEO, M. Y.; PARK, S. H.; CHOI, K. H.; KIM, C. R.; OH, J. H.; CHO, S. W.; KIM, S. Y.; KIM, M. G.; CHAE, S. W.; KIM, O.; OH, H. G. Antiobesity and anti-diabetic effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**. v. 28, n. 1, p. 23-29, 2012.

KIM, S. J.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; LEE, H. L.; PAEK, K. Y. Parameter saffecting the extraction of ginseng o sides from thead ventitious roots of ginseng (*Panaxginseng* C.A. Meyer). **Separation and Purification Technology**, v. 56, n. 3, p. 401-406, 2007.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LAROZE, L. E. *et al.* Extration of antoxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European Food Research and Technology**. Heidelberg, v. 231, p. 669-677, 2010.

LIMA, I. F.; DE DEA LINDNER, J.; SOCCOL, V. T.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Development of an innovative nutraceutical fermented beverage from herbal mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) extract. **Int J Mol Sci**. v. 13, n. 1, p. 788-800, 2012. doi: 10.3390/ijms13010788.

LIMA, M. A.; CHARALAMPOPOULOS, D.; CHATZIFRAGKOU, A. Optimisation and modelling of supercritical CO₂ extraction process of carotenoids from carrot peels. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, p. 94-102, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.028>

LORANTY, A.; REMBIAŁKOWSKA, E., ROSA, E. A. S.; BENNETT, R. N. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.23, n. 5, p.432–441, 2010.

LUO, D. L.; QIU, T. Q.; LU, Q. Ultrasound-assisted extraction of ginsenosides in supercritical CO₂ reverse microemulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 3, p. 431-436, Feb. 2007.

LUZ, L. P. **Estudo do ultrassom como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Maio, 1998.

MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v.126, p.491–497, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.026.

MAQ'NAGUA – Máquinas para engarrafamento e Higienização. **Unidade de Extração Supercrítica**. Marcelo Máquinas Ind. Com. Ltda - ©, Rua Antonio Novaes, 230 - Centro, Serra Negra - SP - Cx. Postal 137 - CEP 13930-000, 2017.

MARIA-FERREIRA, A. D.; DARTORA, B. N.; DA SILVA, L. M.; PEREIRA, I. T.; DE SOUZA, L. M.; RITTER, D. S.; IACOMINI, M.; WERNERA, M. F. P.; SASSAKI, G. L.; BAGGIO, C. H. Chemical and biological characterization of polysaccharides isolated from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 59, p. 125- 133, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.03>.

MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. Boca Raton: CRC Press, p. 25–49, 2007.

MARTINEZ, J. L.; VANCE, S. W. Supercritical extraction plants equipment, process, and costs. In J. L. Martinez (Ed.), **Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds**, Boca Raton: CRC Press, p. 25-28, 2008.

McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical fluid extraction-Principle and practice**. 1 ed. Boston: Butterworth Publishers, 1986.

MCNERNEY, K.; COAD, M. L.; BURKARD, R. The influence of caffeine on caloric and cervical vestibular evoked myogenic potentials (cVEMPs). **J Am Acad Audiol.**; v. 25, p. 261-267, 2014.

MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; BRUNS, R. E.; PALLONE, J. L. A.; GODOY, H. T. Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v. 85, p. 237-244, 2011.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from Latin American plants, p. 243-274, in: J. Martinez (Ed.) "Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds", **CRC Press – Taylor & Francis Group**, USA, 2008.

MELLO, D. R. DE. Resolução RDC no 277, de 22 de setembro de 2005 ementa não oficial: Aprova o " **REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS**" Diário Oficial da União Poder Executivo, 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40512000474583248e6ede3fbc4c6735/informe_45.pdf?mod=ajperes>.

MESA, M. G.; HERRERA, D. M. A.; VILAS, M. M.; ALFONSO, C. C.; CARRETERO, J. H.; BATISTA, A. D.; MONTEQUINI, J. F. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. **Rev Cubana Angiol y Cir Vasc**, v. 3, n. 2, p. 39-46, 2002.

MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiberoffinale*R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102-109, 2012.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S.R.S. Supercritical fluid extratin of peach (*Prunus pérsica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 51, p. 10-16, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L. F. V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum L.*) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 33, n. 2, p. 131-138, 2005.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 344-345, dez. 1997.

MOLIN, R. F. *et al.* Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity in Oxidized Leaves of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 997–1003, dez. 2014.

MONTGOMERY, M. D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística e probabilidade para engenheiros**. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2 ed., 2003.

MOREIRA, A. V. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.). I- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação**, Dissertação (Mestre) – Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, f.120, 1999.

MOTTA, E. V. S.; PINTO, N. C. C.; DUQUE, A. P. N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P. M. Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. **Boca Raton: CRC Press**, p.132-133, 2000.

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, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.002>.

PARK, H.; LEE, H.; SHIN, M.; LEE, K.; KIM, Y.; KIM, K. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, **Food Chem.** v.105, p. 1011–1017, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.064>.

PEREDA, S.; BOTTINI, S. B.; BRIGNOLE, E. A. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTÍNEZ, J. L. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. **CRC Press**, cap 1, p. 1-21, 2008.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. Springer, **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; CAZAROLLI, L. H.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; GUESSER, S. M.; DA SILVA, E. L.; SILVA, F. R. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in *Ilex paraguariensis* Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity. **Molecules**, v. 18, p. 3859-3871, 2013. doi:10.3390/molecules18043859.

PERRUT, M. **Supercritical Fluid Applications: Industrial development and economic issues**. In: Proceedings of the 2 nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering, 2001, Hamburg, Germany, CD-ROM, 2000.

PERRUT, M., CLAVIER, J.Y., POLETO, M., REVERCHON, E., Mathematical modeling of sunflower seed extraction by supercritical CO₂. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 36, p. 430–435, 1997.

PIMENTEL, G. D. *et al.* Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–818, 2012.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, G.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Optimization of batch to continuous transposition: solid-liquid extraction from plants in an industrial contactor. **Chemical & Engineering Technology**, v. 29, n. 1, p. 46-51, 2006.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. In: WILLIAN, G. M. ed. **Antioxidants: Chemical, physiological, nutritial and toxicological aspects**, Princeton: Princeton Sientific, p.93-122, 1993.

PRADO, J.M.; DALMOLIN, I.; CARARETO, N.D.D.; BASSO, R.C.; MEIRELLES, A.J.A.; OLIVEIRA, J.V.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELES, M.A.A. “Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation”, **Elsevier, The Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 249-257, 2012.

PRADO, J.M.; PRADO, G.H.C.; MEIRELES, M.A.A. "Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue", **Elsevier, The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 231-237, 2011. doi:10.1016/j.supflu.2010.10.036.

PRICE, W.; SPITZER, J. The temperature dependence of the rate of extraction of soluble constituents of black tea. **Food Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 133–136, 1993.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; MEJIA, E. G. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1171–1178, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2010.10.023.

QUISPE-CONDORI, S. **Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: Artemisia annua, Cordia verbenácea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgare**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, f. 203, 2005.

RAI, A.; MOHANTY, B.; BHARGAVA, R. Supercritical extraction of sunflower oil: a central composite design for extraction variables, *Food Chem.* v. 192, p. 647–659, 2016.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 5, p. 269-284, October 1, 2002.

REVERCHON, T., TADDEO, R., DELLA PORTA, G. Extraction of sage oil by supercritical CO₂: influence of some process parameters. **The Journal of Supercritical Fluids** v.8, p.302-309, 1995.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products, **J. Supercrit. Fluids**, v. 10, p. 1–37, 1997.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146–166, 2006.

RIBANI, R. Chemical composition and antioxidant activity of yerbamate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil, Aquifoliaceae) extract as obtained by Spray Drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523-5527, 2011.

RIVELLI, D. P.; SILVA, V. V. D.; ROPKE, C. D.; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. D. M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH·reduction. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**v. 43, p. 215–222, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOUZA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O.; MEIRELES, M. A. A. Determination of solubility of extracts from vegetable raw materials in pressurized CO₂: a pseudo ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 21-36, 2002.

ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. “Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction”, **Elsevier, Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 235-240, 2005.

ROSA, T. V. R.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to Food Industry: Fundamentals of Supercritical Extraction from Solid Matrices. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. **Boca Raton: CRC Press**, p. 269-286. 2009.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J. A. Sample preparation for the analysis of isoflavonas from soy beans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2-29, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F. D.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.

SALDAÑA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; BAER, M. G.; MAZZAFERA, P.; BRUNNER, G. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguayensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SANTANA, Á. L. Determinação dos Parâmetros de Transferência de Massa do Processo de extração Supercrítica, **Master Thesis**. Federal University of Pará, Belém, Brazil, 2013.

SANTANA, Á. L. **Validation of an alternative algorithm implemented in MS Excel for modeling supercritical fluid extraction kinetics: application to amazonian fruits.** In: COBEQ 2016 – XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza, Brazil, 2016.

SANTOS, J. L. Projeto de uma Unidade de Extração Supercrítica Empregando Simulador de Processos, **Master Thesis**. Federal University of Pará, Belém, Brazil, 2007.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, Nov 2010.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; CHINI, S. O.; BERTOL, C. D.; ESCOSTEGUY, P. A. V. Variabilidade espaço-temporal de compostos fenólicos em *Lotus corniculatus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, ed.2: p. 394-397, 2018. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA18034>

SCHINELLA G. R.; TROIANI G.; DAVILA V.; DE BUSCHIAZZO P. M.; TOURNIER H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 269, p. 357–360. 2000.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* a. St. - hil. (erva-mate) em ijuí e santa maria, estado do rio grande do sul. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SERAFIM, R. A. **Efeito da aplicação de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) assistido por ultrassom na estabilidade oxidativa de linguiça suína.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

SERRA, A. T. *et al.* Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 55, p. 184-191, 2010.

SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*baccharis trimera less*).** Tese de mestrado em Engenharia de Alimentos – Departamento de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2004.

SILVA, L. P.S. **Modelagem matemática da transferência de massa no processo de extração supercrítica de pimenta vermelha.** (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; COUTINHO, J. P.; SOUZA, T. C. L.; CUNHA, E. C.E.; MORAES, M. R.; GODOY, H. T. Content of lutein in aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Food Research International**, v. 82, p. 165–171, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.033>.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for mate saponin analysis by mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.** v.1218, p.7307-7315, 2011.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science.** v. 49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SOVOVÁ, H.; STATEVA, R. P.; GALUSHKO, A. A. Solubility of b-carotene in supercritical CO₂ and the effect of entrainers. **Journal of Supercritical Fluids.** v. 21, n. 3, p. 195-203, 2001.

SUN, Y.; ROLLINS, H. W.; BANDARA, J.; MEZIANI, J. M.; BUNKER, C. E. Preparation and processing of Nanoscale materials by Supercritical Fluid Technology. In: **Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering**, Marcel Dekker Inc., p. 491-576, 2002.

TAKETA, C. S. C.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P.; SPITZER, V.; **Lebensmittel chemie**, v. 52, p. 20. 1998.

TAKEUCHI, T.M. **Extração supercrítica de macela, cravo-das-índia e vetiver: aspectos tecnológicos e econômicos.** Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Capinas, p. 417, 2009.

TALANSIER, E.; BRAGA, M. E. M.; ROSA, P. T. V.; PAOLUCCI-JEANJEAN, D.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of vetiver roots: A study of SFE kinetics. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 200-208, 2008.

TAN, C.; LIOU, D. Modeling of Desorption at Supercritical Conditions. **American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Journal**, v. 35, p. 1029-1031, 1989.

TANAKA, T.; SHNIMIZU, M.; MORIWAKI, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3202-3242, 2012.

TAYLOR, L. T. **Supercritical Fluid Extraction**, New York: John Wiley & Sons, 1996.

TELLO, J.; VIGUERA, M.; CALVO, L. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora var Robusta*) husks using supercritical carbon dioxide, **J. Supercrit. Fluids**, v. 59, p. 53–60, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.07.018>.

TING, S. S. T.; TOMASKO, D. L.; MACNAUGHTON, S. J.; FOSTER, N. R. Chemical physical interpretation of co-solvent effects in supercritical fluids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 7, p. 1482-1487, 1993.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of food process engineering**. ed. 3, New York: Springer, 2007.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sono chemistry**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2001.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J. Chromatog. B**, v. 812, p. 85-99, 2004.

TURNER, S.; COGOI, L.; ISOLABELLA, S.; FILIP, R.; ANESINI, C. Evaluation of the Antioxidant Activity and Polyphenols Content of *Ilex paraguariensis* (Mate) During Industrialization. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 2011. ISSN: 2042-4876.

VERA CANDIOTI, L. *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in Analytical Chemistry (iupac Recommendations, 2001). **Pure and Applied Chemistry**, Nova York, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VIEIRA, L. P.; KCANTELLI, K.; FRONZA, J.; PADOIN, M. J. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n.6, p. 956-961, 2010.

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, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WEBER, M.; THIES, M.C. Understanding the RESS Process in: Ya-Ping Sun, Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering. **Marcel Dekker**, p.387-438, 2002.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1801–1812, 1999.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidante action of the extracts, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 17, p. 393-398, 1997.

ZEKOVIĆ, Z.; BERA, O.; ĐUROVIĆ, S.; PAVLIĆ, B. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Kinetics modelling and ANN optimization. **J. of Supercritical Fluids** v. 125, p. 88–95, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.02.006>

ZHENG-CUIMING; TENG-BING; GAO-FENGI; WUZONGPU; ZHENG-CM; TENG-B; GAO-FL; WU-ZP. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and pliphenoxidase in seed coat of soybeans after infection with Soybean Mosaic Virus. **Scientia-Agricultura Sinica, Beijing**, v. 32, n. 1, p. 99-101, 1999.

APÊNDICE A – Artigo científico

Supercritical extraction of biocompounds of *Ilex paraguariensis* yerba: optimization, kinetics and biocompounds characterization.

Jéssica Carla Racoski ¹, Luana Pabst ², Charise Dallazem Bertol³ Jeferson Steffanello Piccin ⁴

1-Mestre em Ciência e Tecnologia da Universidade de Passo Fundo

2-Bolsista Pibic do curso Engenharia Química

3-Profª. Dra. Charise Dallazem Bertol – Curso de Farmácia -UPF

3-Orientador do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é reconhecida pelos seus benefícios a saúde devido a presença de substâncias estimulantes do sistema nervoso central e compostos com características antioxidantes. Neste sentido nós utilizando a tecnologia de extração supercrítica com CO₂ para a obtenção de extratos de folhas, caules e flores de erva-mate, sendo avaliado os extratos obtidos quanto ao rendimento e também suas características. As condições operacionais de extração para as folhas foram otimizadas em 32 MPa e 58 °C, obtendo-se 8,78 % de rendimento de extrato. Para os caules e flores os rendimentos foram de 1,37 % e 2,24%, respectivamente. A quantificação e identificação dos extratos foram avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e FTIR. Os principais compostos identificados foram as metilxantinas cafeína e teobromina. Em condições otimizadas a ES-CO₂ é uma técnica viável para a obtenção de extratos de erva-mate especialmente para a extração de compostos de média polaridade potencializando a cafeína nas folhas, caule e flor de erva-mate, com potencial aplicação em alimentos, contribuindo para a valorização da cadeia produtiva deste produto.

Palavras-chave: Biocompostos, Cafeína, CO₂

ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) is recognized for its health benefits due to the presence of central nervous system stimulating substances and compounds with antioxidant characteristics. In this sense we used the technology of supercritical extraction with CO₂ to obtain extracts of leaves, stems and flowers of mate, being evaluated the extracts obtained as to the yield and also its characteristics. The extractive operating conditions for the leaves were optimized at 32 MPa and 58 ° C, yielding 8.78% of extract yield. For stems and flowers yields were 1.37% and 2.24%, respectively. Quantification and identification of the extracts were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and FTIR. The main compounds identified were the methylxanthines caffeine and theobromine. In optimized conditions ES-CO₂ is a viable technique to obtain extracts of yerba mate especially for the extraction of compounds of medium polarity potentiating the caffeine in the leaves, stem and flower of yerba mate, with potential application in foods, contributing to evaluate the production chain of this product.

Key-words: Biocomposites, Caffeine, CO₂

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é reconhecida por apresentar propriedades nutricionais e medicinais. É nativa da Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil. A exploração econômica desta planta está relacionada ao comércio das folhas e caules para o produto “erva-mate”, principalmente destinado ao chimarrão e ao tererê (MELLO, 2005). As bebidas à base de erva-mate possuem compostos bioativos originários da planta, tais como compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas. Estes compostos são benéficos à saúde, possuindo efeitos hipocolesterolêmicos, hepatoprotetores diuréticos e propriedades antioxidantes (HECK; DE MEIJIA, 2007; RIVELLI *et al.*, 2007, BIXBY *et al.*, 2005; FILIP *et al.*, 2000; GUGLIUCCI; STHAL, 1995), na melhoria da tolerância à glicose (KANG *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012), anti-inflamatórios (ARCARI *et al.*, 2009; PIMENTEL *et al.*, 2012), atuando sobre o sistema de defesa do organismo e prevenindo a aterosclerose e doenças coronariana. A cafeína, por exemplo, é importante para aumentar a excitabilidade do sistema nervoso central (SILVESTRE, GIANONI, PEREIRA, 2018; HAUSCHILD; ADAMI, 2018, ALKHATIB; SEJO; LARUMBE, 2015), e a teobromina possui ação vasodilatadora (LIMA *et al.*, 2005).

Desta forma, processos tecnológicos que visem a preservação dos compostos bioativos da erva-mate durante obtenção são estratégias a considerar na busca por outras formas de consumo da matéria-prima. O processo de obtenção desses produtos naturais bioativos corresponde a três fases principais: extração a partir da matéria vegetal, fracionamento do extrato ou óleo e purificação do princípio ativo (BARRETO Jr, BISCAIA Jr, 2005).

A tecnologia supercrítica é uma alternativa aos processos de extração existentes, com possibilidade de alcance de maior seletividade e obtenção de extratos livres de solvente. As propriedades dos fluidos supercríticos elevam as taxas de extração e os rendimentos, comparativamente com os solventes gasosos, uma vez que as altas massas específicas dos fluidos conferem grande poder de solvatação, enquanto os baixos valores de viscosidade combinados com valores de difusividade fornecem alto poder de penetração na matriz sólida (*et al.*, 2004; TSAO; DENG, 2004). A extração com CO₂ em estado supercrítico resulta na recuperação de compostos sem resíduos tóxicos, sem degradação de componentes ativos, que podem ser recuperados em alta pureza e apresentam “status GRAS (*Generally Reconized As Safe*)”. Além disso, o alto gradiente de pressão entre a coluna de extração e a saída do extrator pode produzir extratos livres de micro-organismos e esporos, com maior vida útil quando comparados aos extratos obtidos por processos a baixa pressão (DIAZ-REINOSO *et al.*, 2006).

No campo da indústria de alimentos, o processo assistido por extração supercrítica com CO₂ tem sido usado principalmente para desenvolver materiais de embalagem de alimentos ativos usando compostos naturais (BELIZÓN *et al.*, 2018; YILDIRIM *et al.*, 2018; CEJUDO BASTANTE *et al.*, 2017), para impregnar materiais de grau alimentício com produtos nutracêuticos para aplicações alimentares funcionais (ROJAS *et al.*, 2019; PANTIĆ *et al.*, 2016), e usado comercialmente para a descafeinação de café e chá (PARK *et al.*, 2007; TELLO, VIGUERA, CALVO, 2011), e para extrair sabores de folhas de plantas, lipídios do leite, óleos de peixe, álcool de bebidas (BRUNNER, 2005)

Desta forma, este trabalho tem por objetivo verificar se a tecnologia de extração supercrítica com CO₂ pode ser uma alternativa à cadeia produtiva de erva-mate para a obtenção de compostos bioativos da erva-mate, incluído partes da planta sem exploração comercial. Além disso, buscou-se otimizar o processo extrativo quanto aos efeitos da temperatura e pressão do fluido supercrítico sobre o rendimento, analisar a cinética de extração quanto aos mecanismos de transferência de massa e avaliar os extratos obtidos quanto a presença de compostos bioativos e potencial antioxidante

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS DE ERVA-MATE

As amostras foram coletadas em um erval não sombreado, cultivado sob técnicas convencionais de manejo na cidade de Ilópolis-RS, latitude: -28,93° e longitude: -52,07°. Foram separadas as partes não íntegras, homogeneizados e secos em secador de bandejas com ar forçado na temperatura de 25°C por 24 h para folhas e 48 h para caules. As flores ficaram em ultrafreezer a -18°C por 24h após foram liofilizadas (Liofilizador LS3000- Terroni) por 48 h. Após, as amostras foram moídas (TE-631/3- TECNAL) e as partículas padronizadas em um jogo de 14 a 200 mesh (Tyler). Então, as amostras foram armazenadas à vácuo em pacotes em polipropileno em temperatura de 4 °C até o uso que ocorreu em um período máximo de 15 dias.

2.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICO

2.2.1 Descrição Da Unidade De Extração Supercrítica

O equipamento de extração supercrítica utilizado foi desenvolvido pela empresa MAQ'NÁGUA/SP, n° série: BR-002-PL, ano de fabricação 06/2017. A unidade de extração foi

construída em aço inoxidável 316 L. No sistema, o cilindro de CO₂ (1) alimenta a linha de extração onde está situado o manômetro 1M através da abertura da válvula V1. A linha de solvente (CO₂) passa por um banho termostático de circulação (2) para refrigeração, garantido que o solvente permaneça em estado líquido. Então, a bomba pneumática pressuriza o CO₂ na condição de trabalho (verificado no manômetro 2M), encaminhando o CO₂ para a célula de extração (4). A célula de extração fica imersa em banho termostático (3) que controla a temperatura de extração. O controle da vazão do sistema é realizado através da válvula V4 e da válvula micrométrica (Vm) tipo agulha aquecida (5). O soluto é coletado em frascos âmbar (6) e o fluxo de saída de CO₂ é medido através de um fluxometro (7).

2.2.2 Condução Experimental

O sistema foi alimentado com 50 g de matéria-prima, adicionada a célula de extração. Aguardou-se até a temperatura atingir a condição experimental (35,9°C a 64,1°C). Pressurizou-se o sistema com CO₂ (White Martins 99,99%) na condição experimental (15 a 33 Mpa), mantendo-se em condições estáticas por 2 horas. Então, iniciou-se a extração dinâmica, com vazão de CO₂ de 7,92 g/min. O banho de refrigeração do CO₂ (2) foi mantido a 6 °C e a válvula micrométrica (Vm) foi mantida a 65 °C. Em intervalos pré-determinados a massa de amostra coletada foi pesada a fim de calcular o rendimento de extração, de acordo com a equação 1:

$$R = \frac{m_{EXT}}{F_0} * 100\% \quad (1)$$

sendo, R o rendimento de extração (%), m_{EXT} a massa de extrato obtido (g) e F_0 a massa da amostra alimentada no sistema.

2.2.3 Análise dos dados e otimização da Extração Supercrítica com CO₂

Para a otimização da obtenção de biocompostos de folhas de erva-mate por extração com fluido supercrítico foram utilizadas técnicas sequencias de planejamento experimentais. Para isso, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), de acordo com Montgomery; Ruger, (2003), apresentando na Tabela 1

Tabela 1 – Matriz do planejamento experimental e seus respectivos resultados de rendimento na etapa de taxa constante (R_{CER}), constante cinética (k) e rendimento global (R_{∞}) da ES-CO₂ sobre folhas de erva-mate

Ensaio	X ₁ (Pressão, em MPa)	X ₂ (Temperatura, em °C)	R _{CER} (%)	k (10 ⁻³ min ⁻¹)	R _∞ (%)
1	-1 (15)	-1 (40)	0,39	15,232	0,90

2	-1(15)	+1(60)	0,10	4,231	0,36
3	+1(30)	-1(40)	1,72	18,606	4,76
4	+1(30)	+1(60)	2,17	9,504	7,81
5	0(22,5)	0(50)	1,25	4,038	6,63
6	0(22,5)	0(50)	2,92	4,212	6,74
7	0(22,5)	0(50)	1,84	7,639	5,12
8	$-\alpha$ (11,925)	0(50)	0,04	16,233	0,10
9	$+\alpha$ (33,075)	0(50)	2,37	18,587	4,44
10	0(22,5)	$-\alpha$ (35,9)	1,19	3,793	8,30
11	0 (22,5)	$+\alpha$ (64,1)	2,13	4,186	8,88

Fonte: Autor (2019)

O modelo cinético de Andrich *et al.* (2005) (eq. 2) foi utilizado para correlacionar os dados de extração, obtendo-se os valores do rendimento global (R_∞) e constante cinética de extração (k).

$$R = R_\infty \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)}) \quad (2)$$

sendo, R o rendimento (g/g) em um tempo “ t ” qualquer (min), R_∞ o rendimento global (g/g) quando $t \rightarrow \infty$ e k a constante cinética (min^{-1}).

Além disso, para a definição das etapas de transferência de massa, bem como o rendimento de extrato em cada uma delas, os modelos *Spline* propostos por Meireles (2008) e Jesus *et al.* (2013) foram utilizados, conforme as equações 3, 4 e 5.

quando $t < t_{CER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (3)$$

quando $t_{CER} < t < t_{FER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_2 \times AL_1 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (4)$$

quando $t > t_{FER}$

$$\frac{m_{EXT}}{F_0} = b_0 + \left(b_1 \times t \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_2 \times AL_1 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) + \left(b_3 \times AL_2 \times \frac{Q_{CO_2}}{F_0} \right) \quad (5)$$

sendo, b_0 o coeficiente linear da linha de taxa de extração constante (CER, em g/g), b_1 o coeficiente de inclinação da linha reta CER (g/g·min), fisicamente relacionado com a massa de extrato obtida no tempo CER (m_{CER}), b_2 o coeficiente de declividade da taxa de extração no período FER (g/g·min), b_3 o coeficiente de inclinação da difusão controlada (g/g·min), Q_{CO_2} é

a vazão mássica de CO₂ (g/min), F₀ a massa de amostra, AL₁ e AL₂ parâmetros relacionados aos tempos máximos t_{CER} e t_{FER}, respectivamente, em que:

$$AL_1 = t - t_{CER} \quad (6)$$

$$AL_2 = t - t_{FER} \quad (7)$$

Desta forma, os parâmetros b_n e AL_n dos modelos foram ajustados através de um algoritmo foi implementado no MS Excel, utilizando ferramenta SOLVER associado ao *Visual Basic for Applications*, baseado nos trabalhos de Santos (2007), Santana (2013) e Santana (2016). O rendimento de extrato no tempo CER foi calculado substituindo o tempo por t_{CER} na equação 3.

Os efeitos principais, de interação e quadráticos das variáveis independentes foram testadas por análise de variância (ANOVA) a uma probabilidade do Erro Tipo I menor 5% (p<0,05). As condições experimentais ótimas para R_Cer, R_inf e k foram obtidas utilizando a função *desirability* de Derringer, para-encontrar as condições de operação que garantam para todas as respostas envolvidas e, ao mesmo tempo, proporcionar a melhor resposta conjunta (VERA CANDIOTI *et al.*, 2014).

2.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS

As amostras obtidas após 10 min de extração foram coletadas e diluídas em metanol grau (HPLC) para análise cromatográfica, potencial oxidante e fenólicos totais. Após esta mesma diluição foi utilizada para a realizadas das demais análises fenólicos totais e de antioxidante. Com exceção da análise de FTIR que foi usado os extratos puros de cada matéria-prima.

2.3.1 Caracterização de Grupamentos Funcionais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As caracterizações de grupamentos funcionais foram determinadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-Agilent, Cary 630) na faixa espectral de 4.000 a 650 cm⁻¹, e um diamante de 1 ressaltos. Os espectros foram obtidos com a co-adição de 48 scans na resolução de 4 cm⁻¹. O software MicroLab foi usado para coletar os dados e criar um método para futuras análises de amostras desconhecidas.

2.3.2 Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Flexar, Perkin Elmer), com detector de comprimento de onda variável Flexar PDA, ajustado em 280 nm. Os comprimentos de onda 330 e 225 nm também foram monitorados. Para fase estacionária, foi utilizada uma coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). Foram pesquisadas as substâncias químicas de referência (SQR) ácido ferúlico (99%, lote STBC5005V), cafeína (lote C0750), ácido clorogênico (>95% lote SLBS0103V) e teobromina (>99% lote BCBS1162V) da marca Sigma Aldrich (FAVARETTO, 2014) e catequina (lote BCBC2740), epicatequina (lote BCBC8078V), rutina (lote BCBD8327V) da marca Sigma Aldrich (SCHEFFER-BASSO *et al.*, 2018), foram preparadas na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹, em metanol. O comprimento de onda de máxima absorção foi de 260 nm para quercetina e de 280 nm para rutina, catequina e epicatequina. Os dados das áreas dos picos foram integrados em Software Chromera

2.3.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante por FRAP

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizado de acordo com Benzie, Strain (1996) com modificações de Arnous; Makris; Kefalas (2002). Para a realização do ensaio, uma alíquota de 200 µL de amostra (extrato) foi adicionado ao tubo 200 µL de solução de cloreto férrico 3 mM, deixados em repouso por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foi adicionado 3600 µL da solução TPTZ em ambiente escuro durante 10 minutos para a reação. Após os 10 minutos, o espectrofotômetro foi zerado com o branco e após realizado a leitura das amostras em 620 nm, os resultados foram expressos em µg / g de amostra.

2.3.4 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais (FT)

Em ambiente escuro foram adicionados em tubos de ensaio 1 mL do extrato diluído em metanol, 5 mL de água destilada e 1 mL etanol. Após foi adicionado 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se por 3 segundos e adicionou-se 1 mL de solução aquosa com 7,5% de carbonato de sódio (Na₂CO₃), agitou-se novamente para alcalinizar a solução. Deixa-se em repouso a solução em temperatura ambiente e ao abrigo de luz durante 1 hora e efetua-se as leituras a 765 nm. Foram realizadas em espectrofotômetro (eppendorf- BioSpectrometer) e leituras em triplicata da absorbância. A quantificação foi feita com base em uma curva padrão de ácido gálico, e os resultados foram expressos em µg / g de amostra (SINGLETON; ROSSI, 1965).

2.4 Análise estatística dos resultados

As características das folhas antes e após a extração bem como dos extratos obtidos, em relação à composição, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram avaliados estatisticamente, através de análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey, um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PERFORMANCE E OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA

Visualmente, os extratos de erva-mate, apresentaram coloração amarela, viscosos, com aspecto ceroso, e aroma semelhante ao tradicional “chimarrão”, porém com maior intensidade. Estas características se aplicam para todos os extratos (folhas, caule e flores), com diferenças na viscosidade.

A cinética da extração de folhas de erva-mate, compreende no ganho de massa em função do tempo. O fluxo de massa de dióxido de carbono foi mantido constante em $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ e desta forma, o tempo de extração foi facilmente convertido em massa de dióxido de carbono utilizado. As coordenadas das curvas expressam o rendimento de extração por massa de dióxido de carbono que fluiu através da célula extratora.

A partir das cinéticas de extração, os modelos cinéticos de primeira ordem (eq. 2) foram aplicados de acordo com o proposto por Andrich *et al.* (2005) e ao modelo *Spline* propostos por Meireles (2008). Os resultados foram obtidos a partir do ajuste dos modelos aos dados experimentais, e utilizados para a análise dos dados deste planejamento.

Os resultados da Tabela 1 foram submetidos a análise de variância para verificações dos efeitos significativos sobre as respostas (material suplementar). Os modelos foram definidos de acordo com o R^2_{ajustado} . Os modelos estatísticos gerados a partir do planejamento proposto estão apresentados nas equações 8, 9 e 10, para rendimento na etapa de taxa de extração constante (R_{CER}), constante de transferência de massa (k) e rendimento global (R_{∞}), respectivamente.

$$R_{\text{CER}} = 2,285 + 0,839 \cdot X_1 - 0,626 \cdot X_1^2 - 0,3966X_2^2 \quad (8)$$

$$k = 0,0048 + 0,0014 \cdot X_1 + 0,0065 \cdot X_1^2 - 0,0025X_2 \quad (9)$$

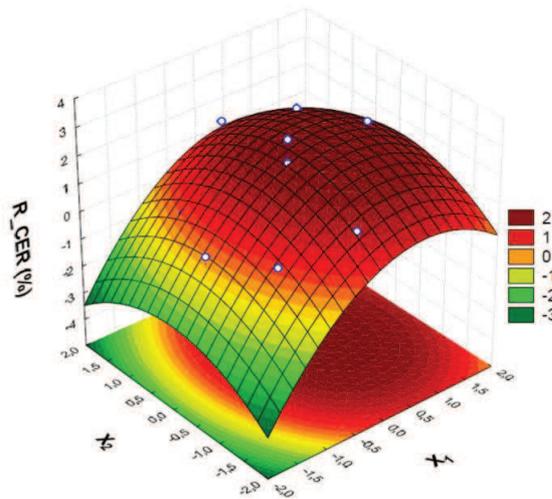
$$R_{\infty} = 6,166 + 2,182.X_1 - 2,446.X_1^2 + 0,722X_2^2 + 0,895X_1.X_2 \quad (10)$$

A Figura 1, apresenta as superfícies de resposta da extração supercrítica com CO₂ (ES-CO₂) das folhas de erva-mate para os parâmetros pressão e temperatura convergindo em rendimento global (R_{∞}), coeficiente de transferência de massa (k) e rendimento na etapa de extração constante (R_{CER}), obtidas a partir dos modelos estatísticos.

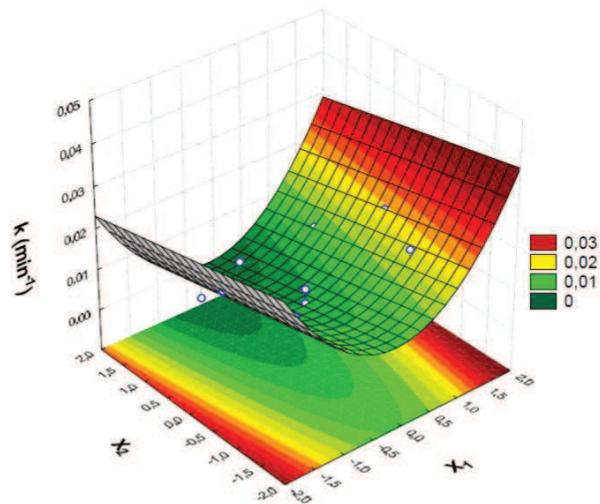
A resposta gerada pelo modelo de segunda ordem para o rendimento da taxa de extração constante (R_{CER}) estão apresentados na Figura 1.a. A respectiva equação (8) mostra que a pressão é um fator importante (X_1). O efeito linear da pressão (X_1) apresenta coeficientes positivos para todas as respostas, o que significa que pressões maiores produzirão maiores rendimentos. As linhas de contorno no alto da superfície, correspondem aos experimentos 4, 10 e 11 da Tabela 1, e mostram que os valores de R_{CER} preditos pelo modelo aumentam sensivelmente com aumento da pressão até um determinado ponto, entre 22,5 MPa e 30 MPa, caracterizando um domo na superfície de resposta. Isso é característico do coeficiente relativo ao efeito quadrático da pressão (X_1^2) onde o autovalor é negativo. Conforme Perrut *et al.*, (1997), o incremento da pressão proporciona um aumento significativo no rendimento do extrato, principalmente de compostos de alto peso molecular, como aqueles que conferiram uma pigmentação amarela ao extrato. Da mesma forma, o valor negativo do efeito quadrático da temperatura (X_2^2) sugere a existência de ponto de ótimo próximo ao ponto central.

Figura 1- Superfície de resposta para ES-CO₂ para folhas de erva-mate para os parâmetros pressão (X_1) e temperatura (X_2) convergindo a) rendimento no período de taxa constante de extração (R_{CER}); b) constante de transferência de massa (k); c) rendimento global (R_{∞})

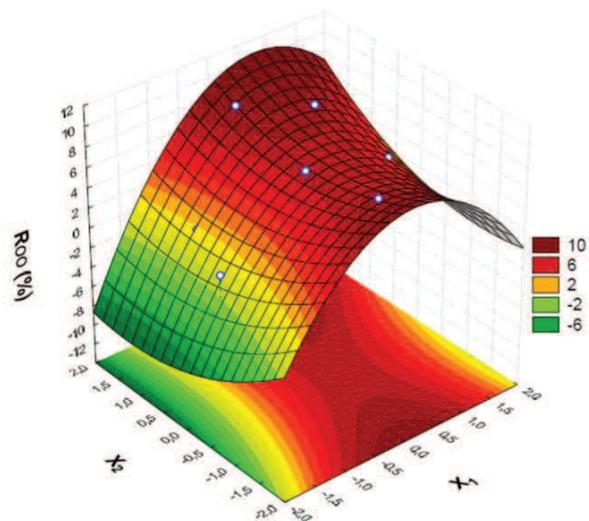
a)



b)



c)



Para a constante cinética k , os valores positivos do efeito quadrático da pressão (X_1^2) configuram um vale para a superfície de resposta da Figura 1.b., que indica um ponto de resposta mínima, e quer dizer que com regiões extremas do planejamento a velocidade de extração é maior. Já os efeitos lineares da pressão e temperatura (X_1 e X_2 , respectivamente) indicam que o aumento da pressão e a redução da temperatura podem favorecer a velocidade de extração.

Ao comparar a Figura 1.a com a Figura 1.c, observa-se que a temperatura exerce influência contrária sobre o rendimento global (R_∞) e o rendimento da etapa de taxa constante (R_{CER}). Enquanto um domo é formado na primeira, um vale é formado na segunda, demonstrando que para R_{CER} as condições extremas são ruins e para R_∞ são boas. Por isso o X_2^2 da equação 8 é negativo e da equação 10 é positivo. O fato de poder operar o equipamento em uma região com baixas temperaturas obtendo um bom rendimento acarreta na garantia da integridade das substâncias termossensíveis. Desse modo, a extração supercrítica com CO_2 pode apresentar grande vantagem em relação aos métodos convencionais, nos quais algumas vezes, obrigatoriamente, devem ser usadas altas temperaturas. Ainda, com emprego de temperaturas brandas, o consumo de energia é menor o que representa uma consideração econômica e ambiental a ser analisada.

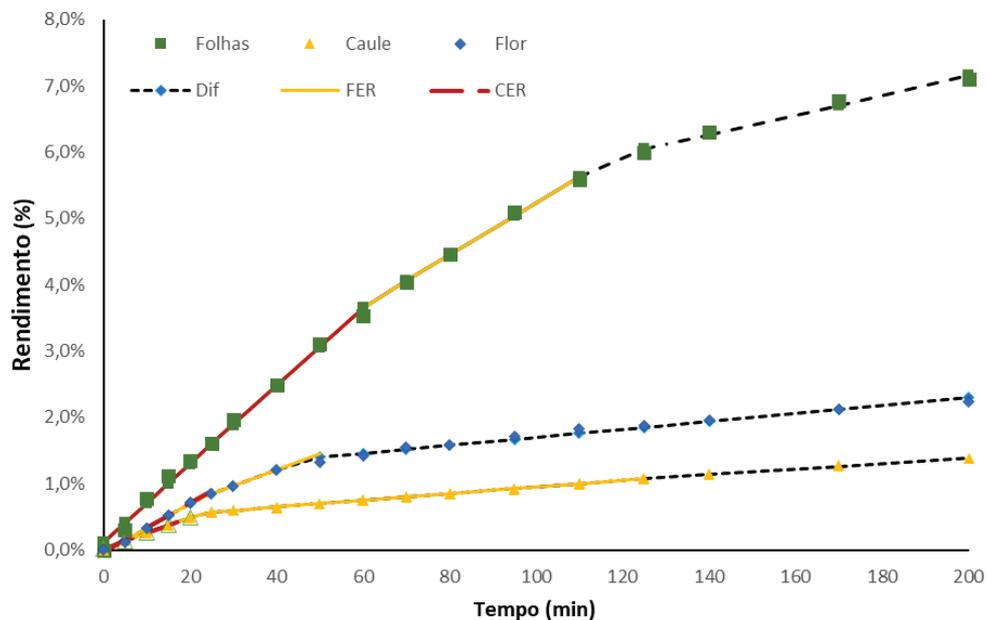
Através da análise das curvas de nível, ficou evidente que o modelo desenvolvido não é linear. Com isso, buscou-se uma técnica que se adaptasse a essas condições de otimização, sendo utilizada a função de desejabilidade do programa STATISTICA 7.0, que permite, obter os valores de ótimo dos parâmetros investigados. Isto é, conseguir converter as múltiplas variáveis respostas em uma única, combinando as respostas individuais em uma função composta, seguida por sua otimização (VERA CANDIOTI *et al.*, 2014). O valor para a desejabilidade foi de 0,81639, que é aceitável ($0 \leq d_i \leq 1$). Quanto maior o valor de D , mais conveniente é a resposta do sistema, ou seja, maior é a sensibilidade, sendo que o valor máximo de D é a condição otimizada do sistema.

3.2 CINÉTICAS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Os parâmetros que afetam o processo de extração supercrítica podem ser divididos em características do material e em parâmetros de processo (MARTÍNEZ; VANCE, 2007). Entre os parâmetros de processo destaca-se o tempo de operação. Nesta etapa, um estudo mais detalhado do processo de transferência de massa foi realizado. Nele, as condições otimizadas de pressão (32 Mpa) e temperatura (58°C) foram aplicadas para extração de compostos de

caules e flores da erva mate. Após realização dos experimentos e obtenção das respostas o modelo *Spline* ajustado aos pontos experimentais de rendimento. As curvas cinéticas (Figura 2), mostraram que a maior taxa de extração e o maior rendimento de extração por extração supercrítica com CO₂ foi das folhas seguido das flores e caules. As taxas de extração foram superiores no início do processo, e apresentam uma rápida redução na taxa de extração nos instantes seguintes. Curvas deste tipo representam cinéticas de extração tipo I, quando a matriz vegetal apresenta material extratível de fácil acesso ao solvente (CAVALCANTI, 2013). A primeira etapa é a extração do óleo de fácil acesso, onde a resistência à transferência de massa deve-se a fase solvente (CER); a segunda etapa é o esgotamento do óleo de fácil acesso do material particulado do início da célula extratora, iniciando o processo difusivo (FER); e a terceira é caracterizada predominantemente pelo mecanismo de difusão, onde há o esgotamento do óleo de fácil acesso ao longo de todo o leito de partículas.

Figura 2- Curvas cinéticas de extração supercrítica nas condições otimizadas (32 MPa e 58°C) de folhas, caules e flores de erva-mate e as respectivas etapas de transferência de massa: CER: taxa constante (convectivo), FER: taxa decrescente e Dif: difusão constante



Fonte: Autor (2019)

Cassel *et al.* (2010) observaram comportamentos cinéticos similares aos observados neste estudo para a ES-CO₂ aplicado a folhas de erva-mate. Outros autores também relatam curvas de extração semelhantes a estas para diferentes matrizes sólidas, tais como, bagaço de soja (ALVAREZ *et al.*, 2019), folhas de rabanete (GOYENECHÉ *et al.*, 2018), frutos de erva-

mate (FERNANDES *et al.*, 2017), sementes de coentro (ZEKOVIĆ *et al.*, 2017), *Eupatorium intermedium* (CZAIKOSKI *et al.*, 2015), gengibre (MESOMO *et al.*, 2012), erva doce (RODRIGUES *et al.*, 2002) e café (BRUNNER, 1994).

A intersecção entre as duas primeiras retas determina o término do período de taxa constante de extração (t_{CER}) e a intersecção entre a segunda e terceira reta determina o final do período de taxa decrescente de extração (t_{FER}), onde a partir deste ponto inicia-se o período de extração controlado pela difusão (DC). Quando o material possui alto conteúdo de extratíveis, a transferência de massa ocorre predominantemente em velocidade constante, sendo a velocidade de extração controlada pela solubilidade do substrato no solvente (MUKHOPADHYAY, 2000). Outros pesquisadores observaram a mesma tendência aplicado a extração supercrítica em plantas (MESOMO *et al.*, 2012; CZAIKOSKI *et al.*, 2015). Na Tabela 2, são apresentados os parâmetros cinéticos do modelo *Spline* aplicados as cinéticas de extração supercrítica de folhas, caules e flores de erva-mate.

Tabela 2- Parâmetros cinéticos do modelo *Spline* aplicados as cinéticas de extração supercrítica de folhas, caules e flores de erva-mate

Matéria Prima erva mate	Folhas	Caule	Flor
R_{∞} (%)	8,78	1,27	2,17
b_0 (g/g)·10³	1,213	0,170	-0,359
b_1 (g/g·min)·10³	3,72	1,51	2,33
b_2 (g/g·min)·10³	-1,24	-1,19	-1,14
b_3 (g/g·min)·10³	-1,542	-0,069	-0,822
t_{CER} (min)	60,59	22,69	23,89
t_{FER} (min)	117,91	133,34	66,30
Y_{CER} (g extrato/g CO₂)·10³	3,84	1,56	2,23
R_{CER} (%)	3,69	0,56	0,85
QM·10⁷	7,14	20,3	2,08
R^2	0,999	0,999	0,997

No caso das folhas de erva-mate, o rendimento de extração aumenta gradativamente com o decorrer da extração, atingindo 3,69% aos 60 min de extração (Tabela 2). Este valor coincide com o valor predito pelo modelo estatístico e corresponde ao rendimento da etapa convectiva (CER), sendo cerca de 44% dos compostos passíveis de serem extraídos nesta condição. No caso dos caules e das flores o rendimento da etapa convectiva (CER) corresponde a 0,56% (após 22 min) e 0,85% (após 23 min), respectivamente, demonstrando que esta etapa

corresponde a extração de em torno de 45% dos compostos extraíveis da erva mate por CO₂ supercrítico.

Além disso, verifica-se que as duas primeiras etapas da curva de extração (CER e FER) representam mais de 70% do rendimento global, sendo que aproximadamente 40% da eficiência do processo é devida à etapa de taxa constante de extração (CER) e o restante a taxa decrescente (FER). Estes resultados estão no intervalo de rendimentos sugerido por Pereira; Meireles (2010) e Jesus *et al.* (2013), ao justificar a relevância no período CER, uma vez que os fenômenos que ocorrem ao longo do processo. Assim como as características da matéria-prima, podem ser explicados pelo modelo.

Os valores de t_{CER} e R_{CER} representam aproximadamente o tempo mínimo que um ciclo ES-CO₂ deve durar e o rendimento mínimo de extração esperado em uma dada condição de processo (MEIRELES, 2008). Com esses parâmetros inicial pode-se prever o *scale-up* e a viabilidade econômica do processo pode ser investigada, fazendo a estimativa do custo de fabricação, como descrito por Rosa e Meireles (2005). O parâmetro t_{CER} , pode ser usado como uma estimativa inicial do tempo de ciclo quando se realizam investigações exploratórias sobre a viabilidade econômica do processo extração supercrítica.

Em relação aos coeficientes de transferência de massa, o coeficiente b_1 apresentou a mesma grandeza para os diferentes materiais (10^{-3}). Os valores negativos de b_2 indicam uma redução da taxa de extração, proporcional entre as folhas, caules e flores. Já o valor de b_3 é, em módulo, duas ordens de grandeza maior para as folhas que para os caules, indicando que a etapa difusiva na folha é mais predominante e importante que no caule ou que nas flores. Este perfil é característico quando já não há material extratível disponível e o arraste de extrato é menor devido a transferência de massa ser menor. Valores de Y_{CER} , R_{CER} e t_{CER} para diferentes materiais são apresentados na Tabela 3, onde destaca-se que a erva-mate possui valores típicos observados na literatura.

Tabela 3- Comparativo dos parâmetros t_{CER} , R_{CER} e Y_{CER} com a literatura

Matéria-prima	t_{CER} (min)	R_{CER} (%)	Y_{CER} (g/g CO ₂). 10 ³	Referências
Folhas erva-mate	60,59	3,69	3,84	Este trabalho
Caule erva-mate	22,69	0,56	1,56	
Flor erva-mate	23,89	0,85	2,23	
Farelo de arroz	70	9,4	3,98	Jesus <i>et al.</i> (2013)

A relação mássica de extrato obtido por solvente utilizado no período da etapa constante de extração a taxa constante (Y_{CER}) é de $3,84 \times 10^{-3}$ g/g para as folhas, $2,23 \times 10^{-3}$ g/g para as

flores e $1,56 \times 10^{-3}$ g/g para os caules. Este é um importante parâmetro no dimensionamento de sistemas de extração, pois está associado com o consumo de solvente pela planta de extração.

O estudo da cinética e modelagem da ES-CO₂ de erva-mate são ferramentas importantes para projetos de escala industrial. A modelagem das curvas de extração da erva-mate fornece informações sobre o mecanismo de transferência de massa na extração supercrítica, auxiliando a definição de metodologias para estudos de ampliação de escala. É possível dizer que uma das vantagens do modelo *spline* é que apenas os dados cinéticos da ES-CO₂ são suficientes para realizar a modelagem matemática das curvas globais de extração (JESUS *et al.*, 2013).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ERVA-MATE E EXTRATOS

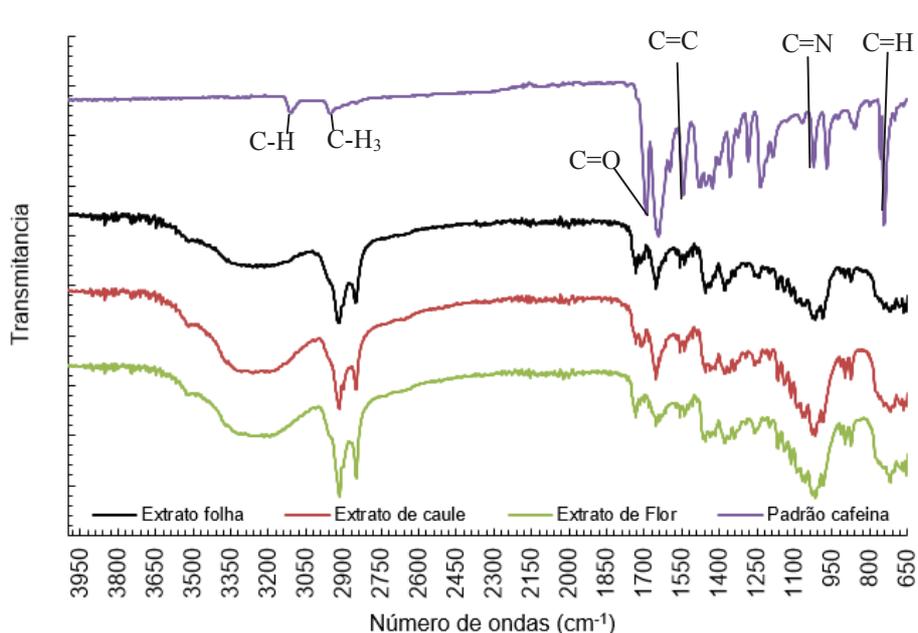
3.3.1 Caracterização de Grupos Funcionais por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A cafeína é um alcaloide, identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina e radicais semelhantes da teobromina, o que caracteriza a migração dos elementos na quantificação cafeína-teobromina. A Figura 3 apresenta os espectros de infravermelho, para os comprimentos de onda obtidos por FTIR, tanto para o padrão cafeína quanto para os extratos obtidos das folhas, caule e flor da erva-mate.

De acordo com os espectros de FTIR apresentados na Figura 3, observa-se na banda de 2952 cm^{-1} refere a ligação C-H da cafeína (R1 e R2). Para os extratos desta ligação é observado em 2920 cm^{-1} , 2918 cm^{-1} e 2916 cm^{-1} para os obtidos de folhas, caules e flores, respectivamente. Em 2849 cm^{-1} tem-se o grupamento metil (CH₃), que para o extrato das folhas que ficou em 2851 cm^{-1} . Em 1692 cm^{-1} de comprimento de onda observa-se a ligação C=O, que para os extratos é observado em 1733 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} e 1733 cm^{-1} para os obtidos de folhas, caules e flores, respectivamente, estes picos apresentam espectros de intensidade média – forte.

Em 1643 cm^{-1} observa-se a ligação C=C para a cafeína, para os extratos de folhas, caules é observado para ambos em 1653 cm^{-1} e para as flores em 1634 cm^{-1} . Os espectros apresentaram ainda bandas em torno de 1356 cm^{-1} , características de deformação angular C-H (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Porém comparando os espectros, observou-se estas pequenas diferenças na forma, assim como na intensidade de algumas bandas, e isso se deve às interações presentes nas misturas.

Figura 3- Espectro dos extratos ES-CO₂ das folhas, caules, flores e frutos da erva mate



Fonte: Autor (2019)

Já o número de onda 1237 cm^{-1} se refere a ligação de C-N, sendo 1257 cm^{-1} para o extrato das folhas e 1259 cm^{-1} para caule e flor de erva-mate. A ligação C=O apresenta os comprimentos de onda próximos tanto para cafeína quanto para os extratos, dentro da faixa de $1023\text{-}1028\text{ cm}^{-1}$. E por fim a ligação C-H com intensidade fraca com comprimento de onda para cafeína de 859 cm^{-1} , com deslocamento para os extratos em 773 , 760 e 767 cm^{-1} para folhas, caule e flor respectivamente.

Ao analisar os espectros, observou-se que o espectro da cafeína é muito semelhante aos espectros obtidos dos extratos da erva-mate. Além disso, a semelhança de estrutura química entre teobromina e cafeína, componente presentes nos extratos, sugere os deslocamentos de bandas. Em contrapartida, a redução da intensidade dos picos, em relação a linha de base é devido a presença de outras substâncias nos extratos, diluindo as metilxantinas cafeína e teobromina.

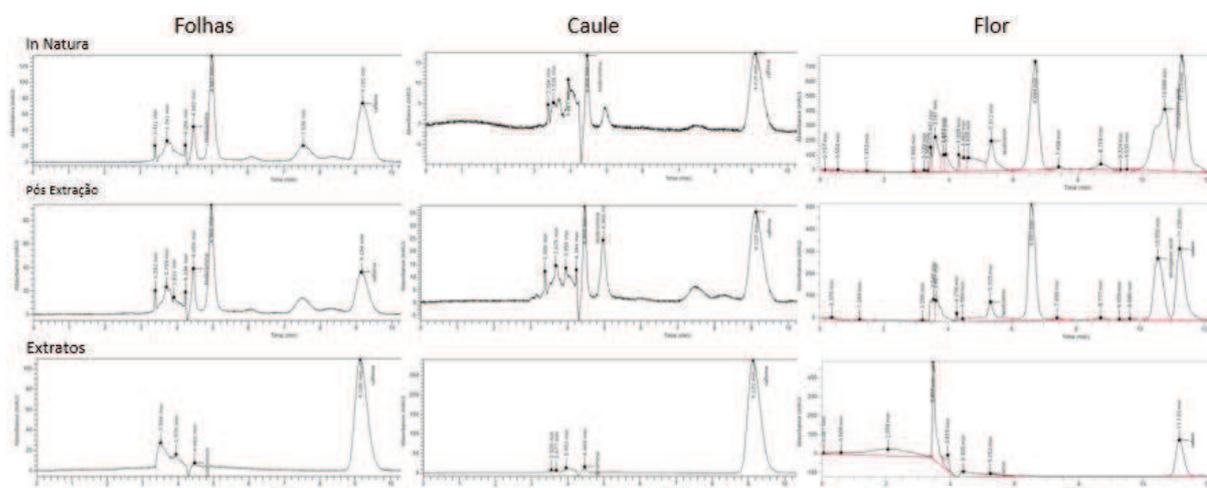
3.3.2 Determinação de Compostos Bioativos por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram avaliadas as composições químicas dos extratos e suas matérias-primas antes e pós a extração supercrítica com CO₂ quando obtidas sob condições ótimas (32 MPa e 58°C).

Os resultados obtidos das análises quantitativas CLAE para folhas Figura 4, os demais cromatogramas estão presente em material suplementar.

Os cromatogramas para folhas, caule e flores expressão similaridade dos picos, com diferentes áreas. De acordo com a caracterização cromatográfica a cafeína e teobromina como pode ser observado na Tabela 4, se destacaram em todas as amostras, sendo os dois alcaloides da família das metilxantinas.

Figura 4- Cromatogramas de folhas, caule e flor de erva mate do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C



A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos das análises quantitativas CLAE. Foram avaliadas as composições químicas dos extratos e suas matérias-primas antes e pós a extração supercrítica com CO₂ quando obtidas sob condições ótimas (32 MPa e 58 °C).

O composto majoritário a cafeína, para flores de erva-mate foi encontrado 2 vezes mais ao que para as folhas. Avaliando as amostras das folhas de erva-mate, todas são diferentes entre si a nível 95% de confiança. Quando observamos os extratos que foram coletados em períodos diferentes de extração, 10 min e 1h e 40min., notamos uma redução de 48% na concentração de cafeína. Isso ocorreu devido a atuação da taxa difusiva no período do segundo extrato coletado. Podemos acrescentar, que com isso os aspectos visuais também mudam quanto a cor, que passou de amarelo claro para cor mostarda escura e a viscosidade que passou de uma viscosidade inicial com formação de fios e final com formação de grânulos. Assim, acredita-se que com na etapa difusiva a cafeína estava próxima ao esgotamento na matéria prima, o CO₂ buscou a extrair outro composto bioativos.

Os extratos obtidos via extração supercrítica são puros, concentrados, e apresentaram em todas as partes da planta da erva-mate quantidades de 35,54 a 63,99 mg de cafeína por g de extrato e 9,64 a 48,03 mg de teobromina por g de extrato, predominando as maiores

concentrações de cafeína nos caules e teobromina nas flores. Este comportamento condiz com o que foi relatado por Cassel *et al.* (2010), que associa a extração supercrítica com CO₂ com potencial a descafeinação, quando apresentar maior concentração de cafeína nos extratos que na matéria-prima pós – extração. Os valores obtidos no extrato de erva-mate representam cerca 250 vezes mais concentrados que o obtido por Cardozo Junior *et al.* (2003), onde a maior concentração de cafeína obtida foi de 0,27 mg de cafeína por g de extrato de erva-mate também utilizando a extração supercrítica. Assim, a condição de temperatura e pressão de extração supercrítica otimizada pode ter colaborado com a obtenção de extratos mais concentrados.

Tabela 4 - Conteúdo de metilxantinas e polifenóis, presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES-CO₂ de pressão 32 MPa, temperatura 58 °C

Componente	Folha	Caule	Flor
Cafeína (mg / g)			
In natura	9,287 ^a ±0,19	2,265 ^a ±0,315	61,814 ^a ±2,202
After extraction	2,346 ^b ±0,046	2,693 ^a ±0,129	39,99 ^a ±3,366
Extract 10 min	35,541 ^c ±0,218	63,995 ^b ±<0,001	43,096 ^b ±1,196
Extract 1h 40 min	17,896 ^d ±0,438	-	-
Teobromine (mg / g)			
In natura	14,917 ^a ±1,769	7,299 ^a ±0,716	137,483 ^a ±3,661
After extraction	7,076 ^a ±1,483	7,526 ^a ±0,228	99,893 ^a ±59,903
Extract 10 min	5,483 ^a ±0,024	9,64 ^b ±<0,001	48,032 ^a ±11,586
Extract 1h 40 min	6,431 ^b ±1,483	-	-
Catequin (mg / g)			
In natura	NI	NI	136,079±6,282
After extraction	NI	NI	145,756±50,88
Extract	NI	NI	NA
Epicatequin (mg / g)			
In natura	NI	NI	5,569±0
After extraction	NI	NI	NI
Extract	NI	NI	NA
Rutin			
In natura	NI	NI	8,415±0,129
After extraction	NI	NI	6,805±0,086
Extract	NI	NI	NA

*NA: Não foi possível aplicar essa metodologia ao extrato das flores de erva-mate. NI: não identificado

Grande parte deste alcaloide a cafeína, é considerado um estimulador orgânico, habitualmente ingerido na forma de bebidas. Uma xícara de café pode conter em média de 80 mg de cafeína, enquanto uma lata de refrigerante cola tem em torno de 30 a 41 mg (ANDRADE *et al.*, 1995; MCNERNEY; COAD; BURKARD, 2014). Conforme Saldaña *et al.* (1999),

Esmelindro *et al.* (2004), Cassel *et al.* (2010), Dartora *et al.* (2011), Fernandes *et al.* (2016) e Fernandes *et al.* (2017), a tecnologia de extração com CO₂ supercrítico aplicada a erva-mate tem maior seletividade para cafeína seguido de teobromina. Os resultados alcançados neste trabalho sugerem que a solubilidade é definida como a máxima concentração de soluto (erva-mate) dissolvido na fase solvente (GUPTA; SHIM, 2007). A cafeína possui uma interação solvente-soluto menos energética do que a teobromina, isto é, a cafeína possui um menor benefício energético para os solventes pertencentes a primeira camada de solvatação. Apesar disso, a solubilidade da cafeína é pelo menos duas ordens de grandeza superior da teobromina, reforçando a tese de que as solubilidades dessas dimetilxantinas são dependentes das interações soluto-solvente (SALDAÑA *et al.*, 1999).

A extração supercrítica pode ser considerada um dos novos métodos de extração potencialmente útil na obtenção de compostos de alto valor agregado, por fornecer extratos livres de solventes e sem o risco de degradação térmica. A seletividade do processo de extração supercrítica pode ser manipulada pela escolha do solvente, pelo controle da pressão e da temperatura do processo, fluxo de solvente e ainda, pelo uso de cossolventes (AGHEL *et al.*, 2004).

3.3.3 Avaliação de Capacidade Antioxidante por FRAP e Determinação de Fenólicos Totais (FT)

Na avaliação do potencial redutor do ferro e a determinação dos fenóis totais (FT), são expressos na Tabela 5.

As amostras foram avaliadas quanto a capacidade de redução através do seu potencial antioxidante (FRAP). Os potenciais antioxidantes dos extratos de folhas, caules e flores da erva-mate foram estimados por sua capacidade de reduzir, e baseia-se na redução do ferro (Fe³⁺ → Fe²⁺) e não na captura de radicais livres como outros métodos tradicionais (MOTTA *et al.*, 2013).

Os extratos das folhas, caules e flores de erva-mate, quanto ao potencial antioxidante obtiveram valores de 1,676 a 4,1 µg.g⁻¹, sendo que o extrato do caule apresentou o maior valor de atividade antioxidante. Observa-se também que em duas situações há um aumento na atividade antioxidante presente na matéria-prima pós-extração das folhas e flores. Isso ocorreu devido as matérias primas permanecerem a 58°C por 200 min durante a extração, ocasionando uma ativação na ação antioxidante pela presença.

Já para a presença de fenólicos totais os extratos supercríticos de folhas, caule e flores de erva-mate, apresentam valores de 0,101 a 0,254 µg.g⁻¹ de extrato, sendo o maior valor para

o extrato das folhas seguido das flores de erva-mate. Mesa *et al.*, (2002) afirmam que os flavonoides estão presentes em quase todas as plantas, principalmente nas partes aéreas, mas variam qualitativamente de uma planta para outra. Rufino *et al.*, (2010) classificam o teor de polifenóis em três categorias: baixo (< 10 mg/g), médio (10-50 mg/g e alto (> 50 mg/g), baseadas em material vegetal seco. Desta forma, considera-se baixa a concentração de fenólicos totais presentes nos extratos supercríticos de erva-mate. Porém, Fernandes *et al.* (2017) obtiveram valores de compostos fenólicos totais em torno de 0,09 mg/g de extratos, sendo aproximadamente 2,5 vezes inferior aos extratos de folhas e flores de erva mate deste trabalho.

Tabela 5- Concentração de fenólicos totais e ação antioxidante presente nas amostras de folha, caule e flor: in natura, pós extração e extratos nas condições de extração ES-CO₂ de pressão 32 MPa, temperatura 58°C

Composto/Amostra	Folhas	Caule	Flor
Fenólicos Totais (µg. g amostra⁻¹)			
In Natura	1,058±0,144	0,48±0,051	0,914±0,029
Após extração	0,838±0,026	0,509±0,013	0,042±0,012
Extrato	0,254±0,122	0,101±0,025	0,249±0,046
FRAP (µg. g amostra⁻¹)			
In Natura	10,618±0,15	20,263±5,06	9,845±1,785
Após extração	19,765±1,858	11,203±1,803	14,746±1,684
Extrato	1,557±0,121	4,100±0,517	1,676±0,062

Comparando as matérias-primas *in natura* com os extratos, tanto para as folhas, os caules e flores, pode ser observado uma queda de 73,9% para antioxidantes e 83,2% fenólicos totais. De modo geral, os compostos fenólicos são caracterizados como polares, e por isso são mais facilmente solubilizados em solventes de maior polaridade, por isso os extratos apresentam valores inferiores devido a afinidade do CO₂ a compostos apolares. Assim é importante salientar, a característica de solubilidade dos fenólicos presente neste extrato, onde o caráter hidrofílico de tais substâncias melhora significativamente a resposta à oxidação. Este fato foi observado por Porter (1993), que descreveu o “paradoxo antioxidante” como um fenômeno no qual sequestradores de radicais livres hidrofílicos são antioxidantes mais efetivos do que os sequestradores de radicais livres hidrofóbicos em emulsões de óleo (Moreira, 1999).

Os conteúdos de compostos fenólicos reportados na literatura, por métodos convencionais de extração aquosa, variam de 75,9 a 88,5 mg.g⁻¹ erva-mate verificado por Turner *et al.* (2011), 80-95,9 mg.g⁻¹ extrato verificado Donaduzzi *et al.* (2003). Isto faz com que

se compreenda a afinidade do CO₂ com os compostos apolares e justifica o uso de cossolventes para a potencialização quando a busca é por compostos polares.

4 CONCLUSÃO

A extração supercrítica com CO₂ foi aplicada para a obtenção de extratos de diferentes partes da erva-mate. As condições de extração sobre as folhas de erva-mate foram otimizadas em 32 MPa e 58°C, obtendo-se valores ótimos de rendimento da etapa de taxa constante, constante cinética de extração e rendimento global de 3,69 %, 0,0088 min⁻¹ e 8,78%, respectivamente.

As condições otimizadas de extração foram aplicadas para a obtenção de extratos de caules e flores de erva-mate, obtendo-se rendimentos globais de 1,37% e 2,24%, respectivamente.

As cinéticas de extração foram avaliadas através do modelo *spline*, que considera três etapas de transferência de massa. O modelo ajustou-se adequadamente aos dados experimentais, apresentando coeficientes de determinação (R²) superiores a 0,99. O tempo da etapa de taxa constante (CER) foi determinado entre 23,7 e 60,6 min, sendo esta etapa responsável pela obtenção de 40 % do extrato.

A caracterização dos extratos mostrou que o CO₂ tem maior seletividade para a extração de cafeína e teobromina. Os extratos de flores, caules e flores apresentaram 35,5 e 5,5 mg/g, 63,9 e 9,6 mg/g e 43,1 e 48 mg/g de cafeína e teobromina, respectivamente. A capacidade antioxidante dos extratos e a presença de compostos fenólicos foi determinada, sendo considerada baixa, devido a baixa afinidade do CO₂ por compostos com estas características.

Em condições otimizadas a ES-CO₂ é uma técnica viável para a obtenção de extratos de erva-mate, com potencial aplicação em alimentos, contribuindo para a valorização da cadeia produtiva deste produto.

REFERÊNCIAS

AGHEL, N.; YAMINI, Y.; HADJIAKHOONDI, A.; POURMORTAZAVI, S.M. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Talanta**, v. 62, p. 407-11, 2004.

ALKHATIB, A.; SEIJO, M.; LARUMBE, N.F. Acute effectiveness of a “fat-loss” product on substrate utilization, perception of hunger, mood state and rate of perceived exertion at rest and during exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 12. n. 44. 2015.

ALVAREZ, M. V.; CABRED, S.; RAMIREZ, C. L.; FANOVICH, M. A. Valorization of an agroindustrial soybean residue by supercritical fluid extraction of phytochemical compounds **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 143, p. 90–96, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.012>.

ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H. L. C.; LOPES, W. A.; MARTINS, S., AMORIM, A. M. M.; BRANDÃO, A. M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Química Nova*. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, SP, Brasil; v.18, p. 379-81, 1995.

ANDRICH, G.; NESTI, U.; VENTURI, F.; ZINNAI, A.; FIORENTINI, R. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.** v.107, p.381–386, 2005. DOI 10.1002/ejlt.200501130.

ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; PEDRAZZOLI, J.; DE SOUZA, M. F.; SAAD, M. J.; BASTOS, D. H.; CARVALHO, Pde. O.; RIBEIRO, M. L. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 17, n. 12, p. 2127–2133, 2009.

BARRETO Jr, A. G.; BISCAIA Jr, E. C. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de cabaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 719-722, 2005.

BELIZÓN, M.; FERNÁNDEZ-PONCE, M. T.; CASAS, L.; MANTELL, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA-FERNÁNDEZ, E. J. Supercritical impregnation of antioxidant mango polyphenols into a multilayer PET/PP food-grade film. **Journal of CO₂ Utilization** v.25, p.56–67, 2018. doi:10.1016/j.jcou. 2018.03.005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of Antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* *St. Hil* extracts are potent inhibitors of nitro sative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci.** v.77, p.345-358, 2005.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation process**. Darmstadt, Alemanha: Steikopff, Springer, p. 387,1994.

- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing, **J. Food Eng.** v.67, p. 21–33, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.060>.
- CARDOZO JUNIOR, E. L.; CARDOZO-FILHO, L.; STURION, J. A.; DONADUZZI, C. M.; URIO, H.; ZANOELO, E. F. Análise de metilxantinas em dezesseis progênes de erva mate extraídas por dióxido de carbono supercrítico. In: Congresso Sul-Americano Da Erva-Mate, cap. 3., 2003, Chapecó. Anais. Chapecó: **EPAGRI**. s. 2-6, 2003.
- CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W.; ALMEIDA, D. E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 656–661, 2010. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015.
- CAVALCANTI, R. N. **Extração de antocianinas de resíduo de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando liquido pressurizado e fluido supercrítico: caracterização química, avaliação econômica e modelagem matemática**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, f. 197, 2013.
- CEJUDO BASTANTE, C.; CASAS CARDOSO, L.; MANTELL SERRANO, C.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E. J. Supercritical impregnation of food packaging films to provide antioxidant properties. **The Journal of Supercritical Fluids** v. 128, p. 200–7, 2017. doi:10.1016/j.supflu.2017.05.034.
- CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; DE PAULA SCHEER, A.; DALLA SANTA, O. R.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Kinetics, composition and biological activity of Eupatorium intermedium flower extracts obtained from SCCO₂ and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, 97, 145–153, 2015. doi:10.1016/j.supflu.2014.10.008
- CZAIKOSKI, K.; MESOMO, M. C.; KRUEGER, R. L.; QUEIROGA, C. L.; CORAZZA, M. L. Extraction of Campomanesia xanthocarpa fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments, **J. Supercrit. Fluids**, v. 98, p. 79–85, 2015.
- DARTORA, N.; SOUZA, L. M.; SANTANA-FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; VALDUGA, A. T.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. **Food Chemistry**, v.129, p.1453–1461, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.112.
- DIAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2441–2469, 2006.
- DONADUZZI, C. M.; CARDOZO JR., E. L.; DONADUZZI, E. M.; SILVA, M. M.; STURION, J. A.; CORREA, G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis

progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v. 7, n. 2, p. 129-134, 2003.

ESMELINDRO, A. A.; GIRARDI, J. D.; MOSSI, A.; JACQUES, R. A.; DARIVA, C. Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30°C and 175 bar. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 1990–1995, 2004.

FAVARETTO, A. **ASPECTOS ALELOPÁTICOS, FITOQUÍMICOS E ANATÔMICOS DO CAPIM-ANNONI-2**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, f. 118, 2014.

FERNANDES, C. E. F.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; DAL MAGRO, J.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**. v. 81, p. 139–146, 2016.

FERNANDES, C. E. F.; SCAPINELLO, J.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; DALL MAGRO, J.; PALLIGA, M.; OLIVEIRA, J. V.; TRES, M. V. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 1, p. 98–104, 2017. DOI 10.1007/s13197-016-2440-4.

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

GOYENECHÉ, R.; FANOVICH, A.; RODRIGUES, C. R.; NICOLAO, M. C.; DI SCALA, K. Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from radish leaves: Yield, antioxidant capacity and cytotoxicity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.135, p. 78–83, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.004>

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v.35, p.47–56, 1995.

GUPTA, R. B.; SHIM, J. J. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. **CRC Press. Boca Raton**, p. 909, 2007.

HAUSCHILD, S. D.; ADAMI, F. S. Relação entre consumo de macronutrientes e cafeína com o estado nutricional e composição corporal. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo. v.12. n.75. Suplementar 1. p.851-858. Jan./Dez., 2018. ISSN 1981-9919

- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.
- JESUS, S. P., CALHEIROS, M. N., HENSE, H., MEIRELES, M. A. A. An simplified model to describe the kinetic behavior of supercritical fluid extraction from a rice bran oil by product. **Food Public Health**, n. 3, p. 215–222, 2013.
- KANG, Y. R.; LEE, H. Y.; KIM, J. H.; MOON, D. I.; SEO, M. Y.; PARK, S. H.; CHOI, K. H.; KIM, C. R.; OH, J. H.; CHO, S. W.; KIM, S. Y.; KIM, M. G.; CHAE, S. W.; KIM, O.; OH, H. G. Antiobesity and anti-diabetic effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**. v. 28, n. 1, p. 23-29, 2012.
- LIMA, W.P. CARNEVALI JR, L. C., EDER, R., ROSA, L. F. B. C., BACCHI, E. M., & SEELAENDER, M. C. Lipid metabolism in trained rats: Effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v.24, p. 1019-1028, 2005.
- MAQ'NAGUA – Máquinas para engarrafamento e Higienização. **Unidade de Extração Supercrítica**. Marcelo Máquinas Ind. Com. Ltda - ©, Rua Antonio Novaes, 230 - Centro, Serra Negra - SP - Cx. Postal 137 - CEP 13930-000, 2017.
- MARTÍNEZ, J. L.; VANCE, S. W. Fundamentals of Supercritical Fluids Technology. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**. Boca Raton: **CRC Press**, p. 25–49, 2007.
- MCNERNEY, K.; COAD, M. L.; BURKARD, R. The influence of caffeine on caloric and cervical vestibular evoked myogenic potentials (cVEMPs). **J Am Acad Audiol.**; v. 25, p. 261-267, 2014.
- MEIRELES, M. A. A. Extraction of bioactive compounds from Latin American plants, p. 243-274, in: J. Martinez (Ed.) “Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds”, **CRC Press – Taylor & Francis Group**, USA, 2008.
- MELLO, D. R. DE. Resolução RDC no 277, de 22 de setembro de 2005 ementa não oficial: Aprova o“ **REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS**” Diário Oficial da União Poder Executivo, 2005.Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40512000474583248e6ede3fbc4c6735/informe_45.pdf?mod=ajperes>.
- MESOMO, M. C.; SCHEER, A. P.; PEREZ, E.; NDIAYE, P. M.; CORAZZA, M. L. Ginger (*Zingiberoffinale*R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102-109, 2012.

MONTGOMERY, M. D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística e probabilidade para engenheiros**. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2 ed., 2003.

MOREIRA, A. V. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba, L.*). I- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação**, Dissertação (Mestre) – Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, f.120, 1999.

MOTTA, E. V. S.; PINTO, N. C. C.; DUQUE, A. P. N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P. M. Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MUKHOPADHYAY, M. Natural extracts using supercritical carbon dioxide. **Boca Raton: CRC Press**, p.132-133, 2000.

PANTIĆ, M.; KNEZ, Z.; NOVAK, Z. Supercritical impregnation as a feasible technique for entrapment of fat-soluble vitamins into alginate aerogels. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.432, p. 519–26, 2016. doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2015.11.011.

PARK, H.; LEE, H.; SHIN, M.; LEE, K.; KIM, Y.; KIM, K. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, **Food Chem.** v.105, p. 1011–1017, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.064>.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. Springer, **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; CAZAROLLI, L. H.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; GUESSER, S. M.; DA SILVA, E. L.; SILVA, F. R. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

PERRUT, M., CLAVIER, J.Y., POLETO, M., REVERCHON, E., Mathematical modeling of sunflower seed extraction by supercritical CO₂. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 36, p. 430–435, 1997.

PIMENTEL, G. D. *et al.* Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–818, 2012.

PORTER, W. L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. In: WILLIAN, G. M. ed. **Antioxidants: Chemical, physiological, nutritial and toxicological aspects**, Princeton: Princeton Sientific, p.93-122, 1993.

- PRADO, J.M.; DALMOLIN, I.; CARARETO, N.D.D.; BASSO, R.C.; MEIRELLES, A.J.A.; OLIVEIRA, J.V.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELES, M.A.A. "Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation", **Elsevier, The Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 249-257, 2012.
- PRADO, J.M.; PRADO, G.H.C.; MEIRELES, M.A.A. "Scale-up study of supercritical fluid extraction process for clove and sugarcane residue", **Elsevier, The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 231-237, 2011. doi:10.1016/j.supflu.2010.10.036.
- RIVELLI, D. P.; SILVA, V. V. D.; ROPKE, C. D.; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. D. M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, p. 215–222, 2007.
- RODRIGUES, V. M.; SOUZA, E. M. B. D.; MONTEIRO, A. R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M. O.; MEIRELES, M. A. A. Determination of solubility of extracts from vegetable raw materials in pressurized CO₂: a pseudo ternary mixture formed by cellulosic structure + solute + solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 21-36, 2002.
- ROJAS, A.; TORRES, A.; JOSÉ GALOTTO, M.; GUARDA, A.; JULIO, R. Supercritical impregnation for food applications: a review of the effect of the operational variables on the active compound loading. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1–12, 2019. doi:10.1080/10408398.2019.1567459
- ROSA, P.T.V.; MEIRELES, M.A.A. "Rapid estimation of the manufacturing cost of extracts obtained by supercritical fluid extraction", **Elsevier, Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 235-240, 2005.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F. D.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996-1002, 2010.
- SALDAÑA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; BAER, M. G.; MAZZAFERA, P.; BRUNNER, G. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguayensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.
- SANTANA, Á. L. Determinação dos Parâmetros de Transferência de Massa do Processo de extração Supercrítica, **Master Thesis**. Federal University of Pará, Belém, Brazil, 2013.
- SANTANA, Á. L. **Validation of an alternative algorithm implemented in MS Excel for modeling supercritical fluid extraction kinetics: application to amazonian fruits**. In: COBEQ 2016 – XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza, Brazil, 2016.

- SANTOS, J. L. Projeto de uma Unidade de Extração Supercrítica Empregando Simulador de Processos, **Master Thesis**. Federal University of Pará, Belém, Brazil, 2007.
- SCHEFFER-BASSO, S. M.; CHINI, S. O.; BERTOL, C. D.; ESCOSTEGUY, P. A. V. Variabilidade espaço-temporal de compostos fenólicos em *Lotus corniculatus*. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, ed.2: p. 394-397, 2018. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA18034>
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- SILVESTRE, J. C.; GIANONI, R; PEREIRA, P. E. Caffeine and exercise: metabolism and action mechanisms, **Revista Brasileira de Fisiologia do Exercício**; v. 17, ed.2, p.130-7, 2018.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144-58, 1965.
- TAKETA, C. S. C.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P.; SPITZER, V.; **Lebensmittel chemie**, v. 52, p. 20. 1998.
- TELLO, J.; VIGUERA, M.; CALVO, L. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora var Robusta*) husks using supercritical carbon dioxide, **J. Supercrit. Fluids**, v. 59, p. 53–60, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2011.07.018>.
- TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J.Chromatog. B**, v. 812, p. 85-99, 2004.
- TURNER, S.; COGOI, L.; ISOLABELLA, S.; FILIP, R.; ANESINI, C. Evaluation of the Antioxidant Activity and Polyphenols Content of *Ilex paraguariensis* (Mate) During Industrialization. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 23-30, 2011. ISSN: 2042-4876.
- VERA CANDIOTI, L. *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.
- WEIDNER, E. Impregnation via supercritical CO₂—What we know and what we need to know. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 134, p. 220–7, 2018. doi:10.1016/j.supflu.2017.12.024.
- YILDIRIM, S.; REOCKER, B.; PETTERSEN, M. K.; NILSEN-NYGAARD, J.; AYHAN, Z.; RUTKAITE, R.; RADUSIN, T.; SUMINSKA, P.; MARCOS, B.; COMA, V. Active packaging applications for food. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**, v.17, ed.1, p.165–99, 2018. doi:10.1111/15414337.12322.
- ZEKOVIĆ, Z.; BERA, O.; ĐUROVIĆ, S.; PAVLIĆ, B. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Kinetics modelling and ANN optimization. **J. of Supercritical Fluids**, v. 125, p. 88–95, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.02.006>

APÊNDICE B – Tabela Cinética

Ensaio	Variáveis									
	Pressão / Temperatura (MPa/°C)	b0 (g/g)	b1 =M_CER (g/gmin)	b2 (g/gmin)	b3 (g/gmin)	t_CER (min)	t_FER (min)	Y_CER (g extrato/g CO2)	R_CER (%, g extrato/g solidos)	SS
22,5MPa/35,9°C	-5,94E-04	2,48E-03	-7,80E-04	-5,41E-04	31,931	123,055	0,00236	0,0119	1,7574E-06	1,4645E-07
11,9 MPa/ 50°C	1,37E-05	7,30E-05	2,17E-05	-8,01E-05	30,000	52,584	0,00008	0,0004	8,9563E-09	7,4636E-10
33MPa/50°C	-4,01E-04	4,47E-03	-3,03E-03	-8,18E-04	34,095	79,441	0,00440	0,0237	2,2525E-06	1,8771E-07
15MPa/40°C	-1,83E-04	7,75E-04	-4,55E-04	-2,70E-04	33,419	107,623	0,00074	0,0039	5,8542E-07	5,8542E-07
15MPa/60°C	1,40E-05	9,49E-05	-5,16E-05	2,40E-05	63,723	120,000	0,00010	0,0010	6,3505E-08	6,3505E-08
30MPa/40°C	2,07E-04	5,04E-03	-2,60E-03	-1,81E-03	21,280	69,539	0,00511	0,0172	9,0306E-06	9,0306E-06
30MPa/60°C	5,77E-04	4,08E-03	-1,38E-03	-1,50E-03	32,703	92,059	0,00420	0,0217	2,6182E-05	2,6182E-05
22,5MPa/50°C	-1,06E-03	2,22E-03	-7,16E-04	-8,43E-04	55,284	98,386	0,00210	0,0184	4,1688E-06	4,1688E-06

APÊNDICE C – ANOVA Caracterização físico-química Erva-Mate

Tabela C- ANOVA da caracterização físico-química da erva-mate

Composto	SS	GL	MS	F	p
Folhas					
Caffeine	1233,214	3	411,071	5917,26	9,51E-08
Error	0,278	4	0,069		
Teobromine	113,1665	3	37,7222	27,1426	0,004046
Error	5,5591	4	1,3898		
Caule					
Caffeine	5045,793	2	2522,897	65187,42	1,10E-07
Error	0,116	3	0,039		
Teobromine	6,6651	2	3,3325	17,711	0,021817
Error	0,5645	3	0,1882		
Flor					
Caffeine	714,08	2	357,04	63,594	0,000930
Error	22,46	4	5,61		
Teobromine	9606,45	2	4803,23	5,12417	0,078812
Error	3749,47	4	937,37		

APÊNDICE D – Protocolo da Análise de Antioxidantes- FRAP

1) *Preparo de soluções:*

- HCl 0,05 M: Pipetar 2 mL de HCl e completar para 500 mL em água destilada.
- Ácido cítrico 5 mM: Pesar 0,2625 g de ácido cítrico e diluir para 250 mL de água destilada.

Obs: Para 50 mL – pesar 0,0525 g ácido cítrico.

- FeCl₃ 3 mM (Cloreto férrico): Pesar 0,1216 g de cloreto férrico e diluir para 250 mL de **ácido cítrico 5 mM**.

Obs: Para 100 mL – 0,04864 de cloreto férrico / 50 mL – 0,02432 g de cloreto férrico

- TPTZ: Pesar 0,078 g de TPTZ e diluir para 250 mL de HCl 0,05 M.

Obs: Para 100 mL – 0,0312 g de TPTZ em HCl

2) *Leitura das amostras:*

- Adicionar 200 µL (0,2 mL) de água destilada para realizar o tubo do Branco;
- Adicionar 200 µL (0,2 mL) do extrato para tubos de ensaio;
- Adicionar 200 µL (0,2 mL) da solução cloreto férrico 3 mM;
- Deixar em repouso em banho-maria a 37 ° C durante 30 min;
- Adicionar 3600 µL (3,6 mL) da solução TPTZ nos tubos das amostras e no branco;
- Agitar em vortex durante 5 seg;
- Deixar em ambiente escuro durante 10 minutos;
- Zerar o espectrofotômetro com o branco em 620 nm;
- Realizar a leitura (triplicata) em 620 nm.

3) *Curva padrão de FRAP (Trolox)*

3.1) **Preparo da solução Padrão:**

- Solução padrão de ácido gálico: Dissolver 2,503 mg (0,0025 g) de ácido gálico em 200 µL de metanol puro (100%) em balão volumétrico de 10 mL, esperar até desaparecer os cristais e completar o volume com água deionizada. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Tabela D- Preparo das soluções para a curva padrão de FRAP

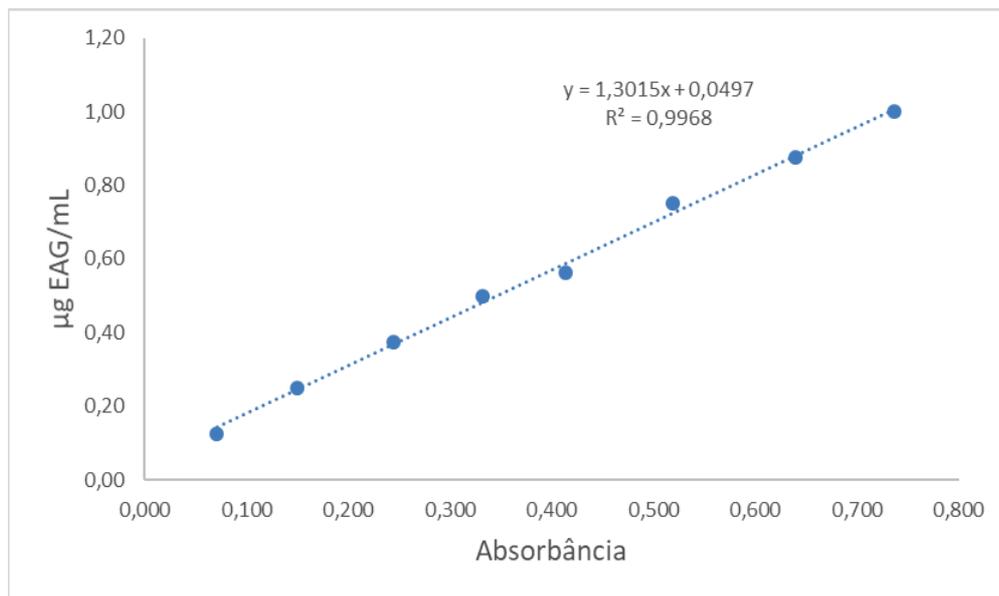
Curva padrão atividade antioxidante - FRAP						
Solução Mãe EAG (g EAG/mL)	µL EAG	µg EAG/mL	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
0,00025	80	1,00	0,763	0,707	0,738	0,736
	70	0,88	0,657	0,637	0,625	0,640
	60	0,75	0,538	0,501	0,518	0,519
	55	0,69	0,446	0,441	0,464	
	45	0,56	0,406	0,412	0,422	0,413
	40	0,50	0,348	0,331	0,316	0,332
	35	0,44	0,298	0,317	0,332	
	30	0,38	0,247	0,226	0,261	0,245
	20	0,25	0,153	0,139	0,156	0,149
	10	0,13	0,079	0,059	0,074	0,071

Fonte: Autor (2019)

3.2) Leitura das amostras:

- **Fazer os tubos em triplicata para realizar as leituras;**
- Transferir uma alíquota de 200 µL (0,2 mL) de cada solução de trolox (10 µL; 20 µL; 30 µL; 35 µL; 40 µL; 45 µL; 55 µL; 60 µL; 70 µL; 80 µL) para tubos de ensaio;
- Transferir uma alíquota de 200 µL (0,2 mL) de água destilada para realizar o tubo do Branco
- Adicionar 200 µL da solução cloreto férrico 3 mM;
- Deixar em repouso em banho-maria a 37 °C durante 30 min;
- Adicionar 3600 µL (3,6 mL) da solução TPTZ nas amostras e no branco;
- Deixar em ambiente escuro durante 10 minutos;
- Realizar a leitura em 620 nm;

Figura D- Curva padrão para análise de FRAP em μ ácido gálico.mL⁻¹



Fonte: Autor (2019)

APÊNDICE E – Protocolo da Análise de Fenólicos Totais -FT

1) *Leitura das amostras:*

- Adicionar 1 mL metanol para realizar o tubo do Branco;
- Adicionar 1 mL do extrato para tubos de ensaio;
- Adicionar 5 mL de água destilada;
- Adicionar 1 mL de metanol;
- Adicionar 0,5 mL de RFC;
- Agitar em vortex por 3 segundos;
- Adicionar 1 mL de NaCO₃;
- Deixar em repouso ao abrigo de luz durante 1 hora;
- Adicionar 3600 µL (3,6 mL) da solução TPTZ nos tubos das amostras e no branco;
- Zerar o espectrofotômetro com o branco em 765 nm;
- Realizar a leitura (triplicata) em 765 nm.

2) **Curva padrão de Fenólicos Totais (Equivalente de ácido Gálico –EAG)**

1) *Preparo de soluções:*

- Solução padrão de Ácido Gálico: Dissolver 1 mg (0,001 g) de ácido gálico em 1mL de metanol puro (100%), esperar até desaparecer os cristais e completar o volume com água deionizada. Preparar e usar apenas no dia da análise.

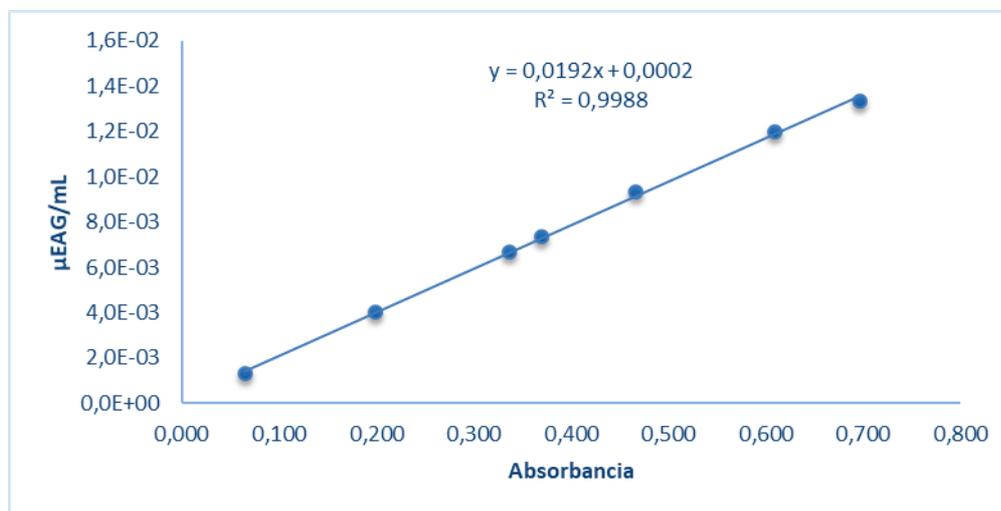
Tabela E- Preparo das soluções para a curva padrão de Fenólicos Totais

Curva padrão Fenólicos Totais						
Solução Mãe EAG (g EAG/mL)	µL EAG	µg EAG/mL	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
0,001	1	1,33E-02	0,736	0,653	0,702	0,697
	0,9	1,20E-02	0,613	0,573	0,642	0,609
	0,7	9,33E-03	0,444	0,463	0,49	0,466
	0,55	7,33E-03	0,37	0,369	0,37	0,370
	0,5	6,67E-03	0,318	0,349	0,343	0,337
	0,3	4,00E-03	0,186	0,208	0,204	0,199
	0,1	1,33E-03	0,072	0,068	0,056	0,065

Fonte: Autor (2019)

2) *Leitura das amostras:*

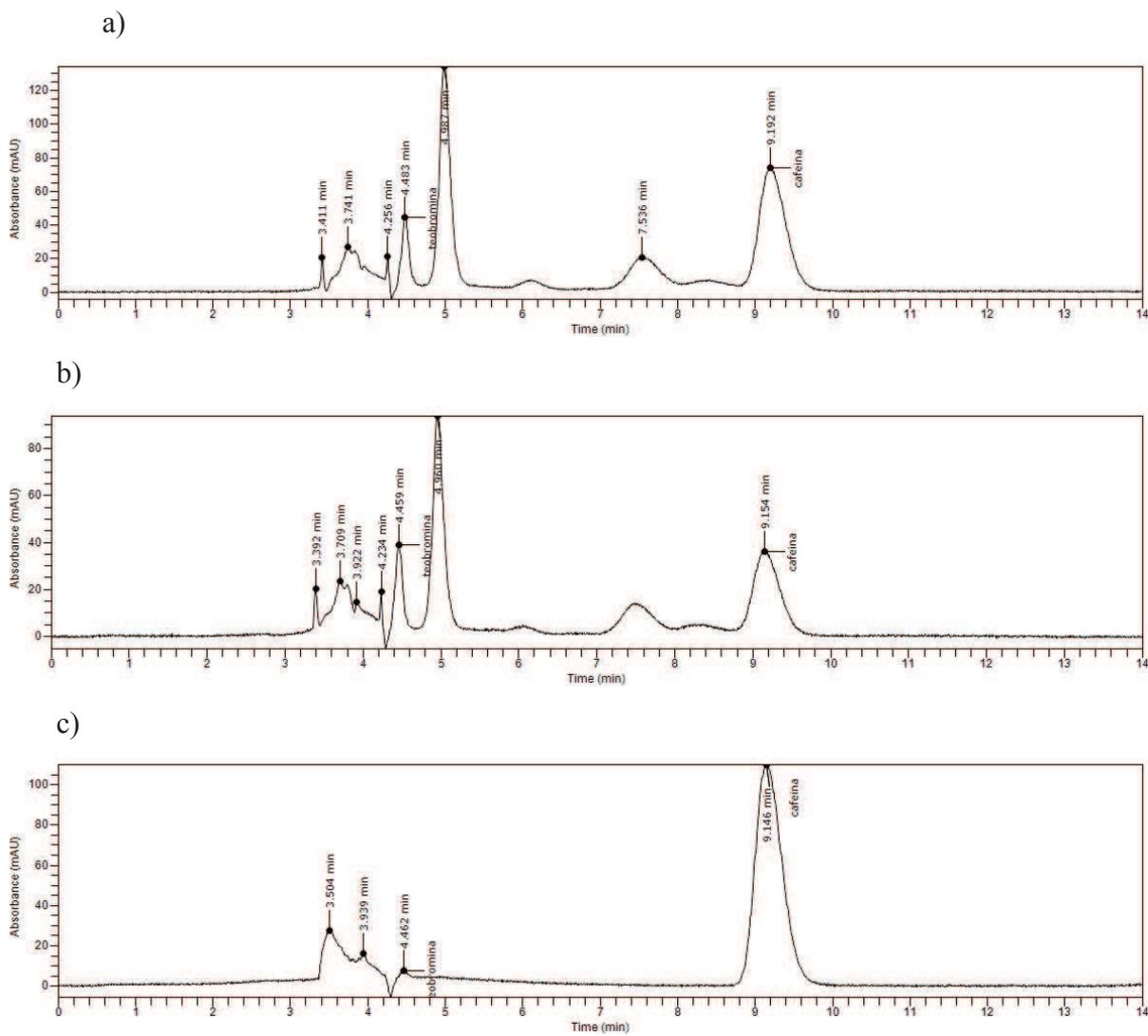
- **Fazer os tubos em triplicata para realizar as leituras;**
- Transferir uma alíquota de 1 mL de cada solução de ácido gálico (0,1 μM , 0,09 μM , 0,07 μM , 0,055 μM , 0,05 μM , 0,03 μM e 0,01 μM) para tubos de ensaio;
- Transferir uma alíquota de 1 mL de metanol para realizar o tubo do Branco;
- Adicionar 5 mL de água destilada;
- Adicionar 1 mL de metanol;
- Adicionar 0,5 mL de RFC;
- Agitar em vortex por 3 segundos;
- Adicionar 1 mL de NaCO_3 ;
- Deixar em repouso ao abrigo de luz durante 1 hora;
- Adicionar 3600 μL (3,6 mL) da solução TPTZ nos tubos das amostras e no branco;
- Zerar o espectrofotômetro com o branco em 765 nm;
- Realizar a leitura (triplicata) em 765 nm.

Figura E- Curva padrão para análise de Fenólicos Totais em $\mu\text{EAG}\cdot\text{mL}^{-1}$ 

Fonte: Autor (2019)

APÊNDICE F – CROMATOGRAMAS CLAE

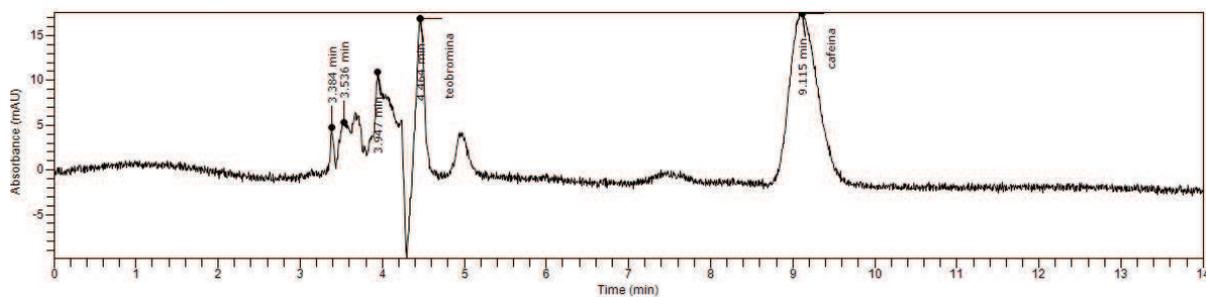
Figura 16- Cromatogramas de: a) folhas de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C



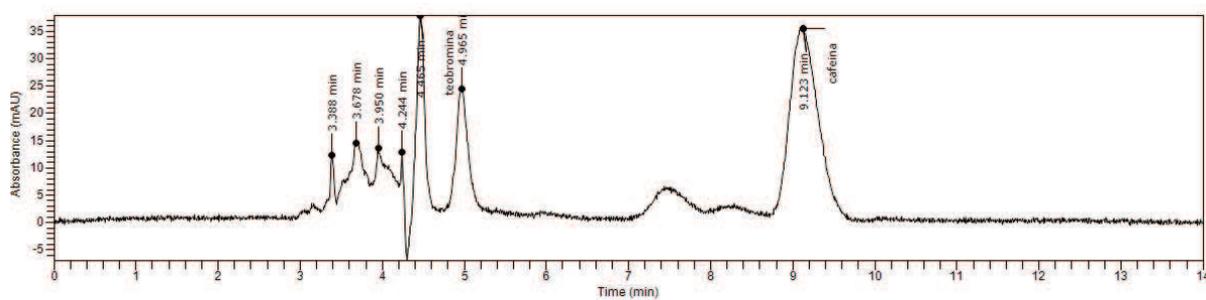
Fonte: Autor (2019)

Figura 17- Cromatogramas de: a) caules de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C

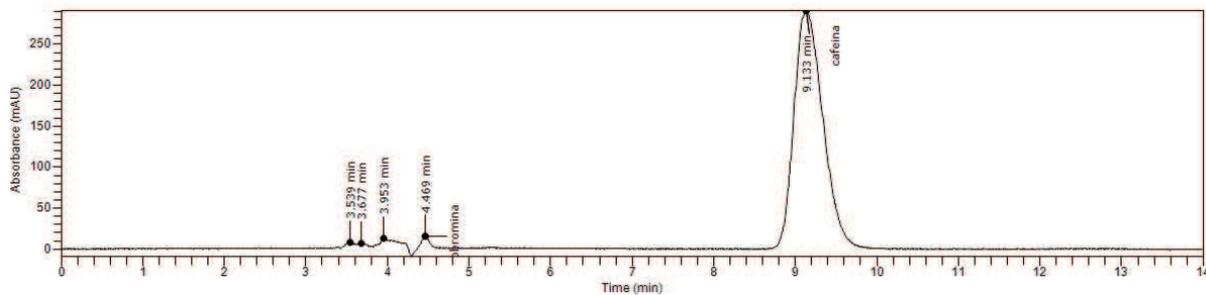
a)



b)



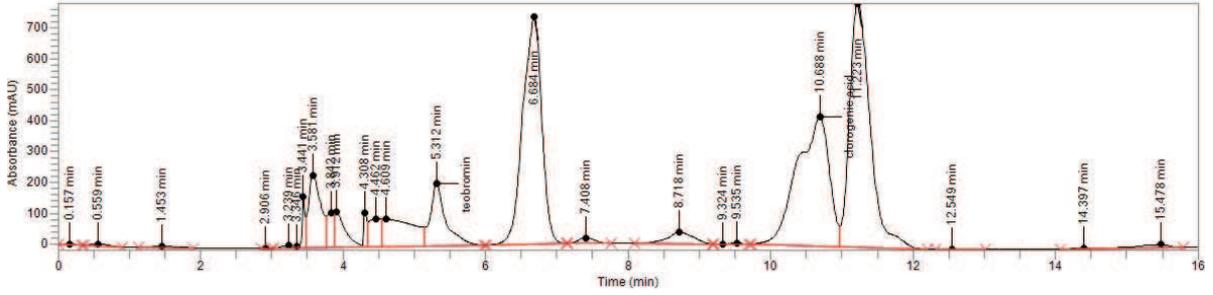
c)



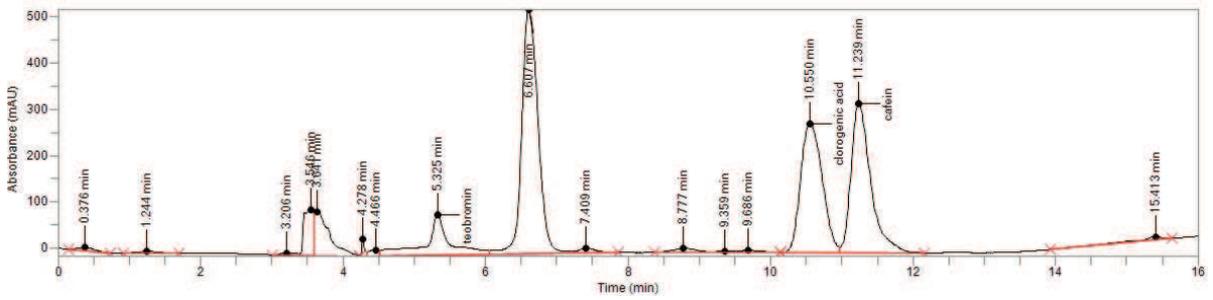
Fonte: Autor (2019)

Figura 18- Cromatogramas de: a) flores de erva mate in natura, b) após a extração e c) do extrato obtido por extração supercrítica a 32 MPa e 58°C

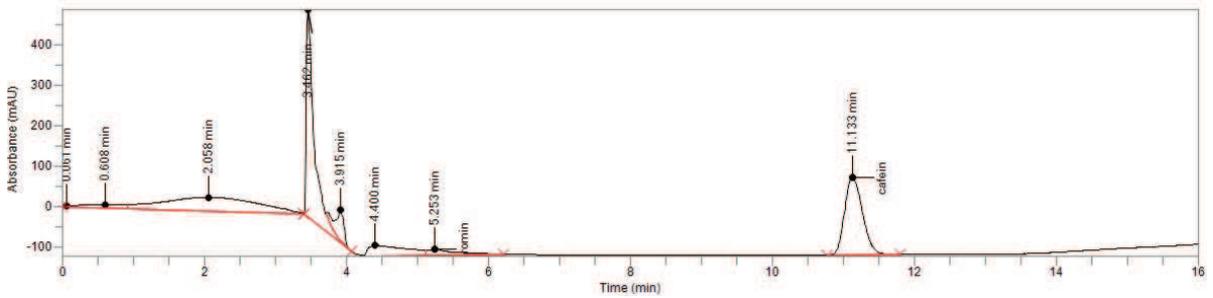
a)



b)



c)



Fonte: Autor (2019)