

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

**Lára Franco dos Santos**

**Microfiltração e ultrafiltração de extrato de erva-mate (*Ilex*  
*paraguariensis*)**

**Passo Fundo**

**2019**



**Lára Franco dos Santos**  
**Tecnóloga em Alimentos**

**Microfiltração e ultrafiltração de extrato de erva-mate (*Ilex*  
*paraguariensis*)**

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos  
Orientador: Vandrê Barbosa Brião  
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e  
não convencionais na produção de alimentos e  
ingredientes.

**Passo Fundo**  
**2019**

CIP – Catalogação na Publicação

---

S237m Santos, Lára Franco dos  
Microfiltração e ultrafiltração de extrato de erva-mate  
(*Ilex paraguariensis*) / Lára Franco dos Santos. – 2019.  
88 p.: il. color.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2019.

1. Erva-mate. 2. Antioxidantes. 3. Compostos bioativos.  
4. Compostos fenótipos. I. Brião, Vandrê Barbosa, orientador.  
II. Título.

CDU: 633.77

---

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO,  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINAVETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

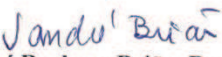
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Microfiltração e ultrafiltração do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

Elaborada por  
**Lára Franco dos Santos**

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

**Comissão Examinadora**

  
**Vandré Barbosa Brião, Dr., UPF**  
(Orientador/Presidente)

  
**Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF**

  
**Marco Di Luccio, Dr., UFSC**

**Passo Fundo, RS, Brasil**  
**2019**



Dedico aos meus pais, aos meus irmãos, e a minha sobrinha Manuela





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer entender que cada coisa tem seu tempo, e por sempre colocar pessoas no meu caminho que me deram amor e força pra enfrentar qualquer coisa.

A minha família por sempre estarem ao meu lado em tudo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao meu orientador Vandr e Barbosa Brião, pela orienta o, por todo conhecimento transmitido e por ter acredito no meu potencial.

A professora Telma Elita Bertolin, por “abraçar” o projeto erva-mate e dar todo o suporte que precisávamos, pela ajuda e por ceder os alunos da inicia o.

A empresa INOVAMATE, em especial a Ariana e Clovis, pelo fornecimento da erva-mate e por acreditarem neste projeto.

As maravilhosas Ana Cláudia Margarites e Cintia Guarienti, sem palavras pelo apoio e ajuda, seja ela nos experimentos ou por sempre terem algo pra falar nos momentos de “loucura”. Voc es fazem parte da minha disserta o e tantas outras, muito obrigada.

A Universidade de Passo Fundo e ao programa de p s-gradua o em Ciência e Tecnologia de Alimentos, aos professores do programa e a professora da farmácia Charise Dallazem Bertol por todas as contribui es. E a Tatiana Oro, por todo o direcionamento no início do projeto.

Aos amigos da vida, Karina, Isabela, Brehme, Gabi e Julio. Em especial a Karina, por ter compartilhado comigo tantos momentos bons nesses dois anos, vou sentir falta do convívio, principalmente da Maria Cecilia, a gata mais linda e louca deste mundo.

A minha psicóloga Patrice Carbone por todo o apoio.

Aos amigos que fiz nesses dois anos, pelo convívio e por tornarem as coisas mais fáceis, Bruna, Carol, Elionio, Alan, Cintia Gris, Marina, Ver nica, Janayna, Fran, Naiara, Larissa.

A minha turma do PPGCTA, voc es foram incríveis SEMPRE.

Aos ICs Alice, Cristina, Gabriel, Guilherme, Julia, Kati, Leticia e Samuel voc es são demais. Obrigada por todo apoio, ajuda e comprometimento que tiveram com esta disserta o.

Aos laboratórios onde a pesquisa foi desenvolvida. Aos técnicos de laboratório João, Clarisse e Marilda.

A todos aqueles que contribuiram, o meu mais sincero muito obrigada.



*Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; Tempo de estar calado, e tempo de falar; Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.*

Eclesiastes 3:1-8



## RESUMO

O extrato de erva-mate possui propriedades como antioxidante natural em decorrência da sua composição química rica em compostos fenólicos. Os processos de separação por membranas são considerados viáveis para a clarificação e purificação de extratos vegetais. Esses processos operam em temperaturas baixas, conservando os compostos bioativos, como os compostos fenólicos. No entanto, não existe na literatura um estudo da estabilidade de extrato de erva-mate por membranas. O objetivo foi desenvolver um processo por microfiltração e ultrafiltração para a clarificação e estabilização de um extrato aquoso da erva-mate. Foram avaliados os parâmetros de tempo e temperatura de extração, avaliando a melhor condição de extração dos compostos fenólicos, o extrato aquoso foi submetido a clarificação através de três membranas: microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ); ultrafiltração 1 (30 a 80 kDa); ultrafiltração 2 (4 kDa) e diferentes pressões de processo, 0,5; 1; e 1,5 bar. Os extratos obtidos na etapa da clarificação foram analisados quanto aos parâmetros de rejeição, fluxo, turbidez, compostos fenólicos totais, pH, condutividade elétrica, sólidos solúveis e totais, cor e atividade das enzimas polifenoloxidase e peroxidase. O extrato da melhor condição na etapa de clarificação, foi submetido a teste de estabilidade, durante um mês em diferentes temperaturas de armazenamento. A melhor condição de extração dos compostos fenólicos foi a 90 °C por 10 minutos, temperaturas altas facilitam a extração destes compostos, no entanto vale ressaltar a baixa estabilidade destes compostos e o quanto esses parâmetros são importantes para a etapa da extração. Os valores de turbidez para os permeados clarificados pelas membranas ficaram abaixo de 36 NTU e não houve diferença significativa dos compostos fenólicos do extrato bruto para o clarificado, assim qualquer um dos extratos clarificados pode ser destinado a fabricação de bebidas por exemplo. A membrana que apresentou melhor eficiência foi a de ultrafiltração (30 a 80 kDa) a 0,5 bar, obteve uma rejeição dos compostos fenólicos (18 %), turbidez (99,9 %) e manteve estável o fluxo. O extrato clarificado manteve sua estabilidade para os compostos fenólicos e turbidez por 30 dias armazenado a 4 °C. Os processos de separação por membranas foram eficientes na clarificação, conservação e estabilização dos compostos fenólicos. Este extrato fenólico proveniente da erva-mate pode ser aplicado a bebidas e como substituto aos antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: Membranas; Clarificação; Compostos bioativos; Preservação e estabilização de compostos fenólicos.



## ABSTRACT

The extract of yerba mate has properties as a natural antioxidant due to its chemical composition rich in phenolic compounds. Membrane separation processes are considered viable for the clarification and purification of plant extracts. These processes operate at low temperatures, retaining bioactive compounds, such as phenolic compounds. However, there is no literature in the literature on the stability of erva-mate extract by membranes. The objective was to develop a process by microfiltration and ultrafiltration for the clarification and stabilization of an aqueous extract of yerba mate. The parameters of time and temperature of extraction were evaluated, evaluating the best extraction condition of the phenolic compounds, the aqueous extract was submitted to clarification through three membranes: microfiltration (0.1  $\mu\text{m}$ ); ultrafiltration 1 (30 to 80 kDa); ultrafiltration 2 (4 kDa) and different process pressures, 0.5; 1; and 1.5 bar. The extracts obtained in the clarification stage were analyzed for the parameters of rejection, flow, turbidity, total phenolic compounds, pH, electrical conductivity, solids and total solids, color and activity of polyphenoloxidase and peroxidase enzymes. The extract of the best condition in the clarification step was subjected to a stability test for one month at different storage temperatures. The best extraction condition of the phenolic compounds was at 90 ° C for 10 minutes, high temperatures facilitate the extraction of these compounds, however it is worth noting the low stability of these compounds and how important these parameters are for the extraction stage. The turbidity values for membrane clarified permeates were below 36 NTU and there was no significant difference of the phenolic compounds from the crude extract to clarified, so any of the clarified extracts could be intended for the manufacture of beverages for example. The membrane that presented the best efficiency was that of ultrafiltration (30 to 80 kDa) at 0.5 bar, obtained a rejection of the phenolic compounds (18%), turbidity (99.9%) and kept the flow stable. The clarified extract maintained its stability for phenolic compounds and turbidity for 30 days stored at 4 ° C. The membrane separation processes were efficient in clarifying, preserving and stabilizing the phenolic compounds. This phenolic extract from yerba mate can be applied to beverages and as a substitute for synthetic antioxidants.

Keywords: Membranes; Clarification; Bioactive compounds; Preservation and stabilization of phenolic compounds.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de processamento da erva-mate.....	24
Figura 2 - Correntes dos Processos de Separação por Membranas .....	28
Figura 3 - Fluxograma de métodos.....	33
Figura 4 - Diagrama esquemático do equipamento piloto de microfiltração e ultrafiltração...37	
Figura 5 - Concentração de compostos fenólicos totais no extrato de erva-mate em diferentes temperaturas e tempos de extração.....	41
Figura 6 - Erva-mate branqueada e não branqueada .....	43
Figura 7 - Rejeição para as membranas de microfiltração (0,1 µm) (a); Ultrafiltração (30 a 80 kDa) (b); Ultrafiltração (4 kDa) (c). .....	47
Figura 8 - Fluxo do permeado durante a filtração por membranas microfiltração (0,1 µm) (a); Ultrafiltração (30 a 80 kDa) (b); Ultrafiltração (4 kDa) (c). .....	49
Figura 9 - Obtenção de extratos do processamento com a membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) a pressão de 0,5 bar.....	50
Figura 10 - Compostos fenólicos totais (a) e turbidez (b) da vida de prateleira dos extratos de erva-mate clarificados.....	53
Figura 11 - Curva analítica compostos fenólicos (1).....	81
Figura 12 - Curva analítica compostos fenólicos (2).....	81



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Trabalhos relacionados a extratos vegetais processados por membranas .....	31
Tabela 2 - Caracterização do extrato aquoso de erva-mate e do chá mate comercial .....	44
Tabela 3 - Caracterização das alimentações e permeados dos experimentos.....	45
Tabela 4 - Análise de cor das correntes das filtrações.....	51
Tabela 5 - Teores de compostos bioativos no extrato de erva-mate.....	52
Tabela 6 - Caracterização das alimentações e permeados dos experimentos.....	83



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>EXTRATOS DE PLANTAS.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Erva-mate.....	24
2.1.2	Composição fisiológica da erva-mate.....	25
2.1.3	Composição química da erva-mate .....	26
2.1.4	Produtos da erva-mate .....	27
<b>2.2</b>	<b>PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM).....</b>	<b>27</b>
2.2.1	Fenômenos que limitam o fluxo do permeado .....	29
2.2.2	Aplicação dos PSM para extratos de plantas e compostos bioativos .....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>33</b>
3.1.1	Matéria-prima .....	33
<b>3.2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Branqueamento, secagem e moagem das folhas da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	34
3.2.2	Extração aquosa das folhas da <i>Ilex paraguariensis</i> .....	34
3.2.3	Determinações analíticas .....	34
3.2.3.1	<i>Análises físico-químicas</i> .....	34
3.2.3.2	<i>Compostos fenólicos totais</i> .....	35
3.2.3.3	<i>Determinação da atividade enzimática</i> .....	35
3.2.3.4	<i>Avaliação da cor</i> .....	35
3.2.3.5	<i>Identificação dos compostos bioativos</i> .....	36
3.2.3.6	<i>Caracterização do chá mate comercial</i> .....	36
3.2.4	Microfiltração e ultrafiltração.....	36
3.2.4.1	<i>Equipamento piloto de filtração tangencial</i> .....	36
3.2.4.2	<i>Limpeza das membranas</i> .....	37
3.2.4.3	<i>Fluxo do permeado</i> .....	38
3.2.4.4	<i>Rejeição das membranas</i> .....	38
3.2.5	Estabilização do extrato de erva-mate .....	39
3.2.5.1	<i>Avaliação da estabilidade do extrato de erva-mate</i> .....	39
<b>3.3</b>	<b>TRATAMENTO DOS DADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>

<b>4.1</b>	<b>OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE ...</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>ESTABILIDADE DO EXTRATO DE ERVA-MATE CLARIFICADO.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>67</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>81</b>
	<b>APENDICE C.....</b>	<b>81</b>
	<b>APENDICE D.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO C .....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO D .....</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O estudo com plantas vem ganhando destaque no campo científico por sua composição fenólica e capacidade como antioxidante natural (ELFALLEH et al., 2019), a exemplo disso a *Ilex paraguariensis*, conhecida como erva-mate é fonte de compostos bioativos como os compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas (RIACHI e MARIA, 2017). Estudos relacionam bebidas à base de erva-mate a efeitos estimulantes (SANTOS et al., 2015), diminuição do risco de doenças degenerativas e crônicas causadas pelo estresse oxidativo (BAEZA et al., 2016).

A erva-mate possui importância cultural e econômica para os países do sul da América Latina como produto agroindustrial, é geralmente consumida na forma de chimarrão, chá mate e tererê, há um grande interesse no desenvolvimento de produtos à base desta planta, uma alternativa para diversificar seu uso é a produção de extratos de erva-mate (JUNIOR e MORAND, 2016).

A extração é uma etapa fundamental para a produção de bebidas funcionais a base de extratos vegetais, tendo um impacto significativo no rendimento e na pureza dos compostos bioativos (BINDES et al., 2019a). O extrato aquoso de plantas contém uma matriz complexa com polissacarídeos e proteínas que são co-extraídos juntamente com os compostos fenólicos, levando a diminuir a pureza do extrato (BALYAN; VERMA; SARKAR, 2019). Nesse sentido o extrato precisa ser clarificado, a clarificação convencional envolve centrifugação e filtração, utilizando terra diatomácea e gerando resíduos (CASSANO, 2016).

Os processos de separação por membranas são considerados viáveis para clarificação, concentração e purificação de soluções aquosas por manter as características nutricionais e funcionais de extratos de plantas (GERKE et al., 2017). Isso ocorre porque utilizam temperaturas amenas e não envolvem uso de solventes químicos. As membranas de filtração são amplamente aplicadas para extratos vegetais e de frutas, para clarificação (GERKE et al., 2017; BINDES et al., 2019b), concentração (TUNDIS et al., 2018; SEIFZADEH et al., 2019) e purificação (CONIDI et al., 2017; MADRONA et al., 2019; MONDAL et al., 2019). Poucas pesquisas reportam a clarificação de extrato de erva-mate por processos de separação por membrana (GERKE et al., 2017), e nenhuma apresenta um estudo da estabilidade do extrato de erva-mate clarificado por membranas.

O presente estudo está vinculado à linha de pesquisa “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes” acompanhando o projeto “Erva-mate

como componente funcional no desenvolvimento de processos e produtos alimentares”. O objetivo geral é desenvolver um processo por microfiltração e ultrafiltração para a clarificação e estabilização de um extrato aquoso da erva-mate. Os objetivos específicos foram:

- a) Investigar a influência das variáveis de tempo e temperatura na extração dos compostos fenólicos da erva-mate;
- b) Obter um extrato aquoso de erva-mate e caracterizá-lo quanto a parâmetros físico-químicos;
- c) Averiguar a eficácia dos processos de microfiltração e ultrafiltração para a clarificação do extrato de erva-mate;
- d) Avaliar a retenção dos compostos fenólicos no extrato clarificado;
- e) Avaliar a estabilidade do extrato obtido em diferentes temperaturas ao longo do tempo;



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EXTRATOS DE PLANTAS

Matrizes vegetais demonstram propriedades como antioxidante natural, esse interesse em antioxidantes naturais é reforçado pela crescente dúvida em relação aos antioxidantes sintéticos, que podem ser cancerígenos e instáveis (CHANDRA et al., 2014). Plantas são fontes ricas em compostos fenólicos, a *Ilex paraguariensis* vem sendo explorada devido a sua composição química com elevado número destes compostos (JUNIOR e MORAND, 2016). O extrato aquoso da planta é uma alternativa viável de aplicação destes compostos na indústria.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a extração de compostos fenólicos, a infusão ou decocção das folhas de erva-mate é um processo de extração simples e de baixo custo, esta extração sólido-líquido consiste na solubilidade dos compostos em solventes introduzidos no interior da matriz sólida por transporte molecular. De acordo com a literatura (TOLEDO, 2007; KOTOVICZ, 2014), existem diferentes fenômenos físicos de importância na extração sólido-líquido como difusão, solubilidade e equilíbrio.

A difusão refere-se ao transporte de moléculas de um componente através de uma fase contínua, ou de uma interface que separa duas fases. O solvente deve difundir para o interior do sólido para que o soluto se dissolva no solvente e o soluto deve se difundir para fora do sólido saturado de solvente e alcançar a fase líquida. A taxa de difusão determina o tempo necessário para ativar o equilíbrio entre as fases.

Em relação a solubilidade, uma alta concentração de solutos em um processo de extração sólido-líquido é a concentração de saturação em dado solvente. Isso implica que a razão de solvente/sólido deve ser alta o suficiente para que a concentração de equilíbrio no final do processo seja menor que a concentração de saturação. Torna-se então claro que a escolha do solvente tem influência sobre a solubilidade, e portanto, sobre a eficiência do processo. O equilíbrio no processo acontece após a fase líquida e sólida serem deixadas em contato por tempo suficiente.

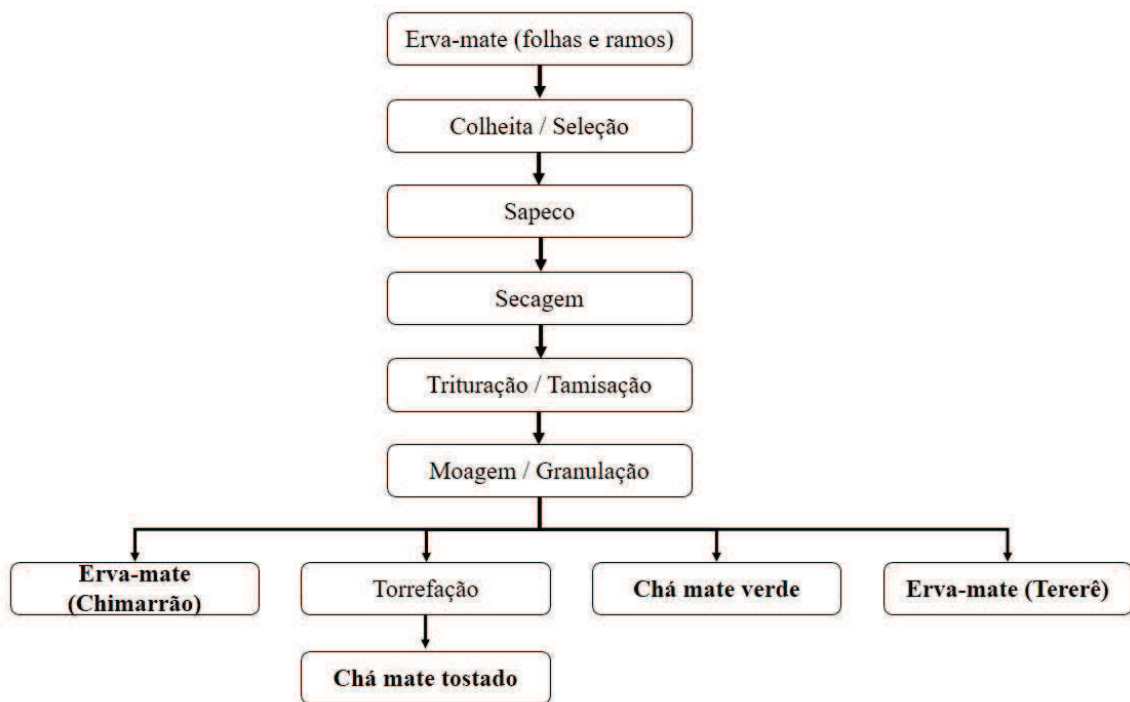
A qualidade do extrato e a eficiência de extração são normalmente afetadas por vários fatores, como a técnica de extração, o tipo de solvente usado e sua concentração, a relação líquido-sólido, tempo e temperatura de extração e tamanho de partícula da matriz sólida

(DAHMOUNE et al., 2015). É importante ressaltar que a extração em temperaturas elevadas e por longos tempos pode levar a degradação de compostos fenólicos (CAMPOS et al., 2013).

### 2.1.1 Erva-mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* S. H.) é uma planta nativa da América do Sul cultivada e consumida predominantemente nos países do sul, como Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil a atividade ervateira predomina na Região Sul, sendo um importante produto agroindustrial para a região. Os principais usos da erva-mate são no chimarrão, tererê e chá mate (JUNIOR e MORAND, 2016). O processamento da erva-mate consiste no uso das folhas e ramos, colhidos e processados dando origem a diferentes produtos (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de processamento da erva-mate



Fonte: Adaptado de Berté (2011).

As folhas e os caules são colhidos mecanicamente, divididos em sacos e transportados para uma unidade de processamento. Na erva-mate há presença das enzimas oxidases, polifenoloxidase e peroxidase, a reação enzimática indesejável ocorre quando as células contidas na planta são rompidas durante o processamento e entram em contato com seus substratos, como os compostos fenólicos. (ESCRIBANO et al., 1997). O sapeco, que inativa as enzimas e diminui a umidade, ocorre por contato direto com o fogo a temperaturas entre 250 e

550 °C por 2 a 4 min (ISOLABELLA et al., 2010). Na etapa da secagem, a erva é desidratada por meio de fogo indireto, perdendo cerca de 60% de massa. A secagem pode ser feita em secadores de esteira ou rotativo que são de secagem lenta e rápida, respectivamente (ESMELINDRO et al., 2002; EMBRAPA, 2014).

Em seguida, a erva é triturada e passa por um peneiramento (tamisação). Essas duas últimas etapas permitem obter uma erva-mate com granulometria padronizada e seguir para etapa da moagem. A intensidade e o tipo de moagem utilizado resultam em produtos com diferentes formas de consumo (JUNIOR, 2005). Após esse processo, o produto é denominado erva “cancheada” e pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de chás (ESMELINDRO et al., 2002).

Diferentes concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são encontradas na erva-mate nos diferentes produtos comerciais e nas preparações a quente e a frio (ZUIN et al., 2005; KAMANGAR et al., 2008). Isto sustenta a hipótese que o risco de câncer associado com ingestão de mate pode não estar relacionado somente à temperatura, mas também ao nível de compostos carcinogênicos presentes (LORIA et al., 2009). Temperaturas altas e diferenças nos processos de preparo da erva-mate podem produzir diferentes níveis de HAP no produto final (LORIA et al., 2009).

Um pré-tratamento da planta com temperaturas menores que as utilizadas no processamento industrial para a inativação das enzimas, se faz necessário. O branqueamento é frequentemente utilizado em frutas e vegetais e é o método mais confiável para controlar o escurecimento, o método consiste no contato direto de vapor ou água quente em frutas, legumes e folhas por um certo período de tempo (AZEREDO, 2004). Este método é eficiente na inativação das enzimas presentes nos alimentos, estas participam de reações químicas que deterioram os alimentos durante o processamento e armazenamento (SILVA e SULAIMAN, 2017). A composição química da erva-mate está diretamente relacionada ao cultivo e processamento da matéria prima (ESCALADA et al., 2011).

### **2.1.2 Composição fisiológica da erva-mate**

A planta *Ilex paraguariensis* possui uma vasta gama de nutrientes, sua folha além de ser a parte da planta mais utilizada para consumo, é também a parte mais estudada pelos pesquisadores, seja *in natura* ou cancheada. A folha é um órgão, geralmente laminar, cuja principal função é a fotossíntese, embora possa apresentar outras funções, como a transpiração, o armazenamento de água, proteção e atração de polinizadores. A parte superior da folha é

chamada de adaxial ou ventral e a parte inferior da folha é chamada de abaxial ou dorsal (SILVEIRA, 2004).

As duas faces da folha são cobertas pela epiderme, cujas células são achatadas e compactas, existindo pouco espaço intercelular, a maioria das folhas possui estômatos nas duas epidermes (anfiestomáticas). Entre as duas epidermes, existe o mesofilo (meso = meio; phyllos = folha) que contém o sistema fundamental. O principal papel do mesofilo é realizar a fotossíntese (SILVEIRA, 2004). Evidências apontam que compostos, como por exemplo os fenólicos, estão distribuídos nas células epidérmicas das folhas das plantas (AGATI e TATTINI, 2010).

### **2.1.3 Composição química da erva-mate**

A erva-mate tem sido alvo de estudos na área de ciência de alimentos, devido a sua composição química complexa e com elevado número de compostos bioativos. Dentre os principais compostos químicos já identificados nas folhas de erva-mate pode-se destacar as saponinas triterpênicas (SOUZA et al., 2011); metilxantinas (BOAVENTURA et al., 2013); clorofila (MURAKAMI et al., 2013) e os compostos fenólicos (BOAVENTURA et al., 2013; FRIZON et al., 2015), que podem ser utilizados como antioxidante natural.

A presença desses compostos é responsável por diversos efeitos biológicos conhecidos dessa planta (BRACESCO et al., 2011), dentre os compostos fenólicos, os mais encontrados na erva-mate são ácido caféico e seus derivados: ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico e taninos (BOAVENTURA et al., 2013; MURAKAMI et al., 2013).

Junior e Morand (2016) mencionam com base na composição fitoquímica da erva-mate e nos dados trazidos por outros estudos sobre os efeitos biológicos associados a esses compostos, os produtos de erva-mate podem representar fontes alimentares interessantes para a nutrição humana relacionada à saúde cardiovascular. De forma semelhante, os fitoquímicos presentes na erva-mate, em especial os polifenóis, são apontados como responsáveis pelos efeitos hipoglicemiantes e antiobesogênicos (GAMBERO e RIBEIRO, 2015).

Além da utilização da erva-mate para a manutenção da saúde, a planta possui propriedades como antioxidante natural, devido a presença dos compostos fenólicos, podendo ser utilizada na indústria de alimentos como substituta aos antioxidantes sintéticos. Estudos realizados apontam que os compostos fenólicos atuam como antioxidantes naturais nos alimentos (FAION et al. 2015; SORDINI et al. 2019 e TATICCHI et al. 2017).

#### 2.1.4 Produtos da erva-mate

O consumo de chimarrão, tererê e chá mate é alto em países onde *Ilex paraguariensis* é cultivada, o consumo de erva chega a 8-10 kg por pessoa por ano no Uruguai, 6,5 na Argentina e 3 a 5 no sul do Brasil. Em países da América do Norte, Europa e Ásia as folhas tostadas da planta são usadas para a produção de chás e bebidas energéticas (JUNIOR e MORAND, 2016).

Segundo dados do IBGE (2016), a cadeia produtiva da erva-mate obteve um valor de produção de R\$ 541 milhões em 2016 no mesmo ano o Brasil exportou cerca de 82 milhões em produtos da erva-mate, para o Chile, Uruguai e Estados Unidos (IBGE, 2016). Agências brasileiras de importações e exportações já firmam parcerias, com o objetivo de aumentar a exportação dessa planta, não incentivando apenas a exportação dos produtos tradicionais, chimarrão e tererê, como também o desenvolvimento de novos produtos à base de erva-mate, com intuito de atrair o mercado internacional (FUNDOMATE, 2018).

A demanda por extratos vegetais tem aumentado, por exemplo a produção de bebidas não alcoólicas, como os chás prontos para consumo cresceu a uma taxa de 8,8% para o ano de 2015, no entanto houve uma queda de - 6,8% para o segmento de refrigerantes, a crescente preocupação dos consumidores com bem-estar e saúde tem feito com que as empresas de bebidas invistam no segmento de funcionais que cresce quando comparado aos refrigerantes tradicionais (ABIR, 2019).

O processamento de extratos vegetais é uma etapa essencial já que os compostos bioativos são termolábeis. Os processos de separação por membranas representam uma alternativa válida às tecnologias tradicionais da indústria devido aos baixos custos operacionais e de manutenção, condições de temperatura e pressão suaves. As membranas são utilizadas para a recuperação, separação, clarificação e concentração de compostos fenólicos de diferentes matrizes vegetais (CONIDI; DRIOLI; CASSANO, 2018).

## 2.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

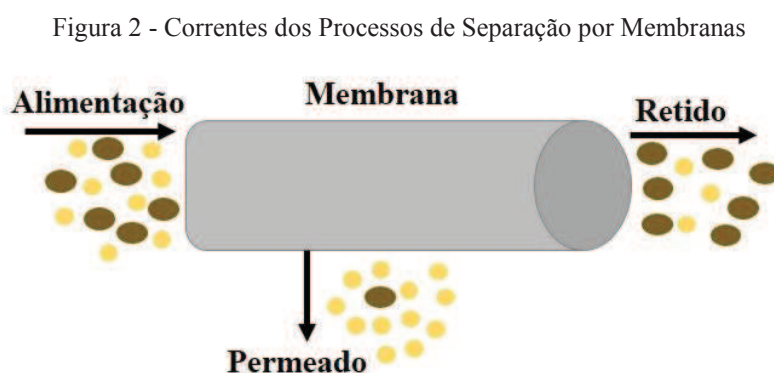
A aplicação dos processos de separação por membranas em indústrias alimentícias se intensificou no início da década de 80, sua integração com métodos convencionais tem importância devido à diminuição de custos com matéria-prima e equipamentos e maior qualidade no produto final (CASSANO, 2016).

Os processos de separação por membranas podem apresentar configurações diferentes, são definidas pela forma com que o fluxo entra em contato com a membrana: filtração estática

(convencional) e filtração tangencial. Na filtração convencional (também conhecida como filtração frontal ou ainda “dead end”) o fluxo da solução passa através da membrana, fazendo que o soluto e/ou sólidos suspensos sejam retidos, formando uma torta na superfície da membrana. O processo ocorre em regime transiente, já que a concentração do soluto na superfície da membrana aumenta com o tempo (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

No modelo conhecido como filtração tangencial, a solução de alimentação flui paralelamente à membrana, e o fluxo de permeado, perpendicularmente. As vantagens da filtração tangencial são: diminuição das operações unitárias; melhoria no desempenho do processo (clarificação); maior eficiência na separação; melhor qualidade do alimento (uso de baixas temperaturas); qualidade na separação ou fracionamento; tecnologia limpa; desenvolvimento de produtos; possibilidade de automação completa da planta industrial; instalações compactas e redução significativa do consumo de energia; (PETRUS, 2011).

Processos convencionais de membrana que utilizam gradiente de pressão como força motriz são microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI). Esses processos de membranas utilizando pressão podem separar uma solução em massa chamado de alimentação em duas correntes utilizando a membrana como barreira, estas correntes são denominadas de permeado e retido (MUÑOZ; FERNANDEZ; FILA, 2016), como apresentado na Figura 2.



Fonte: Autor, 2019.

Os processos de membrana que utilizam pressão têm vários benefícios como, menor necessidade de energia, alta eficiência de separação, fácil escalonamento, operação simples, alta produtividade em termos de fluxos de permeado e ausência de transição de fase (MUÑOZ; FERNANDEZ; FILA, 2016). Coletivamente, essas vantagens facilitam a recuperação de componentes de alto valor agregado (CASSANO; CONIDI; DRIOLI, 2011).

O mecanismo de separação nos processos MF e UF é principalmente baseado em um efeito de peneiramento e partículas são separadas de acordo com suas dimensões, embora outros fatores, como forma e carga, bem como interações entre a própria membrana e partículas sendo filtradas, papel no mecanismo de separação (CONIDI; DRIOLI; CASSANO, 2018).

A microfiltração é baseada no uso de membranas capazes de separar partículas com diâmetros de 0,05 a 10  $\mu\text{m}$  de um solvente ou outros compostos de baixo peso molecular. A ultrafiltração envolve o uso de membranas que proporcionam alta retenção de macromoléculas e colóides de uma solução (VAN REIS e SYDNEY, 2007).

### 2.2.1 Fenômenos que limitam o fluxo do permeado

O desempenho de uma membrana pode ser influenciado por sua composição química, temperatura, pressão, fluxo de alimentação e por interações entre componentes da alimentação e a superfície das membranas (COUTINHO et al., 2009). Um dos problemas associados ao uso de membranas é o baixo fluxo de permeado. A redução do fluxo se dá pelo aumento na resistência da membrana pelo bloqueio dos poros (incrustações) e a formação de uma camada de torta sobre sua superfície, conhecida como polarização (ABDELRASOUL et al., 2013).

A polarização por concentração ocorre pelo acúmulo de materiais rejeitados pela membrana na sua superfície. Em decorrência disso, a concentração de saturação do soluto pode ser atingida, podendo ocorrer a precipitação ou gelificação, dependendo do soluto envolvido. Os efeitos desses fenômenos se tornam visíveis por provocarem declínio do fluxo de permeado ao longo do tempo, à pressão constante (COUTINHO et al., 2009).

Já a incrustação (*fouling*) é resultado de interações químicas entre a membrana e os diversos solutos presentes na solução de alimentação, que adsorvem dentro dos poros ou na superfície da membrana. Este processo é bem lento e praticamente constante, porém, irreversível (COUTINHO et al., 2009). Infelizmente, a incrustação nas membranas causada pela deposição de suspensões biológicas ou macromoléculas como colóides e/ou carboidratos, assim como partículas na superfície da membrana ou nos poros limita a aplicação generalizada deste processo na indústria de alimentos (MOHAMMAD, 2012).

Como resultado destas incrustações nas membranas está o declínio do fluxo de permeado e aumento da manutenção do processo e custos operacionais, incluindo a necessidade de pré-tratamento, limpeza de membranas, perda de água de alimentação, e durabilidade das membranas diminuída, visto que na maioria das vezes as mais utilizadas são as poliméricas, estas apresentam uma vida útil curta (MOHAMMAD, 2012).

### 2.2.2 Aplicação dos PSM para extratos de plantas e compostos bioativos

Recentemente a recuperação, conservação e purificação de compostos bioativos, como os compostos fenólicos obtidos de subprodutos de processamento de alimentos e de matrizes vegetais têm atraído considerável interesse econômico (CONIDI; DRIOLI; CASSANO, 2018). Os PSM se destacam como tecnologias alternativas aos processos convencionais devido às suas vantagens em termos de alta eficiência de separação, fácil incremento e baixo consumo de energia para o processamento destes compostos (CONIDI; DRIOLI; CASSANO, 2018).

Entretanto a recuperação completa destas micromoléculas fenólicas depende do tamanho dos poros da membrana utilizada, a natureza das moléculas também desempenha um papel importante. Compostos fenólicos possuem anéis aromáticos e cadeias alifáticas que produzem um perfil hidrofóbico que reduz o desempenho da permeação das membranas (GALANAKIS, 2015).

Em estudo realizado por Gerke et al. (2017) a clarificação do extrato bruto de erva-mate cancheada foi avaliada em três membranas diferentes (cerâmica, polieterimida e polietersulfona) através de ensaios em sistema fechado, a microfiltração com membrana de polieterimida resultou em um extrato de erva-mate clarificado com redução da turbidez próximo de zero, a membrana de polieterimida apresentou a menor rejeição dos compostos bioativos (12,8 e 22,2%).

Souza et al. (2016) aplicaram o processo de ultrafiltração assistida por ultra-som para a purificação de compostos fenólicos do extrato de chá verde. Observaram que o ultra-som facilitou a permeação de compostos fenólicos através da membrana, o extrato clarificado pela membrana de ultrafiltração 20 kDa apresentou alta pureza do componente catequina (49% de catequina relacionado ao conteúdo total de polifenóis). O processo de ultrafiltração assistida por ultrassom é sugerido para a purificação de compostos fenólicos do extrato de chá verde.

Os estudos de operações com membranas e compostos bioativos provenientes de extratos de plantas ou subprodutos alimentares vem ganhando relevância no campo científico como está apresentado no Tabela 1.



Tabela 1 - Trabalhos relacionados a extratos vegetais processados por membranas

<b>Produto</b>	<b>Processo e membrana utilizada</b>	<b>Referência</b>
Extrato de erva-mate	Concentração por NF	Murakami et al. (2013)
Chá preto	Clarificação por MF e UF	Chandini, Rao e Subramanian (2013)
Chá verde	Purificação por UF	Souza et al. (2016)
Extrato das hastes da beterraba	Clarificação por MF e UF	Santos et al. (2016)
Extrato de erva-mate	Clarificação por MF e UF	Gerke et al. (2017)
Suco de Sabugueiro	Concentração por NF	Tundis et al. (2018)
Chá verde	Purificação por UF	Mondal e De (2019)
Chá verde	Clarificação por MF	Bindes et al. (2019b)
Extrato da casca de pistache	Concentração por UF	Seifzadeh et al. (2019)
Extrato de Jenipapo	Clarificação e purificação com MF e UF	Madrona et al. (2019)
Extrato do bagaço da azeitona	Concentração por NF e OI	Nunes et al. (2019)

Legenda: microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI).

Fonte: Autor, 2019.

Diante dos trabalhos apresentados na tabela 1, concluímos que as membranas de filtração são eficientes na clarificação, purificação e concentração de compostos fenólicos para extratos vegetais e/ou sucos. É neste sentido que a clarificação do extrato bruto de erva-mate é justificada, assim esse trabalho visa a obtenção de um extrato fenólico proveniente de erva-mate, assim como um estudo de clarificação do extrato e estabilização dos compostos fenólicos.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

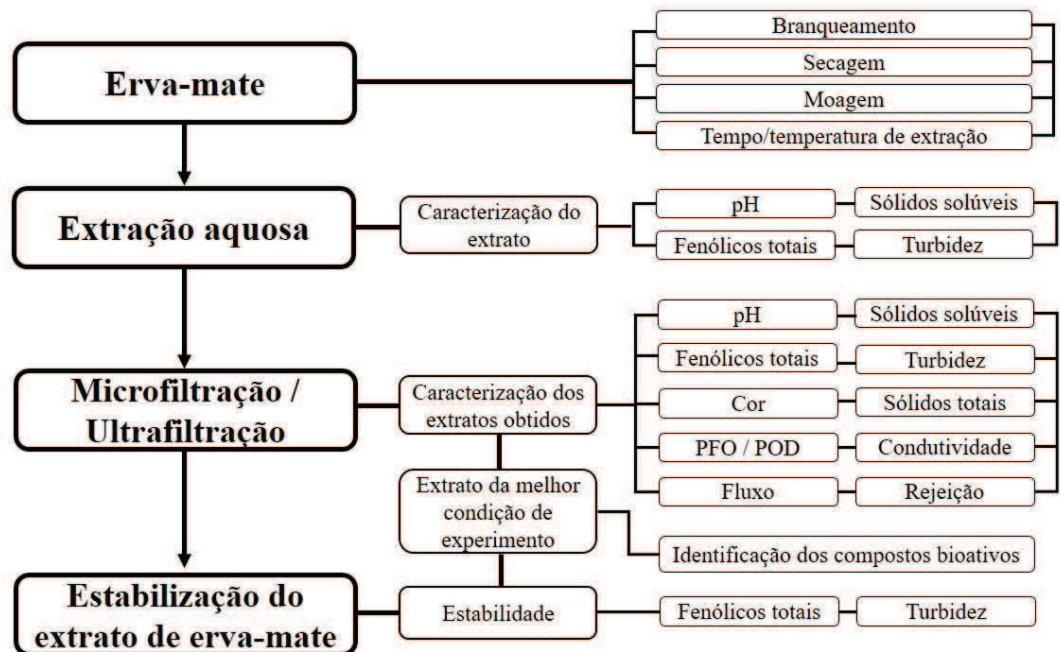
##### 3.1.1 Matéria-prima

A erva-mate (folhas *in natura*) foi colhida na cidade de Ilópolis – Rio Grande do Sul, em lotes de 5 kg e fornecidas gentilmente pela empresa Inovamate. As folhas foram separadas dos caules para posterior pré-tratamento da folha *in natura*. O chá mate pronto para o consumo foi adquirido em comércio local.

#### 3.2 MÉTODOS

A Figura 3 apresenta as etapas que foram empregadas para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 3 - Fluxograma de métodos



Fonte: Autor, 2019.

### **3.2.1 Branqueamento, secagem e moagem das folhas da *Ilex paraguariensis***

As folhas foram branqueadas a 95 °C por 30 segundos, em seguida foram imersas em banho de gelo. Após o branqueamento, as folhas foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 50 °C por 24 h, processadas em moinho de facas e classificadas em peneiras com mesh <42 (<355 µm). Em seguida, foram embaladas a vácuo em embalagens de polietileno e armazenadas congeladas (-18 °C) até o momento da obtenção dos extratos e realização das análises.

### **3.2.2 Extração aquosa das folhas da *Ilex paraguariensis***

A extração ocorreu através de uma infusão com as folhas trituradas da erva-mate na razão de 3% (folha:água) m/m. Inicialmente, foi realizado o estudo da influência do tempo (2, 10 e 30 minutos) e da temperatura (40, 70, 90 e 95 °C) na extração aquosa das substâncias fenólicas do extrato de erva-mate. Foi selecionada a condição que apresentou a melhor condição de extração para os compostos fenólicos. O extrato foi filtrado a vácuo usando funil de Büchner com papel filtro qualitativo.

### **3.2.3 Determinações analíticas**

#### *3.2.3.1 Análises físico-químicas*

Foram realizadas análises para a caracterização dos extratos obtidos em todas as etapas do trabalho, conforme apresentado no fluxograma de métodos (figura 3). Para isso foram realizadas análises de sólidos totais e umidade de acordo com metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). As medidas de pH foram realizadas em pHmetro (Tecnal, modelo TEC-5), de turbidez em turbidímetro (Tecnal, modelo TB 1000), de condutividade elétrica em condutivímetro (Tecnal, modelo TEC-4MP) e de sólidos solúveis em refratômetro (ATAGO, modelo Pocket PAL-J), todos os equipamentos são de bancada e foram calibrados conforme indicado pelo fabricante. As análises foram realizadas em triplicata.

### 3.2.3.2 Compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis, segundo o método descrito por Correia *et al.* (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). A curva padrão utilizada foi de ácido gálico, apresentada nos apêndices B e C. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O método está descrito no anexo A.

### 3.2.3.3 Determinação da atividade enzimática

Foram avaliadas as atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PFO) nos extratos brutos e clarificados. A atividade da PFO foi determinada a 420 nm em espectrofotômetro UV-VIS, segundo método descrito por FUJITA *et al.*, (1995). A atividade da POD foi determinada a 470 nm em espectrofotômetro UV-VI, segundo metodologia adaptada descrito por FUJITA *et al.*, (1995), com modificações. A atividade das enzimas foi expressa em unidade de atividade enzimática (capacidade de alterar 1 unidade de absorvância) por minuto por grama de produto ( $\text{UAE min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ). O método está descrito nos anexos B e C.

### 3.2.3.4 Avaliação da cor

A avaliação da cor dos extratos obtidos nas filtrações foi realizada utilizando colorímetro (marca HunterLab<sup>®</sup>, modelo ColorQuest II Sphere) com sensor óptico geométrico de esfera. Estabeleceu-se o iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e a escala de leitura colorimétrica empregada foi a do sistema de coordenadas cromáticas com base no espaço de cor CIELAB  $L^*a^*b^*$ , onde  $L^*$  mede a luminosidade tendo uma variação de branco (100) a preto (0),  $a^*$  é uma indicação de tonalidade na direção do verde se assumir valores negativos ( $-a^*$ ) e na direção do vermelho se assumir valores positivos ( $+a^*$ ) e  $b^*$  é uma indicação de tonalidade na direção do azul se assumir valores negativos ( $-b^*$ ) e na direção do amarelo se assumir valores positivos ( $+b^*$ ).

### 3.2.3.5 Identificação dos compostos bioativos

Foram identificados os compostos bioativos do extrato clarificado da melhor condição dos experimentos. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Flexar Perkin Elmer, contendo bomba binária com gerenciamento de solventes e desgaseificador, com injetor automático Auto sampler Flexar LC (volume de injeção foi de 20  $\mu$ L), e com detector de comprimento de onda variável Flexar PDA, ajustado em 280 nm. Os comprimentos de onda 330 e 225 nm também foram monitorados. O método foi adaptado de Favaretto (2014). Foram pesquisadas as substâncias químicas de referência (SQR), cafeína (Sigma Aldrich, lote C0750), ácido clorogênico (>95% Sigma Aldrich, lote SLBS0103V) e teobromina (>99% Sigma Aldrich, lote BCBS1162V). O método está descrito no Anexo D.

### 3.2.3.6 Caracterização do chá mate comercial

Para fins de comparação foram realizadas análises de sólidos solúveis, pH, turbidez e compostos fenólicos totais no chá mate comercial, como apresentadas nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2.

## 3.2.4 Microfiltração e ultrafiltração

### 3.2.4.1 Equipamento piloto de filtração tangencial

O estudo foi realizado em um equipamento piloto de filtração tangencial fornecido pela empresa WGM Sistemas (São Paulo – Brasil). Foram utilizadas três membranas com diferentes características de materiais e diâmetro de corte (Quadro 1), as membranas são da marca KOCH Membrane Systems.

Quadro 1 – Características das membranas utilizadas.

Membrana	Configuração	Diâmetro de corte	Material	Área de fluxo
Microfiltração	Tubular	0,1 $\mu$ m	Polietersulfona	0,1 m <sup>2</sup>
Ultrafiltração 1	Tubular	30 kDa a 80 kDa	Policloreto de vinilideno	0,1 m <sup>2</sup>
Ultrafiltração 2	Tubular	4 kDa	Cerâmica (Óxido de Zircônia)	0,1 m <sup>2</sup>

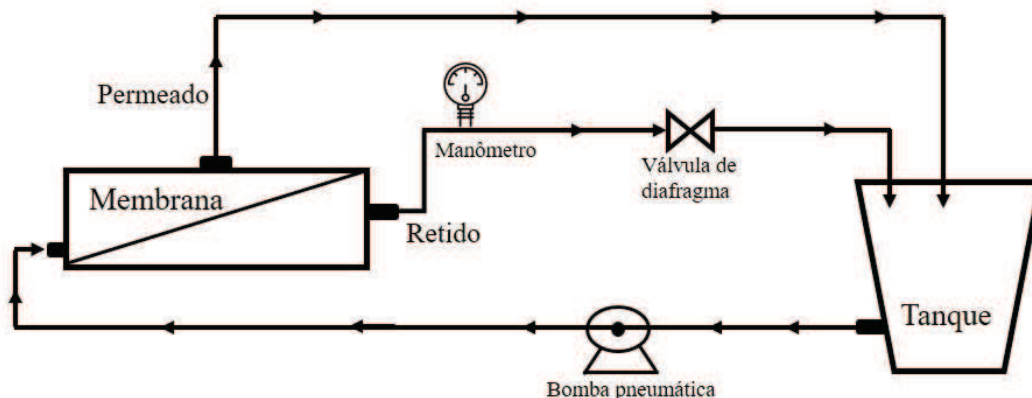
Fonte: Autor, 2019.

O equipamento é composto por um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade e uma bomba pneumática para alimentação na carcaça da membrana (figura 4).

O extrato aquoso de erva-mate foi alimentado no tanque e impulsionado pela bomba através da membrana, separando o permeado e o retido. Ambas correntes foram recirculadas para o tanque de alimentação, mantendo o volume constante durante a operação, que durou uma hora. As filtrações foram realizadas a temperatura ambiente.

Os parâmetros de filtração foram avaliados em diferentes pressões, 0,5 bar, 1 bar, 1,5 bar. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Ao final da filtração tangencial, foram coletadas amostras do permeado e retido, foram conduzidas para as análises, realizadas em triplicatas para averiguar a eficiência do processo e a influência das diferentes condições experimentais.

Figura 4 - Diagrama esquemático do equipamento piloto de microfiltração e ultrafiltração



Fonte: Autor, 2019.

#### 3.2.4.2 Limpeza das membranas

Antes de iniciar os processos de filtração foi avaliada o fluxo com água pura. Esse procedimento foi realizado para garantir a desobstrução total dos poros da membrana que deve atingir o mesmo fluxo após as limpezas. Foram realizadas as limpezas antes e após cada experimento nas membranas. A limpeza alcalina (pH entre 10,0 e 10,5) foi realizada com solução aquecida a temperatura entre 45 °C e 50 °C, preparada com hidróxido de sódio 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, diluído em permeado de osmose inversa e recirculação de permeado e retido por 20 minutos. Novo enxágue com água pura, medindo-se o pH e repetindo-se o procedimento até a neutralização. Para a limpeza ácida foi preparada uma solução com ácido nítrico (pH entre 1,8

e 2,0) e temperatura entre 45 °C e 50 °C e recirculação de permeado e retido por 30 minutos. Para a limpeza cloro-alcálica foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio (concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>).

#### 3.2.4.3 Fluxo do permeado

O fluxo permeado (J) corresponde à vazão do permeado por unidade de área. O fluxo permite quantificar o material que atravessa a membrana. O fluxo permeado, determinado pela Equação 1, normalmente é expresso em L/ (m<sup>2</sup>.h) ou kg/(m<sup>2</sup>.h), permitindo comparar a permeabilidade de membranas com áreas distintas. Durante os ensaios amostras do permeado foram coletadas numa proveta a cada 10 minutos.

$$J = \frac{V_p}{A_m \times t_m} \quad (1)$$

sendo:

J: fluxo permeado L/ (m<sup>2</sup>.h).

V<sub>p</sub>: volume de permeado obtido no tempo t (L);

A<sub>m</sub>: área de permeação da membrana (m<sup>2</sup>);

T<sub>m</sub>: tempo de filtração (h).

#### 3.2.4.4 Rejeição das membranas

O coeficiente de rejeição (R) representa a capacidade da membrana de reter moléculas, ele é dado em porcentagem. O coeficiente de rejeição foi calculado por meio da Equação 2:

$$R = \left( 1 - \frac{C_{\text{permeado}}}{C_{\text{alimentação}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

sendo:

R: rejeição (%);

C permeado: concentração do componente no permeado;

C alimentação: concentração do componente na alimentação.



### **3.2.5 Estabilização do extrato de erva-mate**

#### *3.2.5.1 Avaliação da estabilidade do extrato de erva-mate*

O extrato da melhor condição de experimento foi avaliado quanto a sua estabilidade a temperatura de refrigeração (4 °C) e temperatura ambiente (26 °C), este foi armazenado em estufa a fim de manter a temperatura estável. Do tempo 0, e no decorrer de 30 dias (1 vez por semana). Foram avaliados turbidez e compostos fenólicos totais, descritas no itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2.

### **3.3 TRATAMENTO DOS DADOS**

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre as médias serão determinadas pelo teste de Tukey.

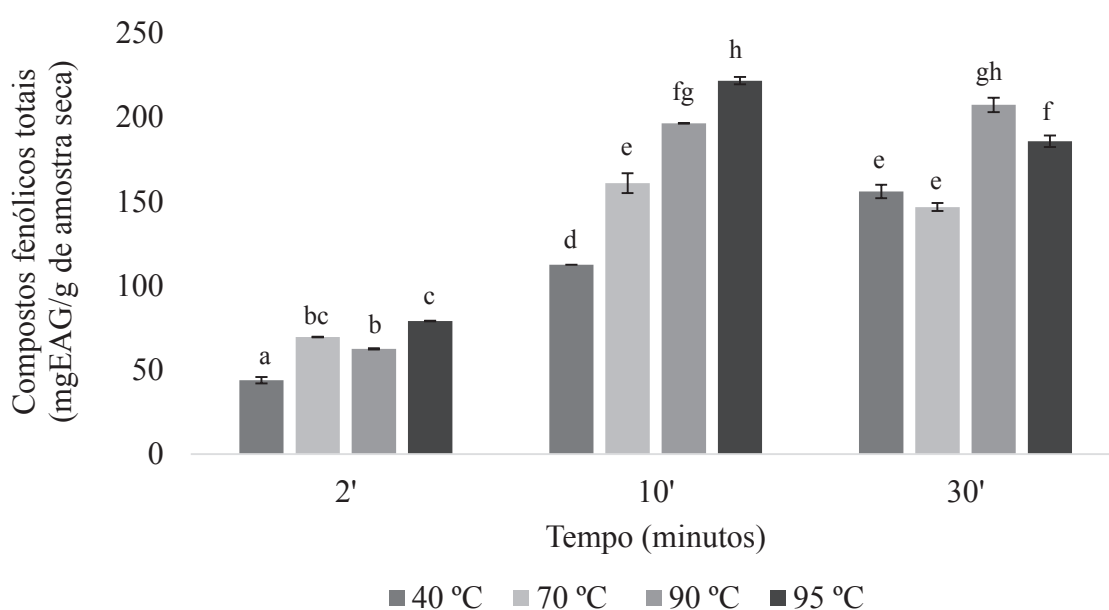


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE

A Figura 5 apresenta o efeito das condições de extração de tempo e temperatura na concentração de compostos fenólicos no extrato aquoso de erva-mate.

Figura 5 - Concentração de compostos fenólicos totais no extrato de erva-mate em diferentes temperaturas e tempos de extração.



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). Fonte: Autor, 2019.

Andreo e Jorge, (2006) colocam que a infusão com água é um bom método de extração, de baixo custo e facilidade no processo, no entanto é necessário controlar a temperatura e o tempo de extração para evitar degradação de compostos bioativos. As variáveis estudadas de tempo e temperatura apresentaram influência positiva, o aumento da temperatura e do tempo aumentou a eficiência da extração de compostos fenólicos da erva-mate, o aumento da temperatura causa uma ruptura na integridade da parede celular, tornando-a mais permeável, o que facilita a extração devido ao aumento da solubilidade com o solvente e a difusão dos compostos a serem extraídos, além disso ocorre o enfraquecimento das interações entre compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos, aumentando a taxa de difusão (LIU et al., 2013; OLIVEIRA, 2014).

Alguns autores estudaram parâmetros para a extração de compostos fenólicos da erva-mate (MURAKAMI et al. 2011; GERKE et al. 2018). Gerke et al. (2018) observaram que a temperatura e agitação são parâmetros operacionais que influenciaram no processo de extração, para Murakami et al. (2011) foram os parâmetros de temperatura e pH. Os autores observaram que a temperatura foi uma das variáveis com maior significância, à medida que a temperatura aumenta a extração dos compostos fenólicos é facilitada, aumentando a sua concentração, assim como observado no presente estudo para as temperaturas de 70, 90 e 95 °C.

A melhor condição de extração de compostos fenólicos foi a 95 °C por 10 minutos atingindo a concentração de  $221,86 \pm 2,1$  (mg de ácido gálico/g de amostra seca). De forma geral, observa-se que a elevação da temperatura aumenta a eficiência de extração até um ponto ótimo, houve um aumento na concentração dos compostos fenólicos no decorrer do tempo de extração (2 a 10 minutos) atingindo seu ponto ótimo com 10 minutos de extração, no entanto há uma diminuição na taxa de extração com 30 minutos, os compostos diminuíram sua concentração de  $221,86 \pm 2,1$  para  $185,84 \pm 3,5$  (mg de ácido gálico/g de amostra seca). A degradação dos compostos fenólicos geralmente ocorre devido a sua baixa estabilidade em altas temperaturas e longos tempos de extração (CONIDI; CASSANO; GARCIA-CASTELLO 2014).

A medida que o tempo de extração eleva-se ocorre um aumento na concentração dos compostos fenólicos, há aumento do tempo de contato entre o solvente e a amostra, o que proporciona maior penetração do solvente, favorecendo a extração. No entanto, no tempo de 2 minutos a extração de compostos fenólicos foi baixa, quando comparada aos outros tempos de extração, Yingngam, Supaka e Rungseevijitprapa (2015), sugerem que tempos reduzidos de extração não permitem a penetração eficiente do solvente na matriz vegetal, o que pode não ser suficiente para a completa transferência dos solutos para a fase orgânica, obtendo como resultado uma baixa extração dos compostos de interesse (OLIVEIRA, 2014).

A temperatura em que concentração de fenólicos totais se manteve estável para o presente trabalho entre 10 e 30 minutos foi a temperatura de 90 °C. Essa estabilização pode ser justificada pela segunda lei de difusão de Fick, que prevê que após um determinado tempo ocorre um equilíbrio entre as concentrações do soluto na matriz sólida e na solução, a partir desse ponto o tempo já não é mais uma variável favorável para a extração de compostos fenólicos (SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007). Assim para a obtenção do extrato aquoso, a temperatura e tempo escolhidos foram de 90° C por 10 minutos.

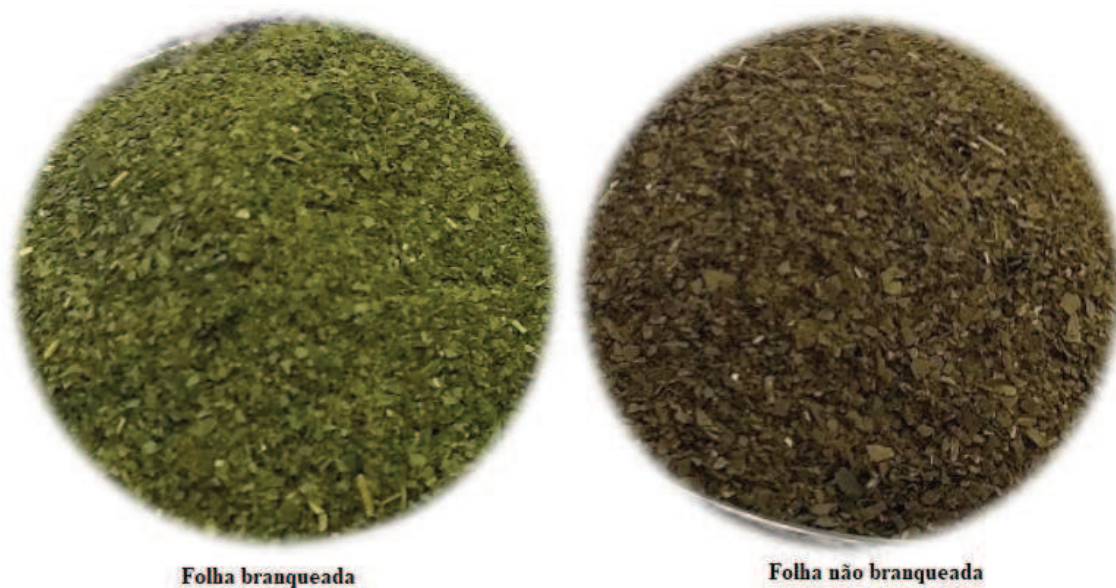
Os extratos foram avaliados em relação aos sólidos solúveis para as temperaturas de 40 e 70 °C o valor obtido foi de 1,3° Brix. Para as temperaturas de 90 e 95 °C, foi de 1,7° Brix, isso

demostra que as condições de temperatura do extrato também são relevantes para o rendimento deste parâmetro.

Foi realizado branqueamento nas folhas *in natura*, com o objetivo da inativação das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, as oxidases são encontradas naturalmente na erva-mate *in natura*, e quando não tem sua atividade enzimática inibida causam escurecimento das folhas (Figura 6) e alteram o sabor das bebidas obtidas com o produto desidratado, normalmente conferindo amargor (SANTOS, 2009). Devido a presença das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, pode ocorrer a oxidação dos compostos fenólicos, estas enzimas oxidam os compostos fenólicos, removendo hidrogênio de suas ramificações dando origem as quinonas, e essas podem se condensar, resultando na formação da melaninas (VILAS BOAS, 2002).

Nesse sentido realizou-se a extração de compostos fenólicos da folha branqueada e não branqueada. A concentração dos compostos fenólicos foi três vezes maior na folha com tratamento (402,63 mgEAG/g de amostra seca) do que a folha sem tratamento, apenas seca em estufa (124,73 mgEAG/g de amostra seca).

Figura 6 - Erva-mate branqueada e não branqueada



Fonte: Autor 2019.

Após secagem em estufa, a erva-mate apresentou uma diminuição da umidade inicial (35 %), para 9,4 %. Este valor encontrado atende ao exigido pela legislação que é no máximo 10% (BRASIL, 2002).

Foram realizadas análises no chá mate comercial e extrato aquoso de erva-mate, a fim de avaliar e comparar alguns parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização do extrato aquoso de erva-mate e do chá mate comercial

<b>Ensaio</b>	<b>pH</b>	<b>Sólidos Solúveis (°Brix)</b>	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>Compostos fenólicos totais (mg/g)<sup>1</sup></b>
<b>Extrato bruto</b>	5,2±0,08	1,6 ±0,04	340 ±4,64	402,5 ±0,8
<b>Chá mate Comercial</b>	3,78±0,1	9,5±0,1	24,72±0,01	64,69±1,8

Resultados expressos como média ± desvio padrão.<sup>1</sup>expresso em miligrama equivalente a ácido gálico por grama de amostra seca. Fonte: Autor 2019.

Os sólidos solúveis e pH apresentados para o chá mate comercial se diferem do extrato aquoso da erva-mate, no chá mate há adição de açúcares, que aumentam a quantidade de sólidos solúveis, e acidulantes, que diminuem o pH do mesmo.

Outro parâmetro é a concentração dos compostos fenólicos presentes no chá mate comercial (64,69±1,8 mgEAG/g de amostra seca). Em comparação com o extrato aquoso de erva-mate (402,5±0,8 mgEAG/g de amostra seca) a concentração é menor. Isso pode ser explicado, devido ao processamento no qual a erva-mate utilizada para o chá mate comercial é submetida (Figura 2), isso ocorre pela possível degradação de alguns compostos devido as altas temperaturas necessárias no processo de tostagem (LIMA et al., 2016). O extrato bruto apresenta uma elevada turbidez (340 ±4,64 NTU), este extrato não foi submetido a um tratamento de clarificação, é nesse sentido que o extrato aquoso de erva-mate precisa ser submetido a um processo de clarificação.

## 4.2 MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO

A Tabela 3 apresenta a caracterização dos parâmetros físico-químicos para alimentação e permeados das membranas estudadas.

Tabela 3 - Caracterização das alimentações e permeados dos experimentos

<b>Correntes das filtrações</b>	<b>Sólidos totais (g/L)</b>	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>Compostos fenólicos totais (mg/g)<sup>1</sup></b>
<b>Correntes da Microfiltração (0,1 µm)</b>			
<b>A</b>	15,1 <sup>b</sup> ±1,0	464,5 <sup>b</sup> ±9,5	141,6 <sup>a</sup> ± 7,2
<b>P 0,5</b>	10,7 <sup>a</sup> ±3,2	19,2 <sup>a</sup> ±14,0	91,4 <sup>a</sup> ± 23,4
<b>P 1</b>	10,8 <sup>a</sup> ±0,8	10,3 <sup>a</sup> ±1,2	101,6 <sup>a</sup> ± 17,6
<b>P 1,5</b>	10,1 <sup>a</sup> ±0,1	36,1 <sup>a</sup> ±12,1	90,8 <sup>a</sup> ± 2,6
<b>Correntes da Ultrafiltração (30 a 80 kDa)</b>			
<b>A</b>	14,0 <sup>b</sup> ±1,6	267,3 <sup>b</sup> ±23,5	158,5 <sup>a</sup> ± 2,6
<b>P 0,5</b>	9,8 <sup>a</sup> ±0,7	0,22 <sup>a</sup> ±0,0	129,0 <sup>a</sup> ± 9,0
<b>P 1</b>	9,8 <sup>a</sup> ±0,0	1,2 <sup>a</sup> ±0,9	99,7 <sup>a</sup> ± 18,8
<b>P 1,5</b>	12,1 <sup>ab</sup> ±0,8	0,5 <sup>a</sup> ±0,3	106,6 <sup>a</sup> ± 11,4
<b>Correntes da Ultrafiltração (4 kDa)</b>			
<b>A</b>	13,3 <sup>b</sup> ±1,1	364,7 <sup>b</sup> ±25,3	149,1 <sup>a</sup> ± 7,7
<b>P 0,5</b>	8,6 <sup>a</sup> ±2,4	9,2 <sup>a</sup> ±0,6	85,1 <sup>a</sup> ± 29,2
<b>P 1</b>	11,0 <sup>ab</sup> ±1,3	10,8 <sup>a</sup> ±2,1	86,0 <sup>a</sup> ± 14,8
<b>P 1,5</b>	9,0 <sup>a</sup> ±1,5	9,5 <sup>a</sup> ±1,1	90,3 <sup>a</sup> ± 9,0

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes para cada membrana na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05). <sup>1</sup>expresso em miligrama equivalente a ácido gálico por grama de amostra. A: alimentação; R: retido; P:permeado. 0,5; 1; 1,5 (pressões utilizadas em bar).

Fonte: Autor, 2019.

Chandini et al., (2013) relataram que as bebidas como chás devem apresentar valores de turbidez inferiores a 50 NTU para serem consideradas comercializáveis e serem aceitas pelos consumidores. Todos os extratos clarificados se encontram abaixo deste valor citado. A turbidez dos extratos variaram de 0,22 a 36,16 NTU, os extratos clarificados pelas membranas e pressões estudadas diminuíram a turbidez de maneira favorável, em relação a turbidez, qualquer um dos extratos clarificados poderiam ser comercializados.

A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) foi a que apresentou os menores valores de turbidez variando de 1,2 a 0,22 NTU, o extrato bruto tinha uma turbidez elevada 267,3 ± 23,5 e os extratos clarificados nesta membrana apresentaram uma turbidez próxima a zero. Gerke et al. (2017) clarificou extrato bruto de erva-mate com membranas, os autores obtiveram valores de turbidez do extrato clarificado próximo de zero, como encontrado no presente estudo.

A turbidez é um parâmetro imprescindível para a aceitabilidade de bebidas funcionais. Produtos à base de extratos de plantas podem causar problemas tecnológicos como precipitação

dos sólidos suspensos, resultando um aspecto de turvo as bebidas, isso por que os compostos fenólicos se complexam com coloides presentes nestes extratos dando este aspecto a estas bebidas, a quantidade de sólidos está diretamente ligada a turbidez, como apresenta a tabela 3, à medida que diminui os sólidos totais das correntes da alimentação para o permeado, isso ocorre também com o parâmetro de turbidez.

Não houve diferença significativa para a concentração dos compostos fenólicos entre as correntes, para todas as membranas estudadas, as concentrações dos extratos clarificados variaram de  $129,08 \pm 9,0$  a  $85,12 \pm 29,2$  mgEAG/g de amostra seca. Como comentado anteriormente, os compostos fenólicos podem ter atividade antioxidantes. O campo científico já vem estudando a adição de fenólicos como antioxidante natural em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Faion et al. (2015) estudaram a influência da adição de diferentes concentrações de extrato de erva-mate em queijo prato. A atividade antioxidante dos extratos de erva-mate foram comprovadas. Durante a maturação, todas as formulações com adição de culturas adjuntas e extrato de erva-mate apresentaram menor oxidação lipídica. Os extratos foram efetivos sobre a oxidação protéica após 30 dias de armazenamento nos produtos das formulações com 0,1% e 0,2% de extrato. Sordini et al. (2019) recuperaram compostos fenólicos de uma estação de tratamento de óleos, o extrato recuperado rico em compostos fenólicos demonstrou ação como antioxidante natural, protegendo o  $\alpha$ -tocoferol contra a oxidação e dificultando a formação de compostos voláteis negativos. Como demonstrados em estudos de Faion et al. (2015) e Sordini et al. (2019), os compostos fenólicos possuem capacidade antioxidante.

Observa-se uma variação dos compostos fenólicos dos extratos brutos que foram alimentados a membrana, assim como as concentrações do extrato bruto apresentado na tabela 1. Isso pode ser explicado por que a composição das plantas é influenciada por diferentes elementos de cultivo (solo, temperatura, nutrientes) e processamento (tempo, temperatura). Durante o crescimento, o metabolismo secundário da planta pode produzir um grande número de compostos fenólicos para proteger a planta de estressores ambientais (HECK et al., 2008). Vale ressaltar que foram utilizadas as mesmas condições de extração para a obtenção de todos os extratos apresentados neste estudo.

Os valores de pH variaram de 5,6 a 6,12 de todas as correntes analisadas para as três membranas, não havendo diferença significativa entre as correntes e pressões estudadas (tabelas 7 no apêndice E). Ferreira (2014) clarificou o extrato aquoso de erva-mate com membrana de ultrafiltração e os valores de pH encontrados são parecidos com o presente do estudo (pH em torno de 6), onde não diferiram em relação a alimentação, permeado e retido. Os chás prontos

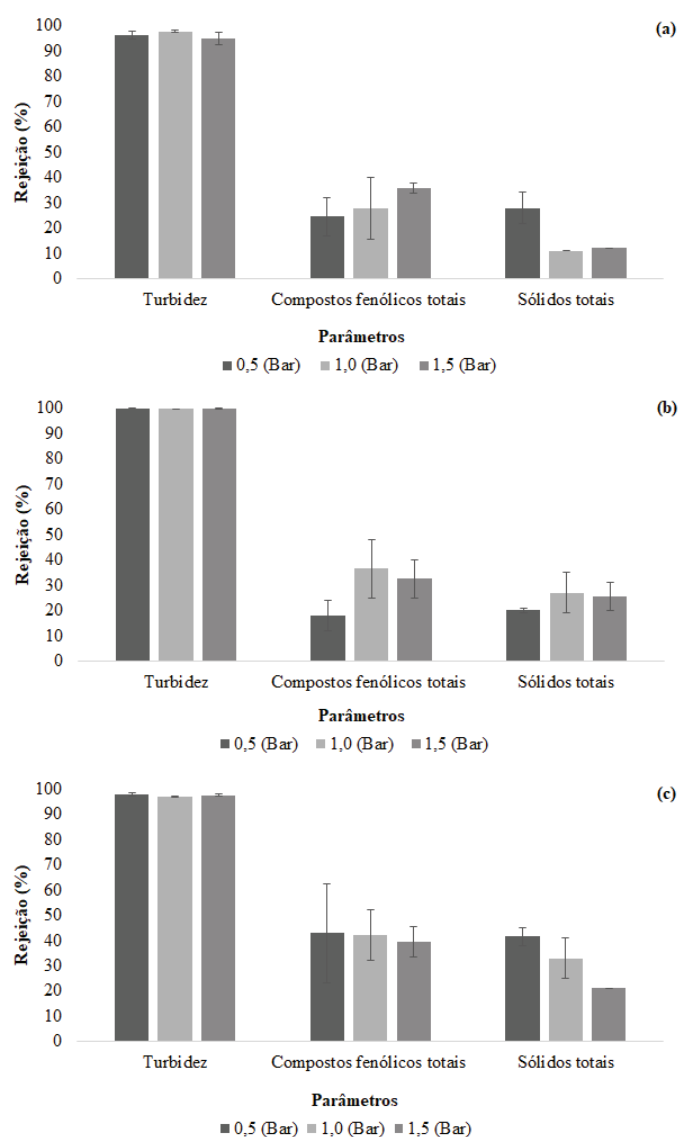


para consumo apresentam valores de pH menores, entre 3 e 4 (tabela 1), isso porque há adição de estabilizantes e acidulantes nestes produtos, com o propósito de manterem suas características químicas (LUNKES; LINA, 2014), e aumento da vida de prateleira dos mesmo.

Para as correntes de alimentação e permeado as quantidades das enzimas polifenoloxidasas e peroxidases não chegaram a uma unidade de atividade enzimática (tabela 6 no apêndice D), comprovando que o branqueamento nas folhas foi eficiente.

A figura 7 apresenta as rejeições das membranas estudadas para os parâmetros de turbidez, atividade antioxidante e compostos fenólicos.

Figura 7 - Rejeição para as membranas de microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ) (a); Ultrafiltração (30 a 80 kDa) (b); Ultrafiltração (4 kDa) (c).



<sup>1</sup>Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão em porcentagem (%).

As membranas apresentaram baixa rejeição dos compostos fenólicos e alta rejeição dos compostos que causam turbidez ao extrato. Para os compostos fenólicos, a membrana de microfiltração obteve uma rejeição de 27,8 e 35,7 %, a de ultrafiltração (4 kDa) uma rejeição de 39,35 e 42,85 %. A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) apresentou a menor rejeição para os compostos fenólicos em todas as pressões estudadas (18 e 30,5 %). A rejeição dos compostos fenólicos não é desejável em um processo de clarificação, afim de manter as propriedades nutricionais do extrato (BINDES et al. 2019b). Gerke et al. (2017), os autores explicam que em um processo de clarificação é desejável obter um extrato sem turbidez enquanto retém, tanto quanto possível, o teor de nutrientes, isto é, o coeficiente de rejeição para a corrente do permeado deve ser próximo de zero.

Embora existam poucos estudos na literatura abordando o tratamento do extrato de erva-mate utilizando os processos de separação por membranas, a literatura aponta estudos relevantes com extratos de plantas e sucos. A exemplo disso, Mereddy et al. (2017) clarificaram suco de beterraba e obteve valores satisfatórios, o processo de clarificação com membranas removeu 99% de turbidez do suco, ainda obteve uma rejeição de 95% dos sais e nitrato.

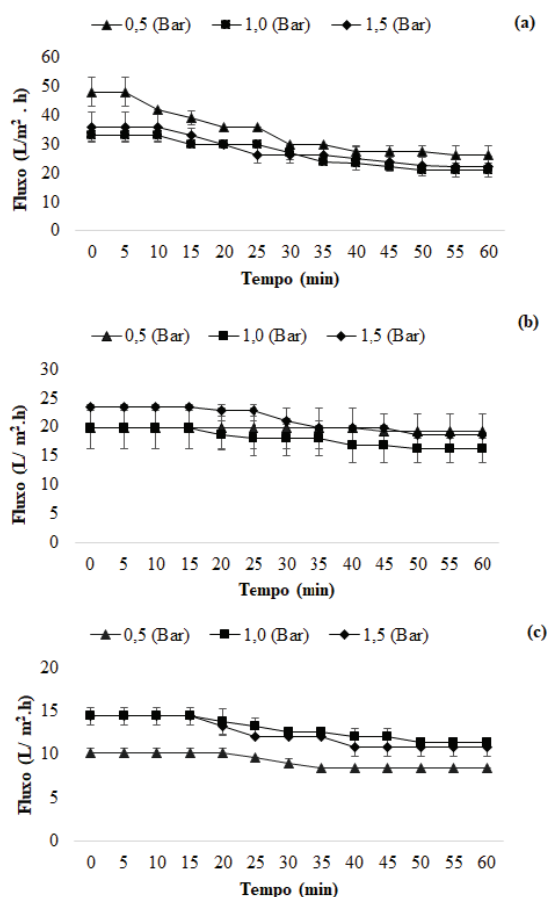
Souza et al. (2016) purificaram os compostos fenólicos do chá verde através da ultrafiltração, as reduções na turbidez foram superiores a 90% em todas as membranas. No entanto, em relação rejeição para os compostos fenólicos as membranas de 10 e 5 kDa retiveram quase a totalidade dos polifenóis da corrente da alimentação, enquanto a retenção das membranas de 20 e 30 kDa foi inferior a 70 %. Os autores atribuem esta alta retenção dos compostos fenólicos a dois fatores, por fenômenos de incrustação e/ou interações dos compostos fenólicos com as proteínas presentes no chá verde.

Em relação aos compostos que causam turbidez ao extrato, os mesmos tiveram uma rejeição acima de 95% para todas as membranas e pressões no presente estudo. A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) obteve uma rejeição de 99,9%. Estes valores também foram encontrados para Gerke et al. (2017), os autores clarificaram extrato de erva-mate em diferentes membranas, e obtiveram uma retenção de turbidez em 100%, permitindo uma clarificação eficiente, reduzindo a turbidez inicial para próximo de zero.

Estes estudos corroboram que os processos de separação por membranas podem ser alternativos aos processos convencionais, clarificando extratos de plantas e preservando os compostos de interesse.

A figura 8 apresenta a análise de fluxos para microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ), ultrafiltração (30 a 80 kDa), ultrafiltração (4 kDa) para todas as pressões estudadas.

Figura 8 - Fluxo do permeado durante a filtração por membranas microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ) (a); Ultrafiltração (30 a 80 kDa) (b); Ultrafiltração (4 kDa) (c).



Fonte: Autor 2019.

A membrana de microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ) apresenta uma queda de fluxo com 10 minutos de operação com pressão de 0,5 bar, o fluxo inicial 48 L/m<sup>2</sup>.h declinou para 26,4 L/m<sup>2</sup>.h até o final da filtração. O declínio do fluxo permeado inicial pode ser atribuído à adsorção de espécies macromoleculares pela membrana, ao acúmulo de uma camada de polarização de concentração e ao acúmulo de pequenos solutos nos poros da membrana. Cassano et al. (2014) relataram que é possível ocorrer uma associação entre compostos fenólicos e outros solutos presentes na solução, por exemplo, polissacarídeos, gerando partículas maiores que podem ser retidas na camada filtrante da membrana, contribuindo para a incrustação.

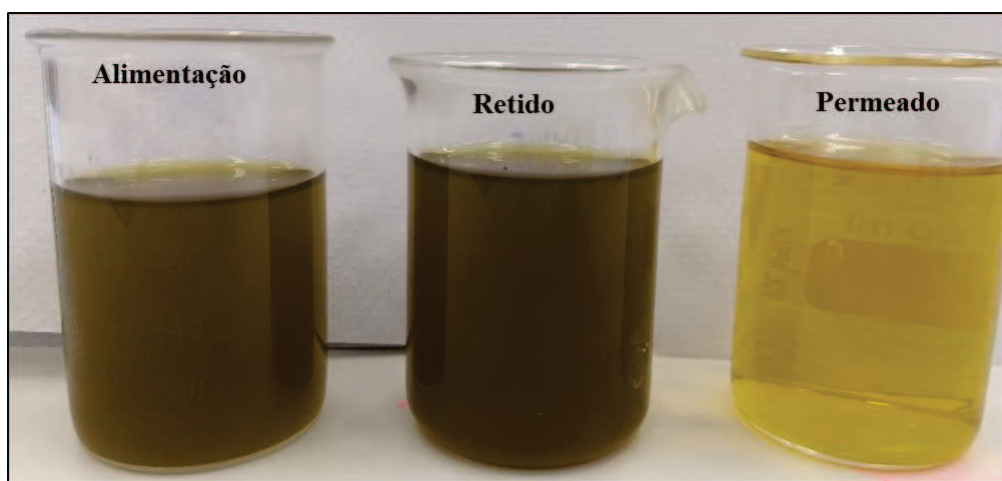
A membrana de ultrafiltração (4 kDa) obteve uma retenção de 42,85% dos compostos fenólicos totais, isso explica o fato da mesma ter apresentado o menor fluxo permeado 10,2 19,2 L/m<sup>2</sup>.h para a pressão de 0,5 bar e 14,4 L/m<sup>2</sup>.h para as pressões 1 e 1,5 bar. O extrato de erva-mate possui uma composição complexa, com componentes de diferentes pesos moleculares como polissacarídeos da parede celular (como lignina, celulose e pectina), por isso

forma-se a incrustação quase que instantaneamente. O que resulta em um baixo fluxo desta membrana, quando comparada com as demais (RAO et al., 2011).

Para todas as membranas e pressões estudadas, houve um declínio do fluxo no decorrer da filtração. Com exceção para a membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) pressão de 0,5 bar, esta apresentou um fluxo inicial de 19,8 L/m<sup>2</sup>.h, exibindo um fluxo constante até 40 minutos de operação, após o fluxo obteve um declínio mínimo para 19,2 L/m<sup>2</sup>.h mantendo este volume até o fim da operação. Isso pode ser explicado ao fato de que a mesma, obteve baixa retenção de compostos fenólicos (18%) e sólidos totais (20%) na pressão de 0,5 bar.

A tabela 4 apresenta a análise de cor realizada nos extratos obtidos nas filtrações, os permeados clarificados (figura 9).

Figura 9 - Obtenção de extratos do processamento com a membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) a pressão de 0,5 bar.



Fonte: Autor, 2019.

Os valores de “L” demonstram intensidade a cor amarelo claro e luminosidade alta ( $L^* = 54,44$  até  $66,89$ ), sendo que o valor próximo a 100 significa cor com brilho intenso. Os valores de “b” foram positivos para os extratos clarificados, sugerindo que amarelo é a principal cor dos extratos. Já os extratos da alimentação de todas as membranas e pressões estudadas, apresentaram valores de luminosidade ( $L^* = 33,55$  até  $39,84$ ), penderam a cores mais escuras, como vermelho e marrom, por apresentarem uma grande quantidade de sólidos suspensos. Muitos dos sólidos em suspensão presentes na alimentação, e que ficaram na corrente do retido, são pigmentos que dão esta coloração característico de chá turvo. Esse comportamento das cores para os permeados, é um parâmetro importante. Já que o aparecimento de compostos de

coloração marrom são percebidos como de baixa qualidade pelos consumidores que preferem bebidas deste seguimento translúcidas.

Tabela 4 - Análise de cor das correntes das filtrações

Correntes das filtrações	L*	a*	b*
<b>Correntes da Microfiltração (0,1 µm)</b>			
A	39,84 <sup>a</sup> ± 0,47	8,92 <sup>a</sup> ± 0,07	25,77 <sup>a</sup> ± 0,69
P 0,5	56,65 <sup>b</sup> ± 2,91	9,13 <sup>a</sup> ± 2,43	46,04 <sup>b</sup> ± 1,95
P 1	54,44 <sup>b</sup> ± 1,55	10,13 <sup>a</sup> ± 1,41	44,54 <sup>b</sup> ± 1,38
P 1,5	59,30 <sup>b</sup> ± 0,83	8,83 <sup>a</sup> ± 2,32	43,76 <sup>b</sup> ± 5,52
<b>Correntes da Ultrafiltração (30 a 80 kDa)</b>			
A	39,29 <sup>a</sup> ± 0,04	10,67 <sup>a</sup> ± 0,22	25,03 <sup>a</sup> ± 0,07
P 0,5	61,73 <sup>b</sup> ± 2,38	5,12 <sup>a</sup> ± 1,35	46,58 <sup>b</sup> ± 0,12
P 1	62,71 <sup>b</sup> ± 2,61	3,77 <sup>a</sup> ± 2,59	44,56 <sup>b</sup> ± 1,01
P 1,5	63,88 <sup>b</sup> ± 0,18	2,92 <sup>a</sup> ± 0,65	46,08 <sup>b</sup> ± 0,60
<b>Correntes da Ultrafiltração (4 kDa)</b>			
A	33,55 <sup>a</sup> ± 1,27	5,89 <sup>a</sup> ± 0,20	15,38 <sup>a</sup> ± 2,26
P 0,5	66,05 <sup>b</sup> ± 3,00	-0,15 <sup>a</sup> ± 2,53	43,54 <sup>b</sup> ± 1,02
P 1	66,54 <sup>b</sup> ± 2,23	-0,11 <sup>a</sup> ± 1,35	43,84 <sup>b</sup> ± 1,53
P 1,5	66,89 <sup>b</sup> ± 2,25	-1,14 <sup>a</sup> ± 2,25	41,07 <sup>b</sup> ± 1,44

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). L\* (luminosidade), a\* {verde (-) e vermelho(+)}, b\* {amarelo (+) e azul (-)}. A: alimentação; P: permeado. 0,5; 1; 1,5 (pressões utilizadas em bar). Fonte: Autor 2019.

A escolha da membrana para continuação dos estudos baseou-se principalmente nos valores de rejeição em relação a turbidez (99,9%), compostos fenólicos (18%) e atividade antioxidante, pois são fatores relevantes para uma bebida preparada a base de extratos de ervas. Assim, o extrato clarificado na membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa), 0,5 bar, foi o utilizado para a continuidade deste trabalho.

### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

A tabela 5 apresenta os compostos bioativos presentes nos extratos de erva-mate, foram identificadas as metilxantinas, teobromina e cafeína, e o composto fenólico, ácido clorogênico.

Tabela 5 - Teores de compostos bioativos no extrato de erva-mate

Ensaio	Teobromina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ácido clorogênico ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cafeína ( $\mu\text{g/ml}$ )
Extrato bruto	1353,3 $\pm$ 0,01	522,5 $\pm$ 0,02	355,1 $\pm$ 0,01
Extrato clarificado	1068,4 $\pm$ 0,00	308,0 $\pm$ 0,01	330,8 $\pm$ 0,02

Fonte: Autor, 2019.

A perda de cafeína no processo de clarificação foi baixa, como indicado pelo valor de rejeição de 6,8 %. Isso pode ser explicado por que a cafeína é um composto de baixo peso molecular (194 Da), permeia com facilidade a membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa). Gerke et al. (2017), obtiveram uma retenção dos compostos bioativos variaram entre 11 e 35,5 %, para três membranas estudadas. Os autores observam que a perda bioativa pode ser explicada pela rejeição sólida em suspensão na membrana e a adsorção de cada compostos na superfície da membrana, para a membrana de ultrafiltração de polietersulfona (50 kDa) a rejeição de cafeína foi de 18,3 %.

As bebidas preparadas a base de erva-mate são consideradas uma fonte de metilxantinas, o teor de cafeína e teobromina ingerido varia entre 25-175 mg e 6-28,5 mg, respectivamente, e depende da matéria-prima utilizada, forma de preparo e quantidade ingerida (JÚNIOR e MORAND, 2016). Vale ressaltar a importância destes compostos na saúde e na utilização como aditivos alimentares. Todos estes compostos têm em comum o efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, com a cafeína como o representante mais potente (HECK; MEJIA, 2007).

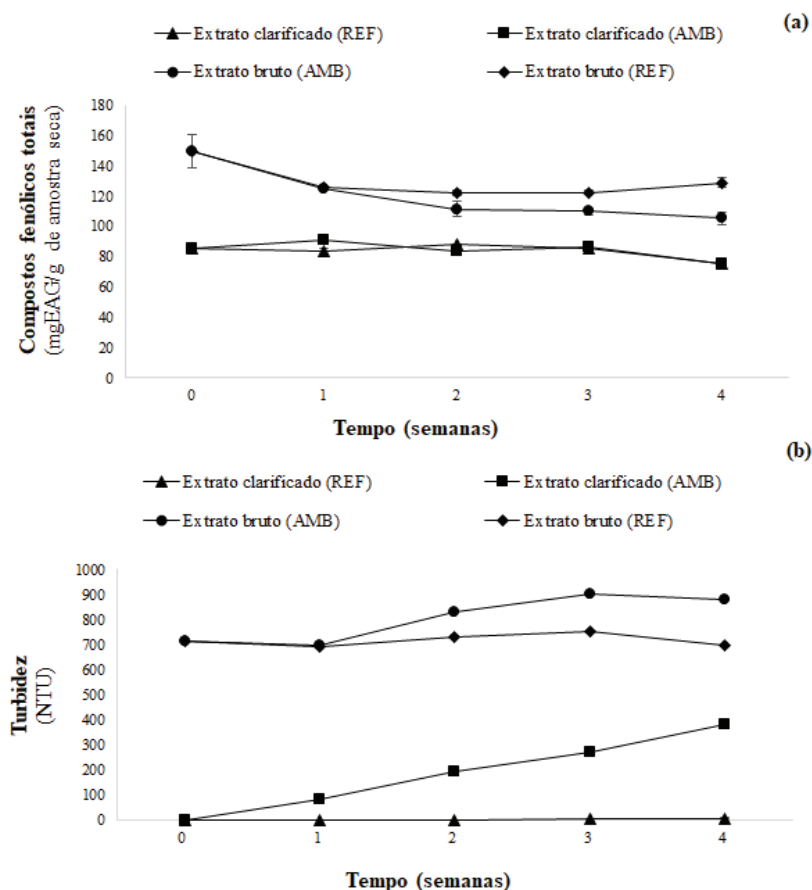
O ácido clorogênico é conhecido por ter vários usos importantes e terapêuticos, como atividade antioxidante, antibacteriano, antimicrobiano, antiobesidade, anti-inflamatório e estimulador do sistema nervoso central (NAVEED et al., 2018). Essa observação é importante porque o ácido clorogênico tem se mostrado o principal responsável pela capacidade antioxidante dos compostos fenólicos (CORREA et al., 2017). Atividades antioxidantes proporcionalmente maiores demonstraram que o tipo de fenólicos, e não a quantidade, é responsável pelas atividades antioxidantes (RAJAEI et al., 2010). Compostos fenólicos

distintos diferem em sua capacidade antioxidante, biodisponibilidade e metabolismo (SANCHEZ et al., 2015).

#### 4.4 ESTABILIDADE DO EXTRATO DE ERVA-MATE CLARIFICADO

Foi avaliada o efeito do armazenamento para duas temperaturas (ambiente e refrigeração) por 30 dias do extrato de erva-mate clarificado (figura 10), de modo a produzir um produto estabilizado mantendo suas qualidades, o extrato clarificado foi armazenado sem qualquer aditivo ou conservante.

Figura 10 - Compostos fenólicos totais (a) e turbidez (b) da vida de prateleira dos extratos de erva-mate clarificados.



Fonte: Autor, 2019.

Como apresentado anteriormente, as membranas de filtração foram eficientes na clarificação do extrato bruto de erva-mate, assim como na conservação dos compostos fenólicos. É importante salientar que este extrato clarificado pode ser utilizado como produto, sendo adicionado em bebidas, outra finalidade é como antioxidante natural. O armazenamento

do extrato é uma etapa de suma importância, já que estes compostos independe da sua finalidade precisam manter sua estabilidade.

O extrato armazenado em temperatura de refrigeração, não apresentou aumento em relação a turbidez, estando na faixa de 0,22 e 8,5 NTU, como já citado anteriormente, Chandini et al., (2013) afirmam que as bebidas como chás devem apresentar valores de turbidez inferiores a 50 NTU, para serem comercializadas. No entanto, para armazenamento em temperatura ambiente, o extrato apresentou um aumento de turbidez de 0,24 para 385 NTU. Assim este extrato não poderia ser aplicado em bebidas devido este aumento de turbidez, já que os consumidores preferem produtos translúcidos para este fim, esta turbidez elevada pode ser decorrente do crescimento de microrganismos.

A quantidade de compostos fenólicos extraídos industrialmente chegou a 16.380 toneladas em 2015 e estima-se que até 2024 tenha um aumento para 33.880 toneladas. Grande parte destes compostos é destinada a indústria de bebidas, destacando o crescimento da demanda por bebidas funcionais (44%), assim como em outros alimentos (33%) (ADEBOOYE, ALASHI e ALUKO, 2018). Os compostos fenólicos foram preservados durante os 30 dias de para as duas temperaturas armazenamento, demonstrado na figura 10.

Sousa et al. (2016) avaliaram a estabilidade do chá verde clarificado em diferentes membranas, e observaram uma queda de 9 a 60% na concentração de polifenóis na primeira semana de armazenamento a 5° C, no decorrer das semanas, os permeados mantiveram-se estáveis por 30 dias. Bindes et al., (2019b) observaram a estabilidade do chá verde clarificado por membrana de microfiltração, o permeado microfiltrado durante 30 dias de refrigeração, obteve.

Os extratos brutos armazenados a temperatura ambiente e refrigeração tiveram uma queda na concentração dos compostos fenólicos, isso pode ser explicado por que estes extratos não foram submetidos ao processo de clarificação, macromoléculas como proteínas e polissacarídeos ficaram suspensas no meio, dando o aspecto de turvo, assim como observamos o aumento da turbidez na figura 10 (gráfico b) para os extratos brutos. Como já mencionado anteriormente, os compostos fenólicos se complexam com estas macromoléculas, formando particulados maiores, que além do aspecto de turvo diminuem a concentração dos compostos fenólicos (MONSANTO et al., 2014).



## 5 CONCLUSÃO

Foi avaliada a influência do tempo e temperatura na extração dos compostos fenólicos, a maior concentração destes compostos foram obtidas através de temperaturas altas de extração 70, 90 e 95 °C. Temperaturas altas rompem a estrutura das células nas folhas facilitando a extração destes compostos por difusão, entretanto observamos neste estudo que para 95 °C por 30 minutos houve uma degradação dos compostos fenólicos, assim é sugerido para temperaturas altas que o tempo de extração seja reduzido. A condição de extração de 90° C por 10 minutos foi a escolhida para dar continuidade nos experimentos.

O extrato bruto de erva-mate foi clarificado por três membranas, os valores de turbidez para os extratos clarificados variaram de 0,22 e 36,16 NTU, as membranas foram eficientes na preservação dos compostos fenólicos, não houve diferença significava entre as correntes de alimentação e permeado, com isso todos os extratos clarificado pelas membranas possuem potencial de uso. A rejeição dos valores de turbidez foram superiores a 95% e inferiores a 42 % para os compostos fenólicos, os processos de separação por membranas clarificaram o extrato bruto de erva-mate e conservaram os compostos bioativos.

A membrana que apresentou melhor eficiência foi a de ultrafiltração 1 (30 a 80 kDa) utilizando a pressão de 0,5 bar, apresentou baixa rejeição dos compostos fenólicos (18%), alta rejeição de turbidez (99,9%) e fluxo estável, o que é desejável em um processo de clarificação de extratos e chás, esta foi a membrana utilizada para dar continuidade para a próxima etapa do trabalho. Os compostos bioativos identificados no extrato clarificado foram cafeína, teobromina e ácido clorogênico, ressalta-se a importância do ácido clorogênico para a indústria de alimentos, como antioxidante natural.

Os compostos fenólicos são instáveis em condições adversas, no entanto, foi comprovado que as membranas de filtração estabilizam este extrato. Os extratos clarificados apresentaram estabilidade para os compostos fenólicos e turbidez ao longo de 30 dias armazenados em temperatura de refrigeração. A aplicação desses extratos é abrangente, podendo ser utilizado na indústria como base para bebidas com apelo funcional.



## REFERÊNCIAS

ABIR (Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerante e Bebidas Não Alcoólicas). **BNA Brasil** - Relatório 2019.

ABDELRASOUL, A.; DOAN; H.; LOHI, A. Fouling in membrane filtration and remediation methods. In: **Mass transfer – Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling**. InTech, cap. 4, p. 24, 2013.

ADEBOOYE, O. C.; ALASHI, A. M.; ALUKO, R. E. A brief review on emerging trends in global polyphenol research. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. e12519, 2018.

AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, p. 786–793, 2010.

ANDREO, D; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

AZEREDO, H.M.C. 2004. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 195.

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

BALYAN, U.; VERMA, S. P.; SARKAR, B. Phenolic compounds from *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves: Extraction and membrane purification. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 43-58, 2019.

BERTÉ, K. A. S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; RIBANI, R. H. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

BINDES, M. M. M.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M.; BOFFITO, D. C. Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 97-104, 2019a.

BINDES, M. M. M.; REIS, M. H. M.; CARDOSO, V. L.; BOFFITO, D. C. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and Moringa oleifera seeds). **Ultrasonics sonochemistry**, v. 51, p. 111-119, 2019b.

BOAVENTURA, B. C. B.; MURAKAMI, A. N. N.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; MURAKAMI, F. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Enhancement of 93 bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686–692, 2013.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A.G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 303, de 07 de novembro de 2002. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Composto de Erva-Mate. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 08 de nov. de 2002.

CAMPOS, D.; CHIRINOS, R.; BARRETO, O.; NORATTO, G.; PEDRESCHI, R. Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 747–754, 2013.

CASSANO, A.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment. **Water research**, v. 45, n. 10, p. 3197-3204, 2011.

CASSANO, A.; CONIDI, C.; RUBY-FIGUEROA, R. Recovery of flavonoids from orange press liquor by an integrated membrane process. **Membranes**, v. 4, n. 3, p. 509-524, 2014.

CASSANO, A. **Integrated Membrane Systems and Processes**. John Wiley & Sons, Chichester, p. 34-60, 2016.

CHANDINI, S. K.; RAO, L. J.; SUBRAMANIAN, R. Membrane Clarification of Black Tea Extracts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 1926–1943, 2013.

CHANDRA, S., KHAN, S., AVULA, B., LATA, H., YANG, M. H., ELSOHLY, M. A., KHAN, I. A. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

COUTINHO, C.M.; CHIU, M.C.; BASSO, R.C.; RIBEIRO, A.P.B.; GONÇALVES, L.A.G.; VIOTTO, L.A. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**, v.42, p.536-550, 2009.

CONIDI, C; CASSANO, A; GARCIA-CASTELLO, E. Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. **Water Res.**, v. 48, pp. 363-374. 2014.

CONIDI, C.; CASSANO, A.; CAIAZZO, F.; DRIOLI, E. Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. **Journal of Food Engineering**, v. 195, p. 1-13, 2017

CONIDI, C.; DRIOLI, E.; CASSANO, A. Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration. **Current Opinion in Food Science**, v. 23, p. 149-164, 2018.

CORREIA, R. T.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M.; MACÊDO, G.; SHETTY, K., Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was temixed with soy flourusing *Rhizopus Oligosporus*. **Process. Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2004.

CORREA, V.G.; GONÇALVES, G.A.; SÁ-NAKANISHI, A.B.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; DIAS, M.I.; KOEHNLEIN, E.A.; SOUZA, C.G.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Effects of in vitro digestion and in vitro colonic fermentation on stability and functional properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) beverages. **Food chemistry**, v. 237, p. 453-460, 2017.

DAHMOUNE, F.; NAYAK, B.; MOUSSI, K.; REMINI, H.; E MADANI, K. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. **Food chemistry**, v. 166, p. 585-595, 2015.

DE MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZ-MARES, M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

ELFALLEH, W; KIRKAN, B; SARIKURKCU, C. Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 212-216, 2019.

EMBRAPA, (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Cultivo da Erva-Mate**. 2nd ed., p.1–55, 2014.

ESCALADA, G.; BRUMOVSKY, L. A.; HARTWIG, V. G. Influencia de la zona de cultivo y procesamiento de la yerba mate sobre su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 15, p. 66-74, 2011.

ESCRIBANO, J.; CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCÍA-CARMONA, F. Characterization of Monophenolase Activity of Table Beet Polyphenol Oxidase. Determination of Kinetic Parameters on the Tyramine/Dopamine Pair. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**, Washington DC, v.45, p.4209-4214, 1997

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

FAION, A.M.; BEAL, P.; RIL, F.A.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R.L.; VALDUGA, A.T.; OLIVEIRA, D.; VALDUGA, E. Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of Prato cheese. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 3, p. 1516-1524, 2015.

FAVARETTO, Adriana. **Aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do capim-annoni-2**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

FERREIRA, R. R. **Obtenção de Extrato Aquoso de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) Clarificado por Ultrafiltração**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2014.

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.

FUNDOMATE. Informativo FUNDOMATE. Porto Alegre/RS, Governo do Estado do Rio Grande do Sul – SEAPI, n. 14-34, 2015 até 2018. (Diversas edições).

FUJITA, S.; SAARI, N., MAEGAWA, M.; TETSUKA, T.; HAYASHI, N.; TONO, T. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). **J. Agric. Food Chem.** v. 43, p. 1138-1142, 1995.

GALANAKIS, C.M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: from ultrafiltration to the border of nanofiltration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 42, n. 1, p. 44-63, 2015.

GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 730–750, 22 jan. 2015.

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, Pages 204-212, 2017.

GERKE, I. B. B.; HAMERSKI, F.; SCHEER, P.A.; SILVA, V. R. Solid–liquid extraction of bioactive compounds from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves: Experimental study, kinetics and modeling. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 8, p. e12892, 2018.

HABERT A. C., BORGES C. P., NOBREGA, R. **Processo de Separação por Membranas**, 1º edição, Rio de Janeiro: Editora e-papers, 2006.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p.138-151, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394–8403, 2008.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020

IBGE, (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **SIDRA** – Sistema IBGE de Recuperação Automática: Agricultura. 2016.

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

JÚNIOR, A. M. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

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

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.L. Parameters affecting microwaveassisted extraction of withanolides. **Phytochemical. Analysis**, 12: 327-331. 2001.

KOTOVICZ, V. **Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) por ciclos de compressão de descompressão hidrostática**. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

LIMA, J. D. P.; FARAH, A.; KING, B.; PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Distribution of major chlorogenic acids and related compounds in Brazilian green and toasted *Ilex paraguariensis* (Maté) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64 n. 11, p. 2361-2370, 2016.

LIU, Z., DANG, J., WANG, Q., YU, M., JIANG, L., MEI, L.TAO, Y. Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 127- 134, 2013.

LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v.25, n.6, p.530–539, 2009.

LUNKES, B. F.; LINA, N. H. Evaluation of the pH and Titratable Acidity of Teas Commercially Available in Brazilian Market. **Revista Gaúcha Odontologica**, v. 62, n. 1, p. 59–64, 2014.

MADRONA, G. S.; TERRA, N. M.; COUTINHO FILHO, U.; MAGALHAES, S.F., CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Purification of phenolic compounds from genipap



(*Genipa americana* L.) extract by the ultrasound assisted ultrafiltration process. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 41, n. 1, 2019.

MEREDDY, R.; CHAN, A.; FANNING, K.; NIRMAL, N.; SULTANBAWA, Y. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. **Food chemistry**, v. 215, p. 311-317, 2017.

MOHAMMAD, A. W.; NG, C. Y.; LIM, Y. P.; NG, G. H. Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 4, p. 1143–1156, 2012.

MONDAL, M.; DE, S. Purification of Polyphenols from Green Tea Leaves and Performance Prediction Using the Blend Hollow Fiber Ultrafiltration Membrane. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-21, 2019.

MONSANTO, M.; TRIFUNOVIC, O.; BONGERS, P.; MEULDIJK, J.; ZONDERVAN, E. Black tea cream effect on polyphenols optimization using statistical analysis. **Computers & Chemical Engineering**, v. 66, p. 12-21, 2014.

MUÑOZ, R.C; FERNANDEZ, J.Y; FILA, V. Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. **Food chemistry**, v. 213, p. 753-762, 2016.

MURAKAMI, N. N. M.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) extract through nanofiltration. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211- 2216, 2011.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BOAVENTURA, B. C. B.; MUNOZ, I. B.; BRANCO, C. S.; SALVADOR, M.; MARASCHIN, M. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65.2013.

NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; ALIKAMBOH, A.; KHAN, G. J.; SHUMZAID, M.; AHMAD, F.; BABAZADEH, D.; FANG, F.X.; MODARRESI-GHAZANI, F.; HUA, L.W.; HUI, Z.X. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NUNES, M. A.; PAWLOWSKI, S.; COSTA, A. S.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P.; VELIZAROV, S. Valorization of olive pomace by a green integrated approach applying sustainable extraction and membrane-assisted concentration. **Science of The Total Environment**, v. 652, p. 40-47, 2019.

OLIVEIRA, A. L.; DESTANDAU, E.; FOUGERE, L.; LAFOSSE, M. Isolation by pressurized fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food Chemistry**, v. 145, p. 522-529, 2014.

PETRUS, J. C. C. **Processos de Separação nas Indústrias de Alimentos**. Material didático do Programa de Pós Graduação MINTER/DINTER em Engenharia de Alimentos – UFSC, 2011.

RAJAEI, A.; BARZEGAR, M.; MOBAREZ, A. M.; SAHARI, M. A.; ESFAHANI, Z. H. Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 107-112, 2010.

RAO, L.; HAYAT, K.; LV, Y.; KARANGWA, E.; XIA, S.; JIA, C.; ZHONG, F.; ZHANG, X. Effect of Ultrafiltration and Fining Adsorbents on The Clarification Of Green Tea. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 321-326, 2011.

RIACHI, L.G; MARIA, C.A.B. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

SÁNCHEZ BOADO, L.; FRETES, R.M.; BRUMOVSKY, L.A. Bioavailability and antioxidant effect of the *Ilex Paraguariensis* polyphenols. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 2, p. 326-335, 2015.

SANTOS, T.B. **Estudo cinético da oxidação enzimática do ácido 5-ocafeoilquínico por polifenoloxidases**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2009.

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

SANTOS, C. D.; SCHERER, R. K.; CASSINI, A. S.; MARCZAK, L. D. F.; TESSARO, I. C. Clarification of red beet stalks extract by microfiltration combined with ultrafiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 185, p. 35-41, 2016.

SEIFZADEH, N.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M.; GAVLIGHI, H. A.; CALANI, L.; DEL RIO, D.; GALAVERNA, G. Evaluation of polyphenolic compounds in membrane concentrated pistachio hull extract. **Food chemistry**, v. 277, p. 398-406, 2019.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, v. 55, p. 381- 387, 2007.

SILVA, F.V.M.; SULAIMAN, A. Advances in Thermo-sonication for the Inactivation of Endogenous Enzymes in Foods. In: **Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation**. p. 101-130, 2017.

SILVEIRA, F.A.O. **Anatomia Vegetal**. 2004. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/jaquelinefragoso/silveira-2004-anatomia-vegetal>>. Acesso em: 10 de maio de 2019.

SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; SCOPARO, C. T.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. Comprehensive analysis of maté (*Ilex paraguariensis*) compounds: development of chemical strategies for matesaponin analysis by mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 41, p. 7307-7315, 2011.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 25 - 30, Jan./Mar., 2012.

SANTOS, L.S.; CABRAL, B. V.; MADRONA, G. S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 188-198, 2016.

SORDINI, B.; VENEZIANI, G.; SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; SELVAGGINI, R.; LOREFICE, A.; TATICCHI, A. A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes. **Food chemistry**, 2019.

TATICCHI, A.; ESPOSTO, S.; URBANI, S.; VENEZIANI, G.; SELVAGGINI, R.; SORDINI, B.; SERVILI, M. Effect of an olive phenolic extract added to the oily phase of a tomato sauce, on the preservation of phenols and carotenoids during domestic cooking. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 572-578, 2017.

TOLEDO, W. **Fundamentals of Food Process Engineering**. 3rd edition. Springer. p. 584, 2007.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; SICARI, V.; URSINO, C.; MANFREDI, I., CONIDI, C.; FIGOLI, A.; CASSANO, A. Concentration of Bioactive Compounds from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Juice by Nanofiltration Membranes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 336-343, 2018.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 297, n. 1-2, p. 16-50, 2007.

VILAS BOAS, E.V. de B. Tecnologia de processamento mínimo de banana, mamão e kiwi. Seminário Internacional de Pós-colheita e Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Brasília, **Embrapa Hortaliças**, 2002, p. 1-7.

YINGNGAM, B.; SUPAKA, N.; RUNGSEEVIJITPRAPA, W. Optimization of process parameters for phenolics extraction of *Cratoxylum formosum* ssp. *formosum* leaves by response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p.129-140, 2015.

ZUIN, V. G.; MONTERO, L.; BAUER, C.; POPP, P. Stir bar sorptive extraction and highperformance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.1091, p.2–10, 2005.

## APÊNDICE A – Artigo científico

### PRODUÇÃO DE EXTRATO FENÓLICO DE ERVA-MATE POR PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Lára Franco dos Santos<sup>1</sup>; Vandrê Barbosa Brião<sup>1</sup>.

1. Programa de pós-graduação em Ciência e tecnologia de alimentos.

#### RESUMO

Extratos vegetais possuem em sua composição química compostos fenólicos, estes podem ser utilizados como antioxidantes naturais nos alimentos. Para sua aplicação, estes extratos precisam ser clarificados. Os processos de separação por membrana são indicados para este fim, estes processos utilizam temperaturas amenas, preservando os compostos de interesse. O objetivo deste estudo foi a clarificação do extrato de erva-mate e a preservação dos compostos fenólicos, e a estabilidade do extrato clarificado. Para isso, foram estudadas três membranas com tamanho de poros diferentes, e três pressões diferentes, a fim de verificar qual a melhor condição. Foram avaliadas os compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, turbidez e sólidos totais. Em relação a clarificação do extrato de erva-mate e preservação dos compostos fenólicos depois do processo, todas as membranas foram eficientes. A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) apresentou alta retenção de turbidez (99,9 %) e baixa de compostos fenólicos (18 %). O extrato clarificado apresenta estabilidade para os compostos bioativos ao longo dos 30 dias.

#### INTRODUÇÃO

O estudo com plantas vem ganhando destaque no campo científico por sua composição fenólica e capacidade como antioxidante natural (ELFALLEH et al., 2019), a exemplo disso a *Ilex paraguariensis*, conhecida como erva-mate é fonte de compostos bioativos como os compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas (RIACHI e MARIA, 2017). Estudos relacionam bebidas à base de erva-mate a efeitos estimulantes (SANTOS et al., 2015), diminuição do risco de doenças degenerativas e crônicas causadas pelo estresse oxidativo (BAEZA et al., 2016).

A erva-mate possui importância cultural e econômica para os países do sul da América Latina como produto agroindustrial, é geralmente consumida na forma de chimarrão, chá mate e tererê, há um grande interesse no desenvolvimento de produtos à base desta planta, uma alternativa para diversificar seu uso é a produção de extratos de erva-mate (JUNIOR e MORAND, 2016).

A extração é uma etapa fundamental para a produção de bebidas funcionais a base de extratos vegetais, tendo um impacto significativo no rendimento e na pureza dos compostos bioativos (BINDES et al., 2019<sup>a</sup>). O extrato aquoso de plantas contém uma matriz complexa com polissacarídeos e proteínas que são co-extraídos juntamente com os compostos fenólicos, levando a diminuir a pureza do extrato (BALYAN; VERMA; SARKAR, 2019). Nesse sentido o extrato precisa ser clarificado, a clarificação convencional envolve centrifugação e filtração, utilizando terra diatomácea e gerando resíduos (CASSANO, 2016).

Os processos de separação por membranas são considerados viáveis para clarificação, concentração e purificação de soluções aquosas por manter as características nutricionais e funcionais de extratos de plantas (GERKE et al., 2017). Isso ocorre porque utilizam temperaturas amenas e não envolvem uso de solventes químicos. As membranas de filtração são amplamente aplicadas para extratos vegetais e de frutas, para clarificação (GERKE et al., 2017; BINDES et al., 2019), concentração (TUNDIS et al., 2018; SEIFZADEH et al., 2019) e purificação (CONIDI et al., 2017; MADRONA et al., 2019; MONDAL et al., 2019).

Poucas pesquisas reportam a clarificação de extrato de erva-mate por processos de separação por membrana (GERKE et al., 2017), e nenhuma apresenta um estudo da estabilidade do extrato de erva-mate clarificado por membranas. Neste contexto, esta pesquisa visa avaliar se estes processos proporcionam a clarificação do extrato de erva-mate, assim como a conservação dos compostos fenólicos ao longo do tempo. O objetivo geral é desenvolver um processo por microfiltração e ultrafiltração para a clarificação e estabilização de um extrato aquoso da erva-mate.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Matéria-prima**

A erva-mate (folhas *in natura*) foi colhida na cidade Ilópolis – Rio Grande do Sul, em lotes de 5 kg e fornecidas gentilmente pela empresa Inovamate. As folhas são separadas dos caules para posterior pré-tratamento da folha *in natura*.

### **Obtenção do extrato aquoso das folhas da *Ilex paraguariensis***

As folhas foram branqueadas a 95° C por 30 segundos, em seguidas foram imersas em banho de gelo. Após o branqueamento, as folhas foram secas em estufa de circulação de ar

forçado a 50 ° C por 24 h e processadas em moinho de facas e classificadas em peneiras com mesh < 42 (<355 µm), embaladas a vácuo em embalagens de polietileno e armazenadas congeladas até o momento da obtenção dos extratos e realização das análises. Realizou-se uma infusão com as folhas trituradas da erva-mate na razão de 3% (folha:água) m/m. Foi realizado uma extração de 90° C por 10 minutos. O extrato foi filtrado a vácuo usando funil de Büchner com papel filtro qualitativo. Após o extrato bruto foi alimentado a membrana, para o processo de clarificação.

## Microfiltração e ultrafiltração

### Equipamento piloto de bancada de filtração tangencial

O estudo foi realizado em um equipamento piloto de bancada de filtração tangencial fornecido pela empresa WGM Sistemas (São Paulo – Brasil). Foram utilizadas três membranas com diferentes características de materiais e diâmetro de corte (Quadro 1).

Quadro 1 – Características das membranas utilizadas.

Membrana	Configuração	Diâmetro de corte	Material	Área de fluxo
Microfiltração	Tubular	0,1 µm	Polietersulfona	0,1 m <sup>2</sup>
Ultrafiltração 1	Tubular	30 kDa a 80 kDa	Policloreto de vinilideno	0,1 m <sup>2</sup>
Ultrafiltração 2	Tubular	4 kDa	Cerâmica (Óxido de Zircônia)	0,1 m <sup>2</sup>

Fonte: Autor, 2019.

O equipamento é composto por um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade e uma bomba pneumática para alimentação na carcaça da membrana. O extrato aquoso de erva-mate foi alimentado no tanque e impulsionado pela bomba através da membrana, separando o permeado e o retido. Ambas correntes foram recirculadas para o tanque de alimentação, mantendo o volume constante durante a operação, que durou uma hora. As filtrações foram realizadas a temperatura ambiente. Os parâmetros de filtração foram avaliados em diferentes pressões, 0,5 bar, 1 bar, 1,5 bar. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Ao final da filtração tangencial, foram coletadas amostras do permeado e retido, foram conduzidas para as análises, realizadas em triplicatas para averiguar a eficiência do processo e a influência das diferentes condições experimentais.

### **Retenção das membranas**

O coeficiente de retenção (R) representa a capacidade da membrana de reter moléculas, ele é dado em porcentagem. O coeficiente de retenção será calculado por meio da Equação 1:

$$R = \left( 1 - \frac{C \text{ permeado}}{C \text{ alimentação}} \right) \times 100 \quad (1)$$

sendo:

R: retenção (%);

C permeado: concentração do componente no permeado;

C retido: concentração do componente na alimentação.

### **Determinações analíticas**

Para caracterização do extrato aquoso de erva-mate e correntes da filtração foram realizadas análises de sólidos totais de acordo com metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008). Para análise de turbidez foi avaliada em turbidímetro (Tecnal, modelo TB 1000). As análises foram realizadas em triplicata.

### **Compostos Fenólicos totais**

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis, segundo a metodologia descrito por Correia *et al.* (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). A curva padrão utilizada foi de ácido gálico. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **Extrato de erva-mate clarificado**

### **Avaliação da estabilidade do extrato de erva-mate**

O extrato da melhor condição de experimento foi avaliado quanto a sua estabilidade a temperatura de refrigeração (4° C) e temperatura ambiente (26° C). Do tempo 0, e no decorrer



de 30 dias (1 vez por semana). Foram avaliados compostos fenólicos totais e turbidez, de acordo com metodologia já descritas neste artigo.

### **Análise dos dados**

A análise de variância (ANOVA) será utilizada para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre as médias serão determinadas pelo teste de Tukey.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Microfiltração e ultrafiltração**

A Tabela 1 apresenta a caracterização dos parâmetros físico-químicos para alimentação e permeados das membranas estudadas. Chandini et al., (2013) relataram que as bebidas como chás devem apresentar valores de turbidez inferiores a 50 NTU para serem consideradas comercializáveis e serem aceitas pelos consumidores. Todos os extratos clarificados se encontram abaixo deste valor citado. A turbidez dos extratos variaram de 0,22 a 36,16 NTU, os extratos clarificados pelas membranas e pressões estudadas diminuíram a turbidez de maneira favorável, em relação a turbidez, qualquer um dos extratos clarificados poderiam ser comercializados.

A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) foi a que apresentou os menores valores de turbidez variando de 1,2 a 0,22 NTU, o extrato bruto tinha uma turbidez elevada  $267,3 \pm 23,5$  e os extratos clarificados nesta membrana apresentaram uma turbidez próxima a zero. Gerke et al. (2017) clarificou extrato bruto de erva-mate com membranas, os autores obtiveram valores de turbidez do extrato clarificado próximo de zero, como encontrado no presente estudo.

A turbidez é um parâmetro imprescindível para a aceitabilidade de bebidas funcionais. Produtos à base de extratos de plantas podem causar problemas tecnológicos como precipitação dos sólidos suspensos, resultando um aspecto de turvo as bebidas, isso por que os compostos fenólicos se complexam com coloides presentes nestes extratos dando este aspecto a estas bebidas, a quantidade de sólidos está diretamente ligada a turbidez, como apresenta a tabela 1, à medida que diminui os sólidos totais das correntes da alimentação para o permeado, isso ocorre também com o parâmetro de turbidez.

Não houve diferença significativa para a concentração dos compostos fenólicos entre as correntes, para todas as membranas estudadas, as concentrações dos extratos clarificados variaram de  $129,08 \pm 9,0$  a  $85,12 \pm 29,2$  mgEAG/g de amostra seca. Como comentado

anteriormente, os compostos fenólicos podem ter atividade antioxidantes. O campo científico já vem estudando a adição de fenólicos como antioxidante natural em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Tabela 1 - Caracterização das alimentações e permeados dos experimentos

<b>Correntes das filtrações</b>	<b>Sólidos totais (g/L)</b>	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>Compostos fenólicos totais (mg/g)<sup>1</sup></b>
<b>Correntes da Microfiltração (0,1 µm)</b>			
<b>A</b>	15,1 <sup>b</sup> ±1,0	464,5 <sup>b</sup> ±9,5	141,6 <sup>a</sup> ± 7,2
<b>P 0,5</b>	10,7 <sup>a</sup> ±3,2	19,2 <sup>a</sup> ±14,0	91,4 <sup>a</sup> ± 23,4
<b>P 1</b>	10,8 <sup>a</sup> ±0,8	10,3 <sup>a</sup> ±1,2	101,6 <sup>a</sup> ± 17,6
<b>P 1,5</b>	10,1 <sup>a</sup> ±0,1	36,1 <sup>a</sup> ±12,1	90,8 <sup>a</sup> ± 2,6
<b>Correntes da Ultrafiltração (30 a 80 kDa)</b>			
<b>A</b>	14,0 <sup>b</sup> ±1,6	267,3 <sup>b</sup> ±23,5	158,5 <sup>a</sup> ± 2,6
<b>P 0,5</b>	9,8 <sup>a</sup> ±0,7	0,22 <sup>a</sup> ±0,0	129,0 <sup>a</sup> ± 9,0
<b>P 1</b>	9,8 <sup>a</sup> ±0,0	1,2 <sup>a</sup> ±0,9	99,7 <sup>a</sup> ± 18,8
<b>P 1,5</b>	12,1 <sup>ab</sup> ±0,8	0,5 <sup>a</sup> ±0,3	106,6 <sup>a</sup> ± 11,4
<b>Correntes da Ultrafiltração (4 kDa)</b>			
<b>A</b>	13,3 <sup>b</sup> ±1,1	364,7 <sup>b</sup> ±25,3	149,1 <sup>a</sup> ± 7,7
<b>P 0,5</b>	8,6 <sup>a</sup> ±2,4	9,2 <sup>a</sup> ±0,6	85,1 <sup>a</sup> ± 29,2
<b>P 1</b>	11,0 <sup>ab</sup> ±1,3	10,8 <sup>a</sup> ±2,1	86,0 <sup>a</sup> ± 14,8
<b>P 1,5</b>	9,0 <sup>a</sup> ±1,5	9,5 <sup>a</sup> ±1,1	90,3 <sup>a</sup> ± 9,0

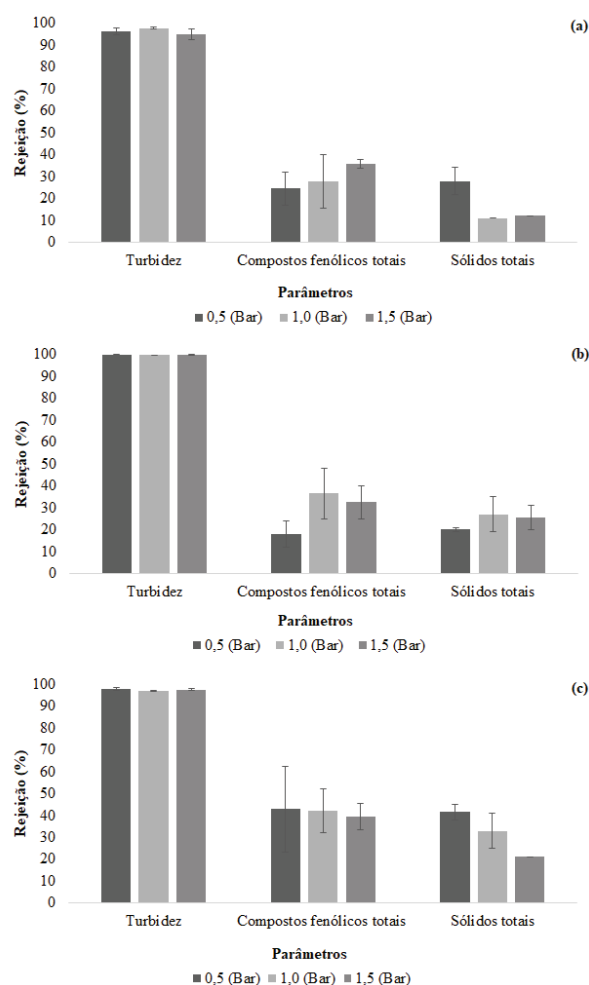
Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes para cada membrana na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05). <sup>1</sup>expresso em miligrama equivalente a ácido gálico por grama de amostra. A: alimentação; R: retido; P: permeado. 0,5; 1; 1,5 (pressões utilizadas em bar).

Fonte: Autor, 2019.

Faion et al. (2015) estudaram a influência da adição de diferentes concentrações de extrato de erva-mate em queijo prato. A atividade antioxidante dos extratos de erva-mate foram comprovadas. Durante a maturação, todas as formulações com adição de culturas adjuntas e extrato de erva-mate apresentaram menor oxidação lipídica. Os extratos foram efetivos sobre a oxidação protéica após 30 dias de armazenamento nos produtos das formulações com 0,1% e 0,2% de extrato. Sordini et al. (2019) recuperaram compostos fenólicos de uma estação de tratamento de óleos, o extrato recuperado rico em compostos fenólicos demonstrou ação como antioxidante natural, protegendo o  $\alpha$ -tocoferol contra a oxidação e dificultando a formação de compostos voláteis negativos. Como demonstrados em estudos de Faion et al. (2015) e Sordini et al. (2019), os compostos fenólicos possuem capacidade antioxidante.

A figura 1 apresenta as rejeições das membranas estudadas para os parâmetros de turbidez, atividade antioxidante e compostos fenólicos.

Figura 1 - Rejeição para as membranas de microfiltração (0,1  $\mu\text{m}$ ) (a); Ultrafiltração (30 a 80 kDa) (b); Ultrafiltração (4 kDa) (c).



<sup>1</sup>Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão em porcentagem (%).

As membranas apresentaram baixa rejeição dos compostos fenólicos e alta rejeição dos compostos que causam turbidez ao extrato. Para os compostos fenólicos, a membrana de microfiltração obteve uma rejeição de 27,8 e 35,7 %, a de ultrafiltração (4 kDa) uma rejeição de 39,35 e 42,85 %. A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) apresentou a menor rejeição para os compostos fenólicos em todas as pressões estudadas (18 e 30,5 %). A rejeição dos compostos fenólicos não é desejável em um processo de clarificação, afim de manter as propriedades nutricionais do extrato (BINDES et al. 2019). Gerke et al. (2017), os autores colocam que em um processo de clarificação é desejável obter um extrato sem turbidez enquanto retém, tanto quanto possível, o teor de nutrientes, isto é, o coeficiente de rejeição para a corrente do permeado deve ser próximo de zero.

Embora existam poucos estudos na literatura abordando o tratamento do extrato de erva-mate utilizando os processos de separação por membranas, a literatura aponta estudos

relevantes com extratos de plantas e sucos. A exemplo disso, Mereddy et al. (2017) clarificaram suco de beterraba e obteve valores satisfatórios, o processo de clarificação com membranas removeu 99% de turbidez do suco, ainda obteve uma rejeição de 95% dos sais e nitrato.

Souza et al. (2016) purificaram os compostos fenólicos do chá verde através da ultrafiltração, as reduções na turbidez foram superiores a 90% em todas as membranas. No entanto, em relação rejeição para os compostos fenólicos as membranas de 10 e 5 kDa retiveram quase a totalidade dos polifenóis da corrente da alimentação, enquanto a retenção das membranas de 20 e 30 kDa foi inferior a 70 %. Os autores atribuem esta alta retenção dos compostos fenólicos a dois fatores, por fenômenos de incrustação e/ou interações dos compostos fenólicos com as proteínas presentes no chá verde.

Em relação aos compostos que causam turbidez ao extrato, os mesmos tiveram uma rejeição acima de 95% para todas as membranas e pressões no presente estudo. A membrana de ultrafiltração (30 a 80 kDa) obteve uma rejeição de 99,9%. Estes valores também foram encontrados para Gerke et al. (2017), os autores clarificaram extrato de erva-mate em diferentes membranas, e obtiveram uma retenção de turbidez em 100%, permitindo uma clarificação eficiente, reduzindo a turbidez inicial para próximo de zero.

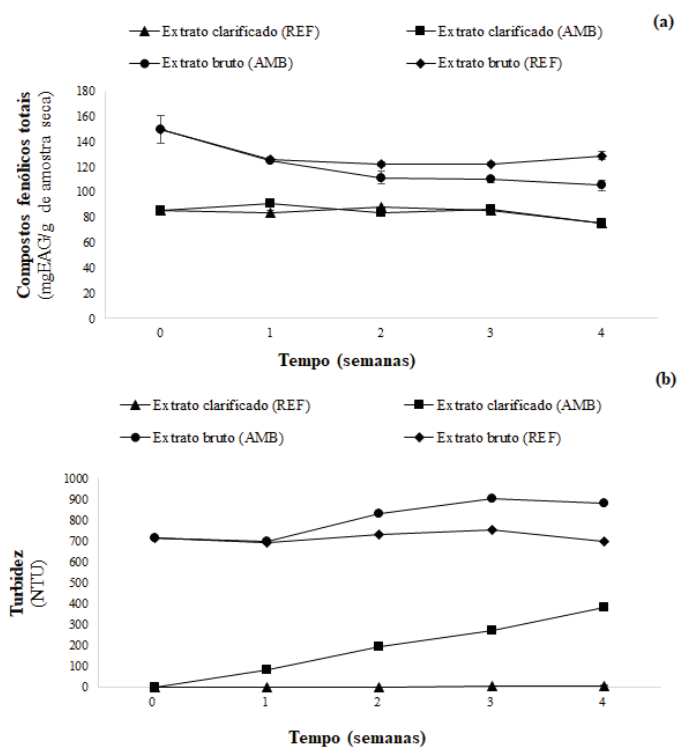
Estes estudos corroboram que os processos de separação por membranas podem ser alternativos aos processos convencionais, clarificando extratos de plantas e preservando os compostos de interesse.

### **Estabilidade do extrato de erva-mate clarificado**

Foi avaliada o efeito do armazenamento para duas temperaturas (ambiente e refrigeração) por 30 dias do extrato de erva-mate clarificado (figura 2), de modo a produzir um produto estabilizado mantendo suas qualidades, o extrato clarificado foi armazenado sem qualquer aditivo ou conservante.

Como apresentado anteriormente, as membranas de filtração foram eficientes na clarificação do extrato bruto de erva-mate, assim como na conservação dos compostos fenólicos. É importante salientar que este extrato clarificado pode ser utilizado como produto, sendo adicionado em bebidas, outra finalidade é como antioxidante natural. O armazenamento do extrato é uma etapa de suma importância, já que estes compostos independe da sua finalidade precisam manter sua estabilidade.

Figura 2 - Compostos fenólicos totais (a) e turbidez (b) da vida de prateleira dos extratos de erva-mate clarificados.



Fonte: Autor, 2019.

O extrato armazenado em temperatura de refrigeração, não apresentou aumento em relação a turbidez, estando na faixa de 0,22 e 8,5 NTU, como já citado anteriormente, Chandini et al., (2013) afirmam que as bebidas como chás devem apresentar valores de turbidez inferiores a 50 NTU, para serem comercializadas. No entanto, para armazenamento em temperatura ambiente, o extrato apresentou um aumento de turbidez de 0,24 para 385 NTU. Assim este extrato não poderia ser aplicado em bebidas devido este aumento de turbidez, já que os consumidores preferem produtos translúcidos para este fim, esta turbidez elevada pode ser decorrente do crescimento de microrganismos.

A quantidade de compostos fenólicos extraídos industrialmente chegou a 16.380 toneladas em 2015 e estima-se que até 2024 tenha um aumento para 33.880 toneladas. Grande parte destes compostos é destinada a indústria de bebidas, destacando o crescimento da demanda por bebidas funcionais (44%), assim como em outros alimentos (33%) (ADEBOOYE, ALASHI e ALUKO, 2018). Os compostos fenólicos foram preservados durante os 30 dias de para as duas temperaturas armazenamento, demonstrado na figura 10.

Sousa et al. (2016) avaliaram a estabilidade do chá verde clarificado em diferentes membranas, e observaram uma queda de 9 a 60% na concentração de polifenóis na primeira semana de armazenamento a 5° C, no decorrer das semanas, os permeados mantiveram-se estáveis por 30 dias. Bindes et al., (2019) observaram a estabilidade do chá verde clarificado por membrana de microfiltração, o permeado microfiltrado durante 30 dias de refrigeração, obteve.

Os extratos brutos armazenados a temperatura ambiente e refrigeração tiveram uma queda na concentração dos compostos fenólicos, isso pode ser explicado por que estes extratos não foram submetidos ao processo de clarificação, macromoléculas como proteínas e polissacarídeos ficaram suspensas no meio, dando o aspecto de turvo, assim como observamos o aumento da turbidez na figura 4 (gráfico b) para os extratos brutos. Como já mencionado anteriormente, os compostos fenólicos se complexam com estas macromoléculas, formando particulados maiores, que além do aspecto de turvo diminuem a concentração dos compostos fenólicos (MONSANTO et al., 2014).

## **CONCLUSÃO**

O extrato bruto de erva-mate foi clarificado por três membranas, os valores de turbidez para os extratos clarificados variaram de 0,22 e 36,16 NTU, as membranas foram eficientes na preservação dos compostos fenólicos, não houve diferença significativa entre as correntes de alimentação e permeado, com isso todos os extratos clarificado pelas membranas possuem potencial de uso. A membrana que apresentou melhor eficiência foi a de ultrafiltração 1 (30 a 80 kDa) a 0,5 bar, obteve uma retenção dos compostos fenólicos (18%), turbidez (99,9%), esta membrana foi a utilizada para dar continuidade para a próxima etapa do trabalho.

Os extratos clarificados apresentam estabilidade para os compostos fenólicos ao longo de 30 dias armazenados em temperatura de refrigeração (4° C) e ambiente (26° C). Os compostos fenólicos são instáveis em condições adversas, no entanto, foi comprovado que as membranas de filtração estabilizam este extrato, podendo o mesmo ter diversas aplicações

## REFERENCIAS

ADEBOOYE, Odunayo C.; ALASHI, Adeola M.; ALUKO, Rotimi E. A brief review on emerging trends in global polyphenol research. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. e12519, 2018.

BRIÃO, V.B. e TAVARES, C.R.G. Ultrafiltração de água de enxágue modelo da indústria de laticínios para a recuperação de nutrientes: efeito da pressão e da velocidade tangencial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 4, p. 352-362. 2012.

BINDES, Marlon Menezes Maciel et al. Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. **Journal of Food Engineering**, v. 241, p. 97-104, 2019.

CASSANO, A.; DONATO, L.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of kiwifruit juice: operating parameters, juice quality and membrane fouling. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 2, p. 613-621, 2007.

CASSANO, Alfredo; CONIDI, Carmela; RUBY-FIGUEROA, René. Recovery of flavonoids from orange press liquor by an integrated membrane process. **Membranes**, v. 4, n. 3, p. 509-524, 2014.

CHANDINI, S. K.; RAO, L. J.; SUBRAMANIAN, R. Membrane Clarification of Black Tea Extracts. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 8, p. 1926–1943, 2013.

CONIDI, Carmela et al. Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. **Journal of Food Engineering**, v. 195, p. 1-13, 2017.

CORREIA, R. T.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M.; MACÊDO, G.; SHETTY, K., Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple was temixed with soy flour using *Rhizopus Oligosporus*. **Process. Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2004.

ELFALLEH, Walid; KIRKAN, Bulent; SARIKURKCU, Cengiz. Antioxidant potential and phenolic composition of extracts from *Stachys tmolea*: An endemic plant from Turkey. **Industrial Crops and Products**, v. 127, p. 212-216, 2019.

FAION, Andréia M. et al. Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of Prato cheese. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 3, p. 1516-1524, 2015.

FAVARETTO, Adriana. **Aspectos alelopáticos, fitoquímicos e anatômicos do capim-annoni-2**. 2014. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

FARZANEH, V. CARVALHO, I. S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. **Industrial Crops and Products**. v. 65, p. 247-258, 2015.

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, Pages 204-212, 2017.

GIROUX, Hélène J. et al. Production and characterization of Cheddar-type cheese enriched with green tea extract. **Dairy Science & Technology**, v. 93, n. 3, p. 241-254, 2013.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. DE. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HECK, C. I.; SCHMALKO, M.; MEJIA, E. G. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8394–8403, 2008.

IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020

MEREDDY, Ram et al. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. **Food chemistry**, v. 215, p. 311-317, 2017.

RAO, L.; HAYAT, K.; LV, Y.; KARANGWA, E.; XIA, S.; JIA, C.; ZHONG, F.; ZHANG, X. Effect of Ultrafiltration and Fining Adsorbents on The Clarification Of Green Tea. **Journal of Food Engineering**, v. 102, p. 321-326, 2011.

RAZI, Behnaz; AROUJALIAN, Abdolreza; FATHIZADEH, Mahdi. Modeling of fouling layer deposition in cross-flow microfiltration during tomato juice clarification. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 841-848, 2012.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

RIACHI, Liza Ghassan; DE MARIA, Carlos Alberto Bastos. Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 308-320, 2017.

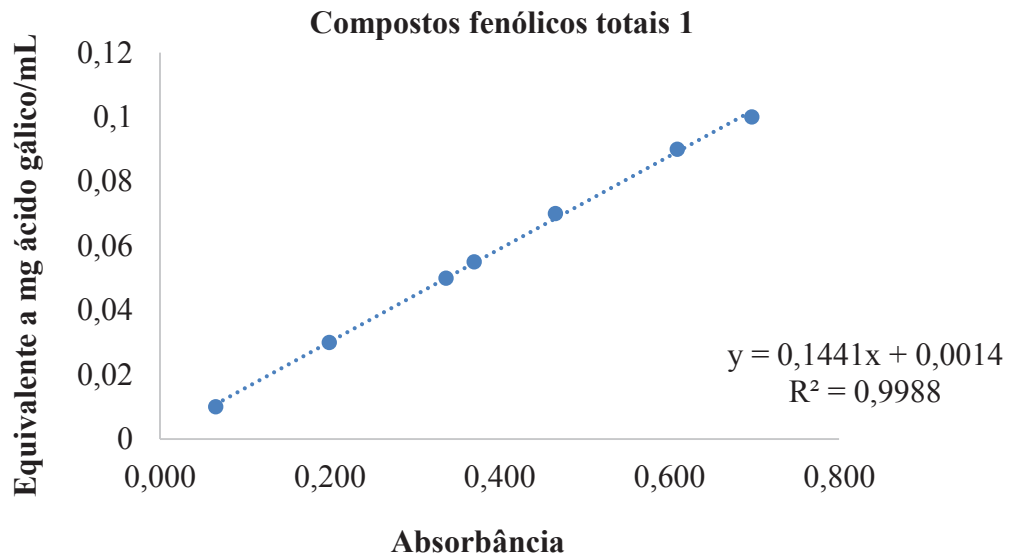


- SEGUENKA, Bruna et al. Clarificação de vinho tinto pelo processo de separação por membranas. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 14537-14545, 2015.
- SORDINI, B. et al. A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes. **Food chemistry**, 2019.
- SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 01, p. 25 - 30, Jan./Mar., 2012.
- SOUZA, L. S. et al. Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. **Separation and Purification Technology**, v. 168, p. 188-198, 2016.
- TATICCHI, Agnese et al. Effect of an olive phenolic extract added to the oily phase of a tomato sauce, on the preservation of phenols and carotenoids during domestic cooking. **LWT-Food Science and Technology**, v. 84, p. 572-578, 2017.
- TUNDIS, Rosa et al. Concentration of Bioactive Compounds from Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Juice by Nanofiltration Membranes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 336-343, 2018.
- ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; GRANATO, D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.



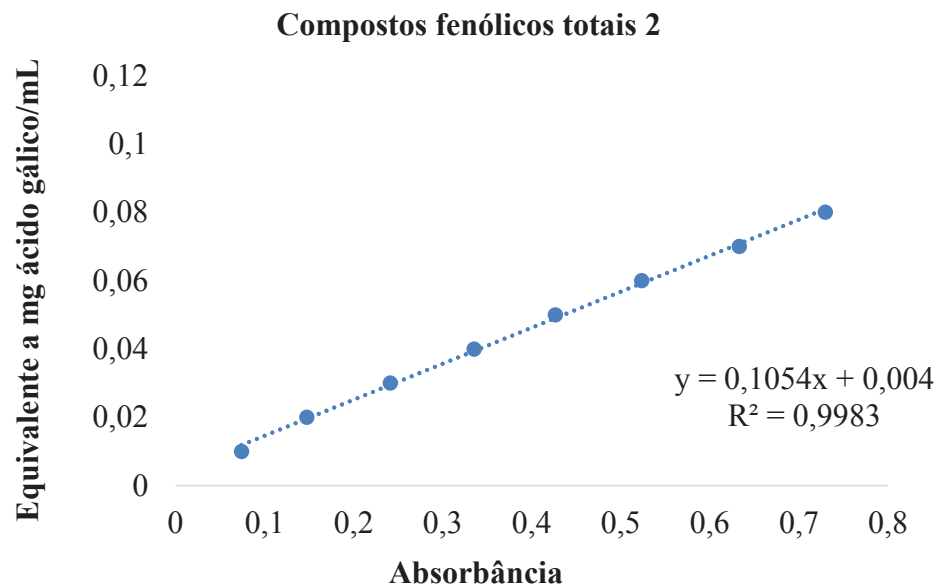
## APÊNDICE B – Curva analítica compostos fenólicos totais

Figura 11 - Curva analítica compostos fenólicos (1)



## APENDICE C - Curva analítica compostos fenólicos totais

Figura 12 - Curva analítica compostos fenólicos (2)





## APENDICE D – CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS PARA AS MEMBRANAS ESTUDADAS

Tabela 6 - Caracterização das alimentações e permeados dos experimentos

Correntes das filtrações	pH	Sólidos solúveis (°Brix)	Sólidos Totais (g/L)	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	Turbidez (NTU)	Compostos fenólicos totais (m/g) <sup>1</sup>	POD (UAEmin <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	POF (UAEmin <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>
<b>Correntes da microfiltração (0,1 <math>\mu\text{m}</math>)</b>								
A	5,7 <sup>a</sup> ±0,03	1,85 <sup>ab</sup> ±0,2	15,15 <sup>b</sup> ±1,0	1647 <sup>c</sup> ±44,5	464,5 <sup>b</sup> ±9,5	141,61 <sup>a</sup> ± 7,2	0,38 <sup>a</sup> ±0,2	0,04 <sup>a</sup> ±0,01
P 0,5	5,82 <sup>a</sup> ±0,05	1,68 <sup>ab</sup> ±0,03	10,79 <sup>a</sup> ±3,2	1447 <sup>b</sup> ±6,5	19,25 <sup>a</sup> ±14,0	91,40 <sup>a</sup> ± 23,4	0,06 <sup>a</sup> ±0,04	0,01 <sup>a</sup> ±0,0
P 1	5,87 <sup>a</sup> ±0,1	1,33 <sup>ab</sup> ±0,03	10,88 <sup>a</sup> ±0,8	1296 <sup>a</sup> ±5,67	10,3 <sup>a</sup> ±1,2	101,66 <sup>a</sup> ± 17,6	0,05 <sup>a</sup> ±0,04	0,01 <sup>a</sup> ±0,02
P 1,5	5,95 <sup>a</sup> ±0,18	1,16 <sup>a</sup> ±0,13	10,15 <sup>a</sup> ±0,1	1334 <sup>a</sup> ±11,0	36,16 <sup>a</sup> ±12,17	90,85 <sup>a</sup> ± 2,6	0,09 <sup>a</sup> ±0,01	0,01 <sup>a</sup> ±0
<b>Correntes da ultrafiltração (30 a 80 kDa)</b>								
A	5,7 <sup>a</sup> ±0,09	1,85 <sup>d</sup> ±0,03	14,0 <sup>ab</sup> ±1,6	1649,9 <sup>d</sup> ±15,75	267,3 <sup>b</sup> ±23,5	158,56 <sup>a</sup> ± 2,6	0,25 <sup>a</sup> ±0,2	0,02 <sup>a</sup> ±0,004
P 0,5	5,85 <sup>a</sup> ±0,0	1,4 <sup>abc</sup> ±0,0	9,8 <sup>a</sup> ±0,7	1448 <sup>b</sup> ±11,7	0,22 <sup>a</sup> ±0,0	129,08 <sup>a</sup> ± 9,0	0,02 <sup>a</sup> ±0,0	0,01 <sup>a</sup> ±0,0
P 1	5,8 <sup>a</sup> ±0,2	1,35 <sup>ab</sup> ±0,1	9,8 <sup>a</sup> ±0,0	1358 <sup>a</sup> ±14,3	1,2 <sup>a</sup> ±0,9	99,79 <sup>a</sup> ± 18,8	0,01 <sup>a</sup> ±0,01	0,04 <sup>a</sup> ±0,0
P 1,5	6,03 <sup>a</sup> ±0,07	1,2 <sup>a</sup> ±0,0	12,12 <sup>ab</sup> ±0,8	1423 <sup>ab</sup> ±11,33	0,57 <sup>a</sup> ±0,35	106,66 <sup>a</sup> ± 11,4	0,07 <sup>a</sup> ±0,03	0,01 <sup>a</sup> ±0,0
<b>Correntes da ultrafiltração (4 kDa)</b>								
A	5,89 <sup>a</sup> ±0,1	1,54 <sup>a</sup> ±0,1	13,37 <sup>a</sup> ±1,1	1591,16±12,3	364,75 <sup>b</sup> ±25,3	149,15 <sup>a</sup> ± 7,7	0,78 <sup>a</sup> ±0,2	0,042 <sup>a</sup> ±0,01
P 0,5	5,93 <sup>a</sup> ±0,1	1,12 <sup>a</sup> ±0,22	8,66 <sup>a</sup> ±2,4	1247 <sup>a</sup> ±7,5	9,28 <sup>a</sup> ±0,62	85,12 <sup>a</sup> ± 29,2	0,08 <sup>a</sup> ±0,03	0,007 <sup>a</sup> ±0,0
P 1	6,12 <sup>a</sup> ±0,05	1,05 <sup>a</sup> ±0,15	11,07 <sup>a</sup> ±1,3	1261 <sup>a</sup> ±36,33	10,85 <sup>a</sup> ±2,15	86,05 <sup>a</sup> ± 14,8	0,05 <sup>a</sup> ±0,04	0,006 <sup>a</sup> ±0,001
P 1,5	6,11 <sup>a</sup> ±0,39	1,1 <sup>a</sup> ±0,0	9,0 <sup>a</sup> ±1,5	1257 <sup>a</sup> ±3,17	9,5 <sup>a</sup> ±1,1	90,39 <sup>a</sup> ± 9,03	0,12 <sup>a</sup> ±0,02	0,005 <sup>a</sup> ±0,001

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>expresso em miligrama equivalente a ácido gálico por grama de amostra. <sup>3</sup>POD: Peroxidase. <sup>4</sup>POF: Polifenoxidase. A: alimentação; P:permeado. 0,5; 1; 1,5 (pressões utilizadas em bar).

Fonte: Autor 2019.



## **ANEXO A – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS**

A quantificação dos compostos fenólicos totais será determinada por espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis, segundo a metodologia descrito por Correia *et al.* (2004), com modificações propostas por Sousa e Correia (2012). Volume de 1 mL do extrato de erva-mate, apropriadamente diluído (em 50 mL de água destilada para corrente do permeado e 100 mL para corrente da alimentação), será adicionado de 1 mL de etanol a 95%, 5 ml de água destilada e 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu, após agitar por 10 segundos e adicionar 1 mL de carbonato de sódio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. Os tubos serão colocados ao abrigo da luz por 60 minutos a temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 765 nm, água destilada foi utilizada como branco e para calibrar o equipamento.

## **ANEXO B - ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE (POD)**

A atividade POD foi determinada por um método colorimétrico descrita por FUJITA *et al.* (1995), com modificações. A mistura de reação continha 0,5 mL de uma solução aquosa 0,1 M de guaiacol, 0,8 mL de tampão de fosfato 0,1 M, pH 6,0, 0,2 mL de peróxido de hidrogénio 0,1% e 0,2 mL da solução enzimática. O preparo do extrato enzimático é na relação de 1:1 de extrato bruto para solução tampão fosfato de sódio pH 6. Após a incubação durante 2 min a 30 ° C, o aumento da absorbância a 470 nm foi medida. Uma unidade de atividade de POD foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto/g de amostra.

## **ANEXO C - ATIVIDADE DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE (PFO)**

A atividade de PFO foi determinada pelo método descrito por FUJITA *et al.* (1995). A mistura de 0,5mL do extrato enzimático (o preparo do extrato enzimático é na relação de 1:1 de extrato bruto para solução tampão fosfato de sódio 100mM pH 5), 0,8mL de solução tampão fosfato de sódio 100mM pH 5,0 e 0,05mL de solução de catecol 0,01M foi incubada a 30°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,8mL de ácido perclórico 2N e a absorbância foi medida a 420nm. Uma unidade de atividade de PFO foi definida como o aumento de uma unidade de absorbância por minuto/g de amostra.

## ANEXO D – IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Flexar Perkin Elmer, contendo bomba binária com gerenciamento de solventes e desgaseificador, com injetor automático Auto sampler Flexar LC (volume de injeção foi de 20  $\mu$ L), e 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 $\mu$ m). 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. As injeções foram feitas de modo gradiente. O método foi adaptado de Favaretto (2014). Foram pesquisadas as substâncias químicas de referência (SQR) 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/mL.

As amostras para análise por CLAE foram filtradas com papel filtro e em membranas de porosidade 0,45 $\mu$ m (Millipore) antes de serem injetadas no sistema. Para análise, a concentração utilizada das amostras foi de 3 % (3g / 100 ml).