

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

AUREANNA NAIRNE NEGRÃO MURAKAMI

**CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE
EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex
paraguariensis* A. St. Hil.)**

Florianópolis

2010

AUREANNA NAIRNE NEGRÃO MURAKAMI

CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATO
AQUOSO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.
Hil.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora. Prof^ª. Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Co-orientador. Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

M972c Murakami, Aureanna Nairne Negrão
Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de
folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)
[dissertação] / Aureanna Nairne Negrão Murakami ;
orientadora, Renata Dias Mello Castanho Amboni. -
Florianópolis, SC, 2010.

130 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Erva-mate. 3. Fenóis.
4. Atividade antioxidante. 5. Otimização. 6. Concentração.
7. Nanofiltração. I. Amboni, Renata Dias de Mello Castanho.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663/664

AUREANNA NAIRNE NEGRÃO MURAKAMI

CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE EXTRATO
AQUOSO DE FOLHAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.
Hil.)

Dissertação julgada adequada para obtenção do Título de **Mestre em Ciência dos Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Prof^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.
Coordenadora do Curso

Florianópolis, 14 de Maio de 2010.

Banca Examinadora:

Orientadora: _____
Prof^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.

Co-orientador: _____
Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Membro: _____
Prof. José Carlos Cunha Petrus, Dr.

Membro: _____
Prof^ª. Edna Regina Amante, Dra.

Membro: _____
Prof^ª. Elane Schwinden Prudêncio, Dra.

Dedicatória

Aos meus queridos pais e irmãos pelo amor e segurança que me transmitem, sempre acreditando em minha capacidade. Ao meu amado marido Fabio, pelo seu amor, apoio e por fazer a distância e a saudade valerem a pena.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para a realização deste trabalho,

À professora Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, minha orientadora, pela oportunidade concedida, orientação exemplar, amizade, confiança e pelos ensinamentos que levarei para a minha vida;

À professora Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pela valiosa colaboração, ensinamentos, companhia, amizade, carinho e por ser sempre tão prestativa;

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, meu co-orientador, pelas brilhantes idéias, confiança e imensa disposição em nos ajudar e principalmente nos ensinar;

À professora Dra. Edna Regina Amante, pelos ensinamentos, confiança e carinho demonstrado ao longo de nosso convívio;

Aos ervateiros Jozeane Caldart e Anselmo Zanelatto, pela confiança e disponibilização das amostras essenciais para realização desse trabalho. Ao Seu Dionísio, pessoa tão prestativa que me ajudou na coleta das minhas amostras;

Ao Professor Dr. José Carlos C. Petrus por disponibilizar seu laboratório e equipamentos indispensáveis para a materialização dessa pesquisa;

Ao professor Dr. Reinaldo F. Teófilo, da Universidade Federal de Viçosa, por contribuir para o delineamento experimental.

À minha insubstituível estagiária, Laura M. Zanotta. Pessoa essencial para a realização desse trabalho. Muito obrigada por tudo. Essa conquista também é sua;

À “família” do Laboratório de Leites e Derivados, minhas amigas Carlise Beddin Fritzen-Freire, Ana Cristina Tanello, Ana Paula A. Prudêncio, pelo apoio, amizade e companheirismo constante. Com certeza levarei essas amizades para vida inteira;

Aos queridos estagiários sempre disponíveis, Izabella Munoz, André Amorim, Juliana Mainardi e Débora Rosa;

Ao Laboratório de Frutas e Hortaliças. Aos presentes João Gustavo Provesi, Ângela A. Rovaris e Gilson Nabechima e aos que já seguiram seu

Agradecimentos

caminho, Manoela A. Vieira, Karina Tramonte, Rossana Podestá, Iolanda Albuquerque e Diego J. Kutz. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e amizade. Em especial minha querida amiga Cristiane M. Pagliosa, pela amizade que levarei eternamente;

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação com Membranas, Sílvia, Kátia, Janafina, Léo e Claudimir. Muito obrigada por disponibilizarem seus tempos para me ajudar. Vocês foram indispensáveis;

Aos meus amigos do laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos; pelo apoio e parceria;

Aos eternos amigos Larissa S. Bernardi, Paulo R. Oliveira, Luísa Cazarolli, Rafael Nicolay, Suellen Cristina, Bruno Valente, Vivian B. A. Rosa e Luís H. Rosa;

À minha pequena cachorrinha Lana, que sempre me recebeu com muita alegria, independente do meu humor. Obrigada por seu amor incondicional;

À Bruna Mattioni e Fernanda Borges, por contribuírem para as análises de fibras alimentares;

Ao projeto FINEP/SEBRAE (projeto Ervanova), pelo apoio financeiro para a concretização desta pesquisa;

Aos professores das disciplinas, muito obrigada pelos ensinamentos;

Ao programa de pós-graduação, pela oportunidade e incentivo à pesquisa;

Ao Sérgio Souza, pelo apoio burocrático;

Ao Seu Bento e Seu Carlos, pela disponibilidade e simpatia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no auxílio bolsa.

MURAKAMI, Aureanna Nairne Negrão. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma planta muito consumida na América do sul, principalmente nos estados sulinos do Brasil. No extrato aquoso de suas folhas é encontrada uma variedade de compostos químicos, entre eles os compostos fenólicos que são responsáveis por diversas atividades biológicas conhecidas dessa planta, principalmente a atividade antioxidante. Uma forma de ampliar o seu uso nas indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas é a concentração, que diminui o custo de estocagem e de transporte. O processo de separação por membranas vem sendo muito utilizado para este fim, sendo capaz de manter a qualidade do produto, não envolvendo o uso de altas temperaturas. Assim, este trabalho teve como principal objetivo estudar o comportamento do extrato aquoso de folhas de erva-mate durante a concentração pelo processo de Nanofiltração (NF), avaliando o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Inicialmente foi realizada a caracterização química das folhas, que apresentaram grande quantidade de fibras insolúveis e de minerais, destacando-se o Ca e o K. A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi aplicada para determinar as condições ótimas para a extração aquosa de compostos fenólicos das folhas. As variáveis independentes envolvidas na otimização foram pH (2,3 – 5,7), temperatura de extração (61,5 – 103,5 °C) e tempo de extração (0,6 – 12,4 min). As variáveis que apresentaram influências significativas ($p < 0,05$) na extração de compostos fenólicos foram o pH e a temperatura. Para maximizar a extração de compostos fenólicos, um extrato aquoso foi obtido a 100 °C, por 3 minutos, a pH 6,0. Esse extrato das folhas de erva-mate foi submetido à membrana de NF para concentração dos compostos fenólicos. A concentração desses compostos aumentou com o incremento do Fator de Redução Volumétrica (FRV), alcançando a maior porcentagem de retenção (R) de 99,51 % no FRV 4,0. Neste FRV de melhor desempenho, foram avaliados os respectivos permeados e concentrados em relação à atividade antioxidante, pelo valor de EC50, e ao perfil de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi constatado que a atividade antioxidante das

Resumo

amostras seguiu a seguinte ordem: concentrado > extrato aquoso inicial > permeado. Os compostos fenólicos ácido gálico e ácido 4,5-dicafeoilquínico obtiveram uma *R* de 95 e 100 %, respectivamente, enquanto que a *R* alcançada pelo ácido 3,4-dihidroxibenzóico e o ácido clorogênico foi de 99 e 98 %, respectivamente. Desta forma, o processo de NF mostrou ser eficiente na concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso das folhas de erva-mate.

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., compostos fenólicos, atividade antioxidante, otimização, concentração, nanofiltração.

MURAKAMI, Aureanna Nairne Negrão. **Concentration of phenolic compounds from aqueous extract of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) leaves.** Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

ABSTRACT

Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) is a plant very consumed in South America, mainly in the southern states of Brazil. In the aqueous extract of the leaves are found a variety of chemical compounds, including phenolic compounds, which are responsible for several known biological activities of this plant, especially the antioxidant activity. One way to expand its use in food, chemical and pharmaceutical industries is the concentration, which decreases the storage and transport cost. The membrane separation process has been widely used for this purpose, it being able to maintain product quality, not involving high temperatures. This work aimed to study the behavior of the aqueous extract of erva-mate leaves concentration during the process of Nanofiltration (NF), evaluating the content of phenolic compounds and antioxidant activity. Initially, the chemical characterization of the leaves, which showed a large amount of insoluble fiber and minerals, especially Ca and K. The Response Surface Methodology (RSM) was applied to determine the optimum conditions for aqueous extraction of phenolic compounds from leaves. The variables involved in the optimization were pH (2.3 – 5.7), extraction temperature (61.5 to 103.5 °C) and extraction time (0.6 – 12.4 min). The variables that showed significant influences ($p < 0.05$) in the extraction of phenolic compounds were pH and temperature. To maximize the extraction of phenolic compounds, an aqueous extract was obtained at a temperature of 100 °C for 3 minutes and pH 6.0. This extract was submitted to the NF membrane for the concentration of phenolic compounds from erva-mate. The concentration of these compounds intensify with the increase of the Volume Reduction Factor (VRF), reaching the highest retention percentage (R) of 99.51 % in the VRF 4.0. In this VRF with the better performance, the permeate and the concentrate were evaluated for antioxidant activity by the EC50 value and for the profile of phenolic compounds by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). It was found that the antioxidant activity followed the order: concentrate > initial aqueous extract > permeate. The compounds gallic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid obtained a R of 95 and 100 %, respectively, while the R achieved by 3,4-dihydroxybenzoic acid and chlorogenic acid was 99 and 98 %.

Abstract

respectively. Thus, the NF process was effective in concentration of phenolic compounds from aqueous extract of erva-mate leaves.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., phenolic compounds, antioxidant activity, optimization, concentration, nanofiltration.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	11
Figura 2 Área de ocorrência natural de erva-mate	12
Figura 3 Estrutura básica de um fenol.	16
Figura 4 Mecanismo de reação da oxidação lipídica.	19
Figura 5 Esquema básico da permeação seletiva de moléculas.	26
Figura 6 Esquema da filtração convencional (a) e da filtração tangencial (b).	27
Figura 7 Classificação das membranas quanto a sua seletividade.	30
Figura 8 Esquema de um processo de separação com membrana.	31

CAPÍTULO 2

Figura 1 Sistema de cultivo adensado em área de sub-bosque de floresta de araucárias, Catanduvas – SC, agosto de 2008.	59
Figura 2 Gráfico de probabilidade das interações e dos principais efeitos obtidos pelo delineamento composto central.	70
Figura 3 (A) Gráfico do teor de compostos fenólicos totais predito <i>versus</i> observado dos extratos das folhas de erva-mate. (B) Gráfico dos resíduos <i>versus</i> o teor de compostos fenólicos totais observado nos extratos.	72
Figura 4 Gráfico de contorno para os teores de compostos fenólicos totais do extrato aquoso das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. em função do pH e da temperatura de extração (°C).	73

CAPÍTULO 3

Figura 1 Esquema simplificado da unidade piloto de nanofiltração utilizada nos experimentos.	91
Figura 2 Comportamento do fluxo de permeado (J) durante o processo de NF do extrato aquoso de folhas de erva-mate.	97

LSTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 Estrutura e massa molar dos principais compostos
fenólicos presentes nas folhas de erva-mate. 17

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Níveis codificados das variáveis independentes empregados na extração dos fenólicos totais utilizando o Delineamento Composto Central (CCD). 62

Tabela 2 Composição química da folha da *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (base seca). 66

Tabela 3 Resultados do teor de compostos fenólicos totais do extrato aquoso de folhas de erva-mate baseados no pH, temperatura e tempo de extração. 68

Tabela 4 Coeficientes de regressão, erro padrão e valores de p para o modelo de extração aquosa dos compostos fenólicos totais das folhas de erva-mate. 69

Tabela 5 Análise de variância dos teores de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de erva-mate. 72

CAPÍTULO 3

Tabela 1 Resultados do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) (media \pm desvio padrão) do extrato aquoso inicial, do concentrado e do permeado obtidos pelo processo de nanofiltração do extrato aquoso das folhas de erva-mate. 99

Tabela 2 Compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) e valor de EC50 (mL/g de DPPH) do extrato de erva-mate inicial, do concentrado e do permeado correspondentes ao FRV 4,0. 101

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
<i>A_p</i>	Área de permeação da membrana
<i>C_c</i>	Concentração dos compostos fenólicos totais no concentrado
CCD	Delineamento Composto Central
CFT	Compostos Fenólicos Totais
<i>C_p</i>	Concentração dos compostos fenólicos totais no permeado
Da	Dalton (g/mol)
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazila (Radical estável)
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
EC50	Concentração eficiente para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH
FRV	Fator de Redução Volumétrica
h	Hora
HPLC/CLAE	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
<i>J</i>	Fluxo de permeado
LDL	Lipoproteína de baixa-densidade
MF	Microfiltração
Min	Minuto
MLR	Regressão Linear Múltipla
MM	Massa molar
MWCO	Massa molar de corte (<i>Molecular Weight Cut-off</i>)
NF	Nanofiltração (<i>nanofiltration</i>)
OR	Osmose Reversa
PSM	Processos de Separação com Membranas
<i>R</i>	Porcentagem de retenção (<i>Retention percentage</i>)
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta (<i>Response Surface Methodology</i>)
SPE	Extração em fase sólida

Lista de Abreviaturas

T	Temperatura
t	Tempo
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
V_p	Volume do permeado
VRF	<i>Volume Reduction Factor</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1 ERVA-MATE	9
1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ASPECTOS ECONÔMICOS DA ERVA-MATE	11
1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE	11
1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE	19
1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA ERVA-MATE	22
1.6 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS	25
1.6.1 Processo de filtração	25
1.6.2 Nanofiltração	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 2	
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO AQUOSA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	53
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 MATERIAL	58
2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	59
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS	60
2.4 PREPARO DOS EXTRATOS	61
2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	61

2.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	62
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS	64
3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	67
4 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CAPÍTULO 3	
CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DA ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) POR NANOFILTRAÇÃO	83
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1 MATERIAL	88
2.2 PREPARO DAS FOLHAS	88
2.3 PREPARO DO EXTRATO	89
2.4 NANOFILTRAÇÃO (NF)	90
2.5 ANÁLISE QUÍMICA	93
2.5.1 Determinação de compostos fenólicos totais	93
2.5.2 Determinação da atividade antioxidante	93
2.5.3 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	94
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 NANOFILTRAÇÃO (NF)	96
4 CONCLUSÃO.	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
APÊNDICES	113

APENDICE A Unidade de membrana utilizado no processo de concentração	114
APÊNDICE B Perfil cromatográfico do extrato aquoso inicial (A) (diluição de 1:10 v/v), do concentrado (B) (diluição de 1:100 v/v) e do permeado (C) (diluição de 1:2 v/v)	116
ANEXOS	119
ANEXO A Resultados preliminares do Capítulo 2 apresentados na forma de resumo no 8º <i>Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos</i> , Campinas – SP, novembro de 2009	120
ANEXO B Resultados preliminares do Capítulo 2 apresentados na forma de resumo no 8º <i>Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos</i> , Campinas – SP, novembro de 2009	123
ANEXO C Parte do Capítulo 3 apresentado na forma de resumo no 8º <i>Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos</i> , Campinas – SP, novembro de 2009	126
ANEXO D Artigo “Concentration of phenolic compounds in aqueous extract of mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) through nanofiltration” submetido à publicação na <i>Food Chemistry</i> (ISSN: 0308-8146)	129

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. é uma planta arbórea, conhecida popularmente como erva-mate. É uma espécie nativa da América do Sul e tem sua área de ocorrência natural restrita a três países: Brasil, Paraguai e Argentina. O Brasil é o país com maior área de ocorrência, distribuindo-se entre os estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso do Sul e em pequenas áreas nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro (OLIVEIRA; ROTTA, 1985; CARVALHO, 1994). A erva-mate pode ser considerada produto característico dos estados do Sul do Brasil, sendo consumida sob a forma de chimarrão diariamente pelo público cativo dessa área (ROCHA JR; MILOCA, 2007).

O Brasil foi o maior exportador mundial de erva-mate, com um total de US\$ 46 milhões em 2008, e Santa Catarina foi um dos estados que teve participação nesses valores, pois foi responsável por uma produção de 39.637 toneladas de folhas no mesmo ano (IBGE, 2009). Com o objetivo de aumentar a exportação dessa planta e alcançar novos mercados, estudos têm sido conduzidos com o intuito de desenvolver novas aplicações para essa importante matéria-prima regional, valorizando a grande diversidade de compostos químicos com atividade biológica presente nessa planta.

Dentre a variedade de compostos químicos presentes nas folhas da erva-mate, os fenólicos têm se destacado pela sua diversidade e quantidade (HECK; MEJIA, 2007). Esses compostos abrangem várias substâncias orgânicas, entre ácidos fenólicos e flavonóides, compostos

responsáveis pela alta atividade antioxidante atribuída à *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). O consumo de antioxidantes tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com estresse oxidativo, como câncer e doenças neurodegenerativas (MILIOLI et al., 2007; MEJIA et al., 2010).

A extração dos compostos fenólicos se dá basicamente pelo uso de água, solventes orgânicos ou suas combinações. O solvente orgânico é um ótimo extrator, porém apresenta toxicidade para o organismo, o que pode dificultar a sua aplicação em alimentos e medicamentos (SONAGLIO et al., 2007). A extração aquosa, pelo método de infusão, apresenta bons resultados, quando há controle de alguns fatores, como por exemplo temperatura, tempo e pH de extração. Esses fatores, quando não aplicados adequadamente, podem acarretar perdas ou destruição de compostos (ANDREO; JORGE, 2006).

Na maioria das vezes, os extratos são concentrados com intuito de reduzir os custos com estocagem e transporte, como também aumentar a vida de prateleira do produto. No entanto, essa concentração geralmente é realizada por evaporação térmica, processo que acomete mudanças em compostos termosensíveis, como os compostos fenólicos (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007). Desta forma, o emprego de um processo de concentração de compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de erva-mate, que não apresente as mesmas desvantagens conhecidas do processo tradicional, seria de grande importância para a indústria alimentícia e farmacêutica. Assim, a tecnologia de membranas pode ser uma alternativa para a concentração deste tipo de produto, já que

concentra soluções pela seletividade de moléculas, utilizando baixas temperaturas (ORDÓNEZ, 2005).

Os resultados desta pesquisa pretendem servir de base para o desenvolvimento de trabalhos futuros, direcionados à caracterização de novos compostos do extrato concentrado e desenvolvimento de novos produtos à base de erva-mate.

Este trabalho será apresentado na forma de artigos, divididos nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Capítulo 2 – Otimização do processo de extração aquosa de compostos fenólicos das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) utilizando a metodologia de superfície de resposta

Capítulo 3 – Concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) por nanofiltração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **BOLETIM CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Curitiba: EMBRAPA/CNPFFlorestas, 1994. 641 p.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 519- 535.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. 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.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários.

Produção da Extração Vegetal e Sivilcultura – Base 2008, 2009.

Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2008/comentario.pdf>>. Acesso em: 10 de fev. de 2010.

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

MILIOLI, E. M.; COLOGNI, P.; SANTOS, C. C.; MARCOS, T. D.; YUNE, V. M.; FERNANDES, M. S.; SCHOENFELDER, T.; COSTA-CAMPOS L. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St. Hilarie (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 771-776, 2007.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985, p.17-36.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005, 293 p.

ROCHA JÚNIOR, W. F.; MILOCA, L. M. **Sistema Agroindustrial Ervateiro: perspectivas e debates**. Cascavel: Coluna do Saber, 2007. 206 p.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 289-326.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ERVA-MATE

A erva-mate pertence à família Aquifoliaceae e ao gênero *Ilex* (CARVALHO, 2003). No Brasil, de acordo com Gilberti (1995), existem 68 espécies pertencentes a esse gênero, sendo a espécie *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., considerada a ideal para a exploração comercial (FILIP et al., 2000).

August de Saint-Hilaire foi o cientista que classificou e publicou um nome botânico para a erva-mate, com base em exemplares coletados em Curitiba, durante suas viagens pelo sul do Brasil, em 1822, atribuindo à erva-mate o nome *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (MAZUCHOWSKI, 1991; SANT-HILARIE, 1995).

A primeira citação sobre o consumo do mate se deve ao general paraguaio Irala, em 1554, que observou os índios guaranis consumirem em pequenos porongos uma bebida elaborada com folhas de erva-mate. O produto consumido era constituído por folhas, que tostadas e moídas adquiriam um aspecto peculiar, que levou os colonizadores espanhóis a pensarem que se tratava de uma planta de pequeno porte, ou folhas de uma erva e, sem conhecerem a planta, mas apenas seu produto, a denominaram de “erva-mate”. O termo “mate” surgiu de uma palavra indígena, do termo *mati*, que significa cabaça, cuia ou porongo, recipiente onde é preparada a bebida tradicional, o chimarrão (LESSA,

Capítulo 1

1986; SOUZA, 1947 apud MACCARI JUNIOR, 2005; LINHARES, 1969 apud MACCARI JUNIOR, 2005).

A *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. é uma árvore perenifólia que pode alcançar até 30 m de altura e 100 cm de diâmetro de caule. Quando as plantas são manejadas para a produção, atingem altura entre 3 e 5 m (CARVALHO, 2003). Trata-se de uma espécie de sombra (umbrófila), crescendo preferencialmente em associações mais evoluídas dos pinheirais de *Araucária angustifólia*, acompanhada de outras espécies como *Ocotea porosa* (imbúia), *Cedrela fissilis* (cedro), *Podocarpus sp.* (pinho bravo), *Cabralea canjerana* (canjarana), além de mirtáceas, leguminosas diversas e Lauráceas (REITZ; EDWIN, 1967; OLIVEIRA; ROTTA, 1985; MAZUCHOWISKI, 1991; CORRÊA; KIST; QUINTANA, 1999; COELHO et al., 2000; BURGSTALLER, 2005).

A folha, parte da planta mais estudada cientificamente (BASTOS et al., 2006; SILVA et al., 2008; SCHINELLA et al., 2009), apresenta coloração verde escura, possui característica alternada e mostra-se estreita na base e ligeiramente obtusa no vértice. Sua borda é provida de pequenos dentes, visíveis principalmente da metade do limbo para a extremidade (MAZUCHOWISKI, 1991), conforme demonstrado na Figura 1.



Figura 1 – Folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

Fonte: Contreras (2007).

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ASPECTOS ECONÔMICOS DA ERVA-MATE

A erva-mate é nativa de região de clima temperado, sendo sua abrangência geográfica estendida desde as latitudes de 21° e 30° sul e longitudes de 48° até 56° oeste, com altitudes que variam entre 500 e 1.700 metros (OLIVEIRA; ROTTA, 1985), sendo que sua maior concentração ocorre nas altitudes de 500 a 1000 m (DA CROCE; FLOSS, 1999). A área de ocorrência natural está restrita a três países da América do Sul, Brasil, Paraguai e Argentina, conforme demonstrado na Figura 2. No Brasil, a ocorrência limita-se aos seguintes estados: Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Mato Grosso do Sul; aparecendo ainda, em reduzidos nichos de ocorrência de *Araucária angustifolia*, em Minas Gerais e Rio de Janeiro (OLIVEIRA; ROTTA,

1985; CARVALHO, 1994). Essas áreas equivalem a 450.000 Km² de ocorrência natural, correspondendo a cerca de 5 % do território brasileiro e 3 % do território sul-americano (DA CROCE; FLOSS, 1999).

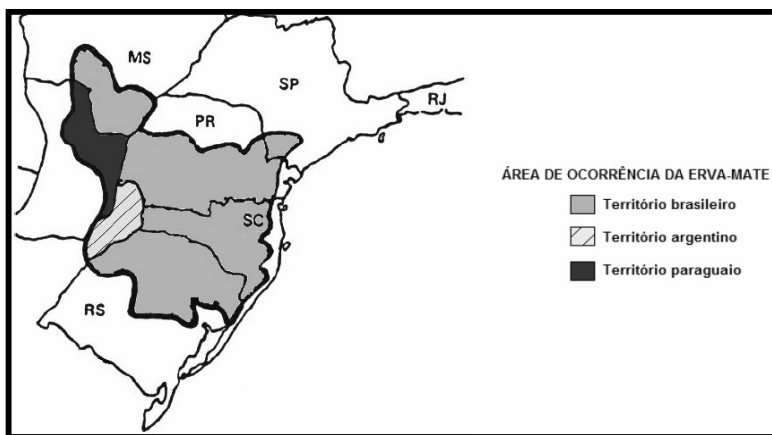


Figura 2 – Área de ocorrência natural de erva-mate.

Fonte: Oliveira e Rotta (1985).

A produção da erva-mate pode ocorrer em dois sistemas distintos: os ervais cultivados (plantado pelo homem a pleno sol ou sob sombra) e os ervais nativos (formado pela natureza). O homem intervém no erval nativo pelo processo de adensamento, consistindo no plantio de mudas de erva-mate nos lugares onde já existem ervais nativos em exploração, ao contrário do erval cultivado, onde o homem planta em terrenos inexistentes de erveiras (MAZUCHOWSKI, 1991). Tanto as plantas nativas quanto as plantas cultivadas preferem estações bem definidas, suportando bem os rigores do inverno, porém, longos períodos de seca podem ser prejudiciais para a planta, principalmente no

verão. Originariamente floresce com sub-bosque, mas resiste bem a céu aberto (COSTA, 1989). No entanto, a exposição ao sol influencia no sabor final do produto, podendo torná-lo mais “suave” (RAKOCEVIC et al., 2006) ou mais “amargo” (RUCKER, 1996) que plantas de erva-mate cultivadas em sombreamento.

A produção da erva-mate no Brasil marcou a história econômica e cultural de algumas regiões, podendo ser considerada produto característico dos estados do Sul do Brasil, sendo consumida sob a forma de chimarrão diariamente pelo público cativo dessa área (ROCHA JR; MILOCA, 2007). A influência dessa planta na formação sócio-econômica do Brasil foi tão grande, que pode ser considerada como a mais importante indústria extrativista depois da borracha (MAZUCHOWSKI, 1991).

O Sul é a região onde mais se consome erva-mate no Brasil, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior consumidor, com 65 % do total, seguido do Paraná com 17 %, Santa Catarina com 12 % e Mato Grosso do Sul com 3 %. Com relação à produção, ocorre uma inversão e um maior equilíbrio: o Paraná participa com 36 %, Santa Catarina com 32 %, Rio Grande do Sul com 29 % e Mato Grosso do Sul com 3 % (BRASIL, 2008). Em 2008 os estados sulinos foram responsáveis por 99,9 % da produção nacional (IBGE, 2009).

O setor ervateiro representa uma importante atividade econômica nesses estados (BRASIL, 2008), gerando mais de 710 mil empregos diretos (EMBRAPA, 2005). As empresas produtoras de erva-mate no País dividem-se em pequenos (46 %), médios (24 %) e grandes produtores (30 %). No primeiro segmento, a mão-de-obra é basicamente

Capítulo 1

familiar e, nas outras duas categorias, existe o envolvimento de pessoas assalariadas (ROCHA JR, 2001).

No período da colheita, principalmente nos meses de safra, de maio a setembro, o setor ervateiro gera milhares de empregos, constituindo uma das poucas opções de emprego e renda no meio rural (RUCKER; MACCARI JR; ROCHA JR, 2003; EMBRAPA, 2005; BRASIL, 2008).

Em 2008 o estado de Santa Catarina alcançou uma produção de 39.637 toneladas de folhas (IBGE, 2009). São mais de 100 municípios do Estado que produzem erva-mate extrativa, sendo essa produção mais intensificada no planalto norte, contemplando 61 % da produção e na região Oeste, com um valor considerável de 39 % (ICEPA, 2003). Localizada no centro-oeste do estado, Catanduvás é considerada a capital catarinense do chimarrão (CATANDUVAS, 2010). Dispondo de 9.391 habitantes em uma área territorial de 198 Km², localizada na latitude sul 27°, longitude oeste 51,40° e altitude de 800 metros, com temperatura média anual de 16,9 °C, (DA CROCE; HIDA; FLOSS, 1994; CATANDUVAS, 2010), o município apresenta todas as características favoráveis para o desenvolvimento da erva-mate (OLIVEIRA; ROTTA, 1985).

O Brasil foi o maior exportador mundial de erva-mate com um total de US\$ 46 milhões em 2008 (IBGE, 2009), sendo os principais mercados o Uruguai, Chile, Estados Unidos, Alemanha, Argentina, Espanha, Itália, França, Síria e Bélgica. Em agosto de 2009, a Agência Brasileira de Promoção de Exportações e Investimentos (ApexBrasil) firmou uma parceria com a Associação Brasileira das Indústrias

Exportadoras de Erva-Mate (Abimate) com o objetivo de aumentar a exportação dessa planta. A parceria não apenas vai incentivar a exportação dos produtos tradicionais, chimarrão e tererê, como também o desenvolvimento de novos produtos a base de erva-mate, com intuito de atrair o mercado internacional.

1.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE

A alta variedade de compostos químicos presentes nas folhas da erva-mate tem sido foco de muitas pesquisas. Dentre esses compostos já relatados para a espécie, pode-se destacar a presença de vitaminas (GRAHAM, 1984 apud MEJIA et al., 2005), minerais (PAGLIOSA, 2009), substâncias glicosídicas como as saponinas (GNOATTO et al., 2008), metilxantinas (SCHUBERT et al., 2006), taninos, carotenóides (VALDUGA, 1995), óleos essenciais (BASTOS et al., 2006), clorofila (MALHEIROS, 2007), além de água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, aminoácidos, substâncias graxas, resina aromática (formada por uma mistura de oleína, palmitina, lauroestearina e um óleo cujas características muito se aproximam da cumarina), ácido fólico (VERONESE, 1944 apud VALDUGA, 1995) e compostos fenólicos (HECK; MEJIA, 2007).

Como um dos mais abundantes tipos de compostos encontrados nas folhas da erva-mate, os fenólicos são foco de um grande número de estudos (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; BASTOS et al., 2006; HECK; MEJIA, 2007; GUGLIUCCI et al., 2009). Esses compostos são

metabólitos secundários presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CARVALHO; GOSMANN; SHENKEL, 2007). São sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta e em resposta a condições de estresse, como por exemplo, infecções e irradiação UV (BECKMAN, 2000; RAKOCEVICZ et al., 2006; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

A família de compostos fenólicos abrange várias substâncias orgânicas, desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998). São compostos por pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, apresentando estrutura básica, conforme a Figura 3 (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

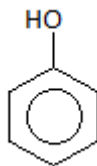


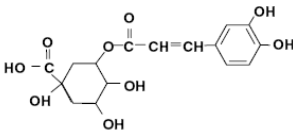
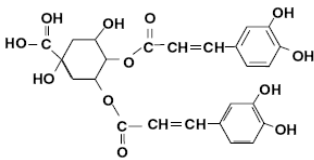
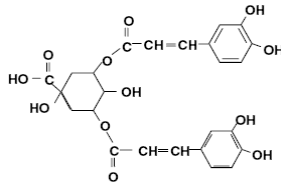
Figura 3 - Estrutura básica de um fenol.

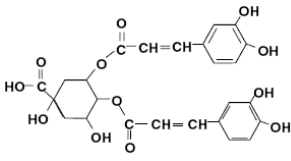
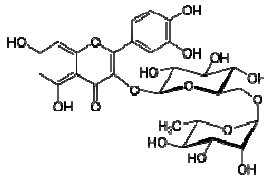
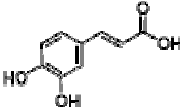
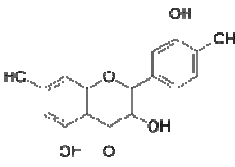
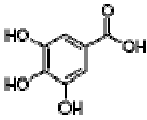
Fonte: Mello (2008).

Os compostos fenólicos podem ser divididos basicamente em dois grandes grupos: flavonóides e ácidos fenólicos. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007), estando presentes nas folhas da erva-mate, principalmente os compostos rutina, quercetina e campferol (FILIP et al., 2001; HECK; MEJIA, 2007). Porém, o grupo responsável pela alta

Capítulo 1

concentração fenólica da planta são os ácidos fenólicos, representados, principalmente, pelo ácido caféico e seus derivados: ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5- dicafeoilquínico (CARDOZO JR et al., 2007; HECK; MEJIA, 2007; SCHINELLA et al., 2009; MEJIA et al., 2010). As estruturas e a massa molar dos principais fenólicos encontrados na folha da erva-mate estão demonstradas no Quadro 1.

Composto Fenólico	Estrutura Molecular	Massa Molar (g/mol)
Ácido Clorogênico		354,3
Ácido 4,5-dicafeoilquínico		516,5
Ácido 3,5-dicafeoilquínico		516,5

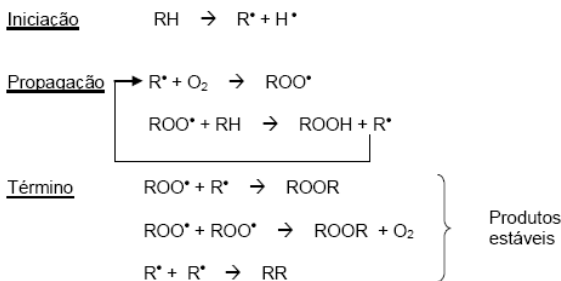
<p>Ácido 3,4-dicafeoilquínico</p>	 <p>The structure shows a central quinic acid core with two caffeoyl chains attached via ester linkages at the 3 and 4 positions. Each caffeoyl chain consists of a propenoic acid moiety linked to a 3,4-dihydroxyphenyl ring.</p>	<p>516,5</p>
<p>Rutina</p>	 <p>The structure shows a rutinose sugar moiety (a disaccharide of glucose and rhamnose) attached to a quercetin aglycone at the 3-O position.</p>	<p>610,52</p>
<p>Ácido Caféico</p>	 <p>The structure shows a 3,4-dihydroxyphenyl ring attached to a propenoic acid chain at the 3-position.</p>	<p>180,2</p>
<p>Quercetina</p>	 <p>The structure shows a flavan-3-ol core with a 3,4-dihydroxyphenyl ring at the 3-position and a 3-hydroxyphenyl ring at the 4-position.</p>	<p>302,2</p>
<p>Ácido Gálico</p>	 <p>The structure shows a 3,4,5-trihydroxyphenyl ring attached to a propenoic acid chain at the 3-position.</p>	<p>170,1</p>

Quadro 1 – Estrutura e Massa Molar dos principais compostos fenólicos presentes nas folhas de erva-mate.

Fonte: Sigma Aldrich (2010).

1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE

Uma das principais e mais conhecidas atividade biológica da erva-mate é a atividade antioxidante (BASTOS et al., 2006), a qual possui a propriedade de combater os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (FANG; YANG; WU, 2002). O radical livre se forma na etapa de “iniciação” do mecanismo da oxidação lipídica, devido à retirada de um hidrogênio do carbono α – metileno da molécula de ácido graxo, na presença de luz e calor. Na etapa da “propagação”, os radicais livres (moléculas susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico) são convertidos em peróxidos e hidroperóxidos, que são radicais propagadores de outros radicais livres. Segue-se a etapa de “terminação”, onde os radicais livres reagem entre si formando produtos estáveis, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (ANDREO; JORGE, 2006). As etapas estão ilustradas na Figura 4.



RH = Ácido graxo; R^{\bullet} = Radical livre; ROO^{\bullet} = Radical peróxido; $ROOH$ = radical hidroperóxido.

Figura 4 – Mecanismo de Reação da Oxidação Lipídica.

Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Os fenólicos são os principais compostos relacionados com a atividade antioxidante da erva-mate, sendo considerados antioxidantes naturais (SANCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Apresentam características de antioxidantes primários, pois promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a “iniciação” ou “propagação”, através da doação de átomos de hidrogênio para estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (GORDON, 1990).

O consumo de antioxidante tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (DROGE, 2002). O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial. O dano oxidativo que as biomoléculas sofrem está relacionado com um grande número de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas (LIAO; KAO; HIIPAKKA, 2001; WISEMAN; WATERHOUSE; KORVER, 2001; LU; FOO, 2002; JAVANMARDI; STUSHNOFF; VIVANCO, 2003; KIM; JEONG; LEE, 2003; MENDEL; YAUDIM, 2004).

Os efeitos antioxidantes de uma substância são medidos indiretamente, pelos seus efeitos em um sistema ou substrato ou sistema biológico onde tais efeitos possam ser monitorados. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de plantas, incluindo DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), ABTS (2,2, azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) e ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais Oxigênio) (DUDONNE et al., 2009). Dentre esses métodos,

o DPPH, um radical livre estável, se destaca pela sua simplicidade e capacidade de avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais, em condições de temperatura ambiente. O DPPH na presença de um antioxidante doador de hidrogênio pode ser reduzido em meio alcoólico. Quanto mais DPPH for reduzido, maior a atividade antioxidante da solução testada (MOLYNEUX, 2004).

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à capacidade antioxidante dos fenólicos extraídos da folha da erva-mate. Segundo Milioli et al. (2007) o extrato hidroalcoólico da *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. apresentou um perfil *antiparkinsoniano* em diferentes modelos animais. Prediger et al. (2008) observaram uma melhora na memória a curto prazo em ratos, utilizando extrato desta planta. Mejia et al. (2010) mostraram que a erva-mate apresentou uma eficiente inibição *in vitro* de câncer de cólon. Os resultados de Mosimann, Wilhelm Filho e Silva (2006) mostraram que o extrato da erva-mate causou a inibição da progressão de aterosclerose em coelhos alimentados com colesterol. De acordo com Silva et al. (2008) a combinação dos fenólicos presentes no extrato da erva-mate promoveu a proteção do LDL contra a peroxidação lipídica no estudo *ex vivo*. Alguns autores relacionam a prevenção do câncer com os compostos fenólicos da erva-mate, como Mejia et al. (2005), que observaram a inibição do crescimento de células orais cancerígenas utilizando o extrato de erva-mate e Alía et al. (2006), que avaliaram a atividade quimiopreventiva dos fenólicos rutina e quercetina em hepatócitos isolados de humanos.

1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NA ERVA-MATE

O termo *extração* significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na matéria-prima vegetal, utilizando para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros. O produto resultante dessa extração sólido-líquido é denominado de *solução extrativa*, o qual pode ser preparado em meio aquoso, alcoólico ou hidroalcoólico (SONAGLIO et al., 2007).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos (SONAGLIO et al., 2007). Por esse motivo, a extração desses compostos, na grande maioria dos estudos, é realizada com água, solventes orgânicos e suas combinações (TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006; CARDOZO JR et al., 2007; KSOURI et al., 2008; THUONG et al., 2009). Segundo Naczk e Fereidoon (2004), nenhum procedimento é completamente satisfatório para extração de todos os fenólicos de plantas, porém, alguns fatores podem influenciar nesse resultado, sendo eles, a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o pH, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (SHAIJI; NACZK, 1995 apud ANDREO; JORGE, 2006; TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006).

Muitas controvérsias são verificadas no uso de solventes para extração de fenólicos. Segundo Ksouri et al. (2008) o melhor solvente para extração dos fenólicos das folhas da *Limoniastrum monopetalum*

foi o metanol, seguido pela acetona. Já o etanol, água e hexano, apresentaram os piores resultados nesta extração. No trabalho de Chan et al. (2009), o melhor solvente extrator de fenólicos para o chá comercial a base das folhas de *Alpinia zerumbet* foi a água quente, ao contrário do mesmo chá seco por processo a frio, que obteve melhor extração utilizando metanol.

A extração dessas substâncias com solventes orgânicos pode ser eficiente para alguns casos, porém seu uso se torna limitado quando se trata da alta toxicidade para o consumo humano e do impacto ambiental gerado pelos resíduos (ANDREO; JORGE, 2006; SONAGLIO et al., 2007). Considerando esses fatores, a água, sem dúvida, é um dos líquidos extratores mais importantes e com maior aceitabilidade no mercado alimentício.

Nos estudos realizados com a *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., a grande maioria das extrações de fenólicos utiliza água quente como solvente, porém os únicos fatores que são empregados nessas extrações são a temperatura e o tempo, ambos utilizados com grandes variações (BIXBY et al., 2005; MEJIA et al., 2005; BASTOS et al., 2006; CARDOZO JR et al., 2007; STREIT et al., 2007; DELADINO et al., 2008; PAGLIOSA et al., 2010). Sendo assim, conhecer as melhores condições para extração aquosa desses compostos presentes nas folhas de erva-mate pode ser importante para evitar a destruições ou perdas dos mesmos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

A concentração do extrato de compostos fenólicos também é considerada um método expressivo no resultado final. A concentração objetiva a eliminação parcial ou total do líquido extrator, levando à

obtenção de um produto intermediário concentrado, com viscosidade e consistência variáveis (SONAGLIO et al., 2007). Essa redução da água proporciona diminuição no custo de estocagem e de transporte (SINGH; HELDMAN, 1993 apud DEGÁPAR et al., 2002; LEWICKI, 2006).

Geralmente a concentração é realizada por evaporação térmica, utilizando temperaturas altas por um longo período de tempo, indubitavelmente sendo o processo de evaporação mais utilizado pelas indústrias alimentícias (AIDER; HALLEUX; AKBACHE, 2007). No entanto, estudos revelam acometimentos desse processo sobre a qualidade do produto, promovendo mudanças sensoriais e nutricionais significativas, reduzindo drasticamente compostos termo-sensíveis (JIAO; CASSANO; DRIOLI, 2004; LEWICKI, 2006), como por exemplo, os compostos fenólicos, substâncias consideradas altamente instáveis (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Conhecendo as desvantagens apresentadas pelo processo de evaporação térmica, é necessária a busca por novas alternativas para concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso de erva-mate. Não existem relatos na literatura da utilização do processo de separação com membranas para esse fim. Entretanto, esta tecnologia apresenta-se como promissora, já que esse processo pode separar moléculas de diversos tamanhos, além de ser conduzido a baixas temperaturas e não envolver mudanças de fase, fatores importantes na manutenção das características do produto (CASSANO et al., 2006).

1.6 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS

1.6.1 Processo de filtração

Os processos de separação com membranas (PSM) vêm se desenvolvendo rapidamente nos últimos anos, sendo foco das indústrias químicas (VADI; RIZVI, 2001), farmacêuticas (MEISEL, 1998), biotecnológicas (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2006) e de alimentos (DEY et al., 2004), como uma alternativa aos processos convencionais de separação. Entretanto, esta tecnologia teve seu primeiro uso destacado no ano de 1960, cujo objetivo foi a dessalinização de água. Porém, em escala comercial seu desenvolvimento somente emergiu em 1980, nos Estados Unidos e na Noruega (HABERT; BORGES; NÓBREGA, 2000; MULDER, 2000; SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001). Os processos que empregam membranas são usados para concentrar e/ou fracionar um líquido em dois líquidos geralmente de composições diferenciadas, o permeado e o retentado ou concentrado (ORDÓNEZ, 2005). Esses processos são baseados no princípio da permeação seletiva de moléculas, permitindo, dessa forma, a passagem de certos componentes e retenção de outros presentes na solução, conforme demonstrado na Figura 5 (STRATHMANN, 1990; MAROULIS; SARAVACOS, 2003; FERRAZ et al., 2005).

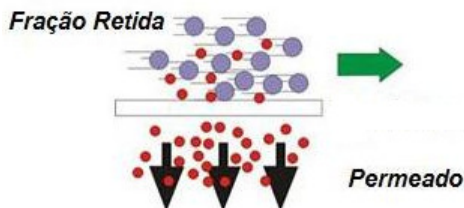


Figura 5 – Esquema básico da permeação seletiva de moléculas.

Fonte: Adaptado de Amorim (2007).

Entre diversas vantagens apresentadas pelo PSM, três se destacam: seletividade, uma vez que a separação ocorre devido a diferença entre as propriedades dos compostos; economia de energia, já que, em geral, tais processos não envolvem mudança de fase; condições de operação branda, visto que os processos são geralmente conduzidos a temperatura ambiente, sendo adequados para substâncias termolábeis (FERRAZ et al., 2005; CASSANO et al., 2006).

A seletividade das membranas porosas está associada à relação entre a massa molar das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. Porém, outras propriedades das moléculas podem influenciar a afinidade das espécies com o material da membrana, como por exemplo, a forma, carga elétrica, solubilidade e taxa de difusão (ORDÓNEZ, 2005).

No PSM, o escoamento do fluido é paralelo à membrana, e a filtração é tangencial, possibilitando o arraste dos solutos acumulados sobre a mesma. A corrente de entrada é separada em duas na saída, chamadas de corrente de permeado e corrente de retentado, que representam, respectivamente, a parte da solução que atravessa a

membrana e a parte da solução concentrada com os solutos, que não permeia a membrana. Já nos sistemas convencionais de filtração, o fluido escoava perpendicularmente ao elemento filtrante, aumentando o tempo de processo e depósito de solutos sobre a superfície da membrana (RAUTENBACH; ALBRECHT, 1989; RIJN, 2004). A Figura 6 mostra os dois sistemas de filtração.

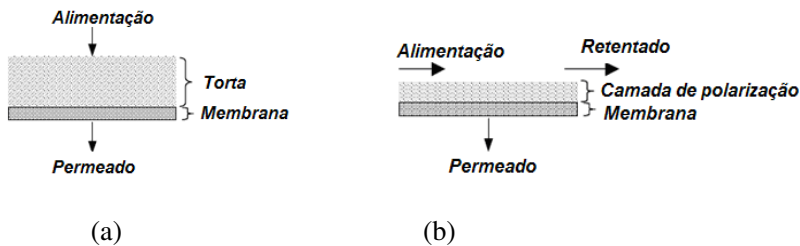


Figura 6 – Esquema da filtração convencional (a) e da filtração tangencial (b).
Fonte: Mello (2008).

A caracterização das membranas pode ser feita de acordo com sua estrutura morfológica, natureza (material) e configuração modular. Do ponto de vista morfológico, as membranas podem ser porosas ou densas e simétricas (isotrópicas) ou assimétricas (anisotrópicas) (ANON, 2004). As membranas porosas possuem capacidade seletiva diretamente associada entre o tamanho do poro da membrana e o tamanho das espécies presentes, que devem ser inertes em relação ao material que constitui a membrana. Já as membranas densas não possuem poros em contato com a solução a ser processada e o transporte das moléculas envolve uma etapa de dissolução, difusão através do material que constitui a membrana, com posterior dessorção do componente no lado do permeado. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser simétricas ou assimétricas. As membranas

Capítulo 1

simétricas possuem poros de tamanho homogêneo ao longo de sua extensão, apresentando seletividade absoluta. As assimétricas apresentam uma diferença no tamanho do poro perpendicular à superfície, sendo que a camada com poros menores é responsável pela permeabilidade, enquanto que a camada com poros maiores, pela sustentação mecânica da membrana (DZIEZAK, 1990).

Uma grande variedade de materiais pode ser usada na confecção de uma membrana. De acordo com a evolução tecnológica, essas membranas podem ser separadas em três classes distintas. As membranas de primeira geração são constituídas de derivados de acetato de celulose, sendo mais sensíveis ao pH, temperatura e agentes químicos de limpeza, além de apresentar sensibilidade a alguns microrganismos (biodegradabilidade). As de segunda geração são compostas por polímeros sintéticos, principalmente derivados de polissulfonas e poliamidas, são mais resistentes a ação de ácidos e bases fortes e também a temperaturas mais altas, até 100 °C. A desvantagem desse tipo de membrana é a baixa resistência à desinfetantes a base de cloro. As membranas de terceira geração são constituídas de materiais cerâmicos a base de óxido de zircônio ou alumina, possuindo grande resistência mecânica (suportam pressão de 20 bar), química (toleram toda faixa de pH 0 a 14) e alta resistência térmica (superiores a 400 °C), apresentando, assim, tempo de vida de vários anos em uso contínuo (PETRUS, 1997; FUKUMOTO; DELAQUIS; GIRARD, 1998; BASSETTI, 2002; RIJN, 2004).

A configuração do módulo, que dá suporte e acondiciona a membrana, representa mais uma variável importante. As formas mais comuns de módulos são: tubular, pratos, espiral e capilares. Esses

módulos devem apresentar canais para alimentação e para a remoção do retentado e do permeado. As configurações do módulo devem atender características de interesse, tais como, alta razão de área de permeação por volume ocupado, baixo custo de fabricação, facilidade de operação e de limpeza, além da possibilidade e facilidade de substituição da membrana (OSADA; NAKAGAWA, 1992).

A força motriz que geralmente é aplicada à membrana para impulsionar a separação de materiais pode ser de natureza distinta: gradiente de pressão, potencial elétrico e gradiente de concentração. Dentre eles, o gradiente de pressão é o mais comumente usado (ROSENBERG, 1995).

Em função do transporte e da força-motriz, têm-se diferentes processos de separação com membranas, dos quais podem se destacar: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa (Figura 7) (BASSETTI, 2002; ANON, 2004). Esses diferentes processos são uma das principais características que controlam os componentes que permearão e aqueles que ficarão retidos. A seletividade da membrana está relacionada às dimensões da molécula ou partícula de interesse de separação e ao tamanho do poro, assim como à difusividade do soluto na matriz e às cargas elétricas associadas. Os componentes podem ser separados seletivamente de acordo com uma larga extensão de tamanhos de partículas e massas molares, de macromoléculas até íons (MAROULIS; SARAVACOS, 2003).

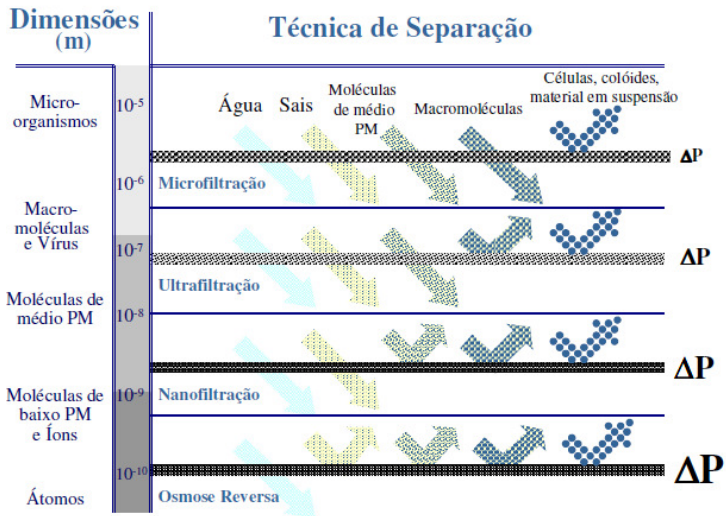


Figura 7 – Classificação das membranas quanto a sua seletividade.

Fonte: Mierzwa et al. (2008).

O processo de Microfiltração (MF) geralmente é utilizado nas indústrias com o objetivo de clarificação e esterilização. Nesse processo o diâmetro dos poros varia entre 10 e 0,1 μm , sendo usado para remover partículas suspensas, gorduras, proteínas de alta massa molar e microrganismos (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005; VINCZE; BANYAI-STEFANOVITS; VATAI, 2007; DEBON, 2010). Ultrafiltração (UF) é o processo utilizado para clarificar, fracionar, concentrar e purificar substâncias. Na aplicação desse processo, o diâmetro do poro utilizado pode variar de 0,1 a 0,01 μm (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005; CASSANO et al., 2009). Na Osmose Reversa (OR) a membrana possui diâmetro de poro menor do que 0,001 μm , sendo aplicada para dessalinização e purificação de águas

(BESSENASSE; KETTAB; MOULLA, 2010). A Nanofiltração (NF) é um processo compreendido entre a osmose reversa e a ultrafiltração, onde ocorre a permeação do solvente e de pequenos íons bivalentes (RIJN, 2004; NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005). A Figura 8 esquematiza um processo de separação com membranas.

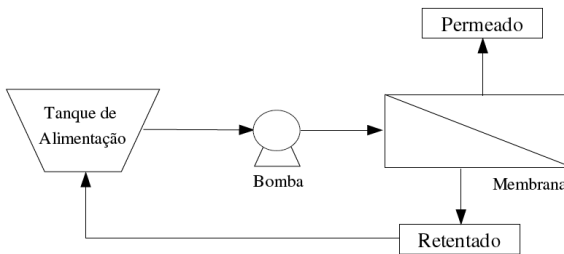


Figura 8 – Esquema de um processo de separação com membrana.

Fonte: Mello (2008).

O tamanho de poro é uma informação importante na escolha de uma membrana. Essa informação pode ser obtida pela literatura ou, principalmente, pelos fabricantes, através da massa molar de corte (MWCO), que designa a massa molar do menor componente que será retido com uma eficiência de pelo menos 95 %. De modo geral, quando se trata da separação de macromoléculas, a unidade mais utilizada para a massa molar de corte é o dalton (g/mol) (MOLDER, 2000).

Durante o processo de separação por membranas, geralmente ocorre um declínio do fluxo de permeado (J) com o tempo (a pressão constante). O fluxo de permeado (J) representa o volume de produto permeado que atravessa a área da membrana em um determinado tempo. O fluxo de permeado nos processos de separação por membrana é, principalmente, afetado pela pressão, concentração da alimentação,

temperatura e velocidade tangencial, sendo que alguns destes parâmetros são usados no controle e desempenho do processo (RENNER; SALAM, 1991).

A redução do fluxo de permeado deve-se principalmente aos fenômenos de polarização por concentração, *fouling* e formação da camada de gel (MIRANDA, 2005). A partir do início do processo de filtração, ocorre um acúmulo de solutos próximo à superfície da membrana, por transporte convectivo, onde parte do solvente é removida do fluido, o que ocasiona uma maior concentração de solutos na superfície da membrana em relação à da solução. Esse aumento da concentração de solutos na superfície da membrana é conhecido como polarização por concentração e é responsável pela diferença observada entre o fluxo de permeado final e inicial, comparando-se com o fluxo de água pura (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2006).

O *fouling* da membrana resulta da penetração de solutos presentes em soluções de macromoléculas ou de suspensões coloidais na superfície interna dos poros da membrana e também da adsorção de moléculas no material da membrana, acarretando também uma diminuição no fluxo do solvente e alterando as características de retenção. Já a camada de gel ocorre quando na superfície da membrana há uma precipitação de macromoléculas. A formação da camada de gel ocasiona um prejuízo no funcionamento hidrodinâmico do sistema, pois constitui em mais uma barreira para o fluxo de permeação (DAUFIN et al., 1991; ALICIEO et al., 2007).

1.6.2 Nanofiltração

A Nanofiltração (NF) é um processo que tem a capacidade de separar e fracionar substâncias com baixa massa molar, possuindo diâmetro de poros correspondentes a uma faixa de 0,01 a 0,001 μm , sendo possível separar moléculas com massa molar de 100 a 1000 g/mol (Da) (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005), faixa onde se localizam as massas molares dos compostos fenólicos da erva-mate (Quadro 1).

Na tecnologia de membranas o mecanismo de separação não é apenas o de filtração, estando envolvidos também os mecanismos de solubilidade e difusão. As membranas para a nanofiltração são produzidas em forma de pratos, espiral, fibra tubular e capilar, porém, a forma de espiral é a mais utilizada para esse processo de filtração. Os materiais utilizados na produção de membranas nanofiltrantes variam entre celulósicos, poliméricos e cerâmicos (NOBREGA; BORGES; HARBERT, 2005; XU; WANG, 2005, SUTHERLAND, 2008).

As membranas utilizadas em nanofiltração permitem a passagem de espécies iônicas e moléculas de baixa massa molar. O princípio básico é o mesmo dos demais processos com gradiente de pressão como força motriz, onde a solução circula sob pressão em contato com uma membrana microporosa. Sob o efeito da pressão o solvente, em geral água, atravessa a membrana e dá origem ao fluxo permeado, carregando sais e moléculas de baixa massa molar, enquanto as moléculas de maior massa molar não permeiam a membrana (SILVA, 2004).

Os parâmetros mais importantes que afetam os custos de investimento e operação em nanofiltração são a taxa de recuperação, que expressa a eficiência da membrana em remover sais e outros componentes da solução e afeta diretamente o tamanho, custo e potência dos equipamentos usados no processo; e a membrana utilizada (PILIPOVIK; RIVEROL, 2005).

A aplicação do processo de nanofiltração no ramo industrial vem aumentando, devido a sua alta capacidade de reter compostos com massa molar pequena, favorecendo, assim, a concentração de compostos bioativos, substâncias de grande interesse nas áreas alimentícia e farmacêutica. Gilewicz-Lukasik, Koter e Kurzawa (2007) obtiveram resultados satisfatórios na concentração das antocianinas da fruta *Aronia melanocarpa*, compostos amplamente estudados pelas suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas. Mello, Petrus e Hubinger (2010) aumentaram a concentração de fenólicos e flavonóides, compostos com alta atividade antioxidante, no extrato aquoso e alcoólico de própolis. Segundo Xu e Wang (2005), o processo também foi eficiente na concentração do extrato de *Ginkgo biloba*, planta com grande interesse farmacêutico e nutricional, pela atividade biológica proporcionada pelos seus constituintes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDER, M.; HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.

ALÍA, M.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; GRANADO-SERRANO, A. B.; BRAVO, L.; GOYA, L. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 110-118, 2006.

ALICIEO, T. V. R.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D.; ALVES, J. A. Avaliação do fouling na microfiltração de cerveja – estudo das resistências. **Acta Science Technology**, v. 29, n. 2, p. 151-156, 2007.

AMORIM, F. F. **Remoção dos contaminantes orgânicos b-estradiol e saxitoxina (STX, Neo-STX E dc- STX) por meio de Nanofiltração: avaliação em escala de bancada**. 2007, 147 f. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em engenharia civil e ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **Boletim CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANON, Membrane technology benefits the food processing industry. **Filtration & Separation**, v. 41, n. 8, p. 32-33, 2004.

BASSETTI, F. J. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas poliméricas microporosas assimétricas**. 2002. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p.538–543, 2006.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 101-110, 2000.

BESSENASSE, M.; KETTAB, A.; MOULLA, A. S. Seawater desalination : Study of three coastal stations in algiers region. **Desalination**, v. 250, p. 423-427, 2010.

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

BRASIL. Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul. **Apex-Brasil lança projeto para exportação de erva-mate**, 2008. Disponível em: <
<http://www.al.rs.gov.br/Ag/NOTICIAS.ASP?txtIDMATERIA=210732&txtIdTipoMateria=3>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

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

BURGSTALLER, J. A. **700 Hierbas Medicinales**. Buenos Aires: Editorial Plus Ultra, 2005. 223 p.

CARDOZO JR, E. L.; FERRARESE FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira**. Curitiba: EMBRAPA/CNP Florestas, 1994. 641 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Empresa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, v. 1, 2003. 1039 p.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 519- 535.

CASSANO, A.; FRIGOLI, A.; TAGARELLI, A.; SINDONA, G.; DRIOLI, E. Integrated membrane process for the production of highly nutritional kiwifruit juice. **Desalination**, v. 189, p. 21-30, 2006.

CASSANO, A.; TASSELLI, F.; CONIDI, C; DRIOLI, E. Ultrafiltration of Clementine mandarin juice by hollow fibre membranes. **Desalination**, v. 241, p. 302-308, 2009.

CATANDUVAS. **História**. In Prefeitura Municipal de Catanduvás, 2010. Disponível em: <
<http://www.classificadosmercosul.com.br/catanduvás/historia.htm>>.
Acesso em: 19 de jan. de 2010.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; TAN, S. P.; LIANTO, F. S.; YONG, M. Y. Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**, v. 113, p. 166-172, 2009.

COELHO, G. C. et al. Efeito do sombreamento sobre a sobrevivência, morfologia e química da erva-mate. In: II CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, **Anais...** Porto Alegre: Universidade do Rio Grande do Sul e Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2000, p. 396-399.

CONTRERAS, P. D., **Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e verificação de sua atividade antioxidante**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CORRÊA, S; KIST, B. B; QUINTANA, A. **Anuário Brasileiro da Erva-Mate**. Santa Cruz do Sul: Editora Palotti, 1999. 64 p.

COSTA, S.G. **A erva-mate**. Curitiba: Cientia et Labor, 1989. 115 p.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999. 81p.

DA CROCE, D. M.; HIDA, A. R.; FLOSS, P. A. **Escolha de fontes de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) para Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1994. 23p.

DAUFIN, G.; MERIN, U.; LABBE, J. P.; QUEMERAIS, A.; KERHERVE, F. L. Cleaning of inorganic membranes after whey and milk ultrafiltration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 82-89, 1991.

DEBON, J. **Emprego da microfiltração tangencial na obtenção de leite fermentado prebiótico. 2010. 122 f.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DEGÁPAR, C. H.; LEITE, B. Z.; BALSINI, I.D.; GUERRA, A. S. Obtenção de extrato de carqueja (*Baccharis articulata* (Lam.) Pers.) por diferentes processos de concentração. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, v. 29, p. 119-130, 2002.

DELADINO, L.; ANBINDER, P. S.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.

DEY, B.K.; HASHIM, M.A.; HASAN, S.; GUPTA, B.S. Microfiltration of water-based paint effluents. **Advances in Environmental Research**, v.8, p. 455-466, 2004.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUDONNE, S.; VITRAC, X.; COUTIERE, P.; WOILLEZ, M.; MERILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

DZIEZAK, J.D. Membrane separation technology offers processors unlimited potential. **Food Technology**, v.44, n.9, p.108-113, 1990.

EMBRAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultivo da Erva-Mate**, 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/01_importancia_socioec.htm>. Acesso em: 10 jan. de 2010.

FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FERRAZ, H. C.; DUARTE, L. T.; LUCCIO, M. D.; NOBREGA, R.; HABERT, A. C.; BORGES, C. P. Transporte Facilitado em Separações por Membrana. In: MELO JUNIOR, P. A. **Fronteiras da Engenharia Química 1**. Rio de Janeiro: E-papers, 2005, p. 177-208.

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

FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p.774-778, 2001.

FUKUMOTO, L. R; DELAQUIS, P; GIRARD, B. Microfiltration and ultrafiltration ceramic membranes for apple juice clarification. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 845-850, 1998.

GILEWICZ-LUKASIK, B.; KOTER, S.; KURZAWA, J. Concentration of anthocyanins by the membrane filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 418-424, 2007.

GNOATTO, S. C.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; NASCIMENTO, S.; GALÉRA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1865-1877, 2008.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. J. F. **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M. F. F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009.

HABERT A.C.; BORGES C.P.; NÓBREGA R. Processos de separação com membranas. **Programa de engenharia química/ COPPE/ UFRJ**, 2000.

HABERT, A., C; BORGES, C.P.; NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006. 180p.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal o Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comentários. **Produção da Extração Vegetal e Sivilcultura** – Base 2008, 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2008/comenta rio.pdf>>. Acesso em: 10 de fev. de 2010.

ICEPA – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina: 2002-2003**, 2003. Disponível em <http://www.agricultura.sc.gov.br/arquivos/sint_2003.pdf> Acesso em: 19 de jan. de 2010.

JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, L. E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 3, p. 547-550, 2003.

JIAO, B.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 303-324, 2004.

KIM, D.O.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v. 81, p. 321-326, 2003.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 865-873, 2008.

LESSA, B. **História do Chimarrão**. Porto Alegre: Editora Sulina, 1986. 111 p.

LEWICKI, P. P. Design of hot air drying for better foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p.153-163, 2006.

LIAO, S.; KAO, Y. H.; HIIPAKKA, R. A. Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. **Vitamins and Hormones**, v. 62, p. 1-94, 2001.

LU, Y., FOO, L. Y. Polyphenolics of Salvia – a review. **Phytochemistry**, v. 59, p.117-140, 2002.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76 p. 419-427, 2005.

MACCARI JÚNIOR, A. **Análise do pré-processamento da erva-mate para chimarrão**, 2005. 199 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Tecnologia Pós-colheita, Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.

MALHEIROS, G. C. **Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão**. 2007, 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. Membrane Separation Process. In: **Food Process Design**. New York: Marcel Dekker, 2003. 443 p.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. 2^a ed. Curitiba: EMATER, 1991. 104 p.

MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v.8, p. 363-373, 1998.

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

MEJIA, E. G.; YOUNG, S. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MELLO, B. C. B. S. **Concentração de extrato de própolis através de membranas poliméricas**. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MELLO, B.C.B.S., PETRUS, J. C. C., HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MENDEL, S.; YODIM, M. B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 304-317, 2004.

MIERZWA, J.C.; SILVA, M.C.C. da.; RODRIGUES, L.D.B.; HESPANHOL, C. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.78, n.13, p. 78- 87, 2008.

MILIOLI, E. M.; COLOGNI, P.; SANTOS, C. C.; MARCOS, T. D.; YUNE, V. M.; FERNANDES, M. S.; SCHOENFELDER, T.; COSTA-CAMPOS L. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St. Hilarie (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 771-776, 2007.

MIRANDA, K. F. **Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (*Citrullus vulgaris* Schard)**. 2005. 149 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MOLDER, W. H. Milk Processing. In: SHURYO, N.; MOLDER, W. H. **Food Protein Processing Applications**, United States of America: Wiley – VCH, 2000, p. 1-88.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (mate) attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology, Center for Membrane Science and Technology**, University of Twente, Enschede, The Netherlands, 2000. 564p.

NACZKA, M.; FERREIDON, S. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NOBREGA, R.; BORGES, C. P.; HARBERT, A. C. Processo de Separação por Membranas. In: PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. **V. Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 444 p.

OLIVEIRA, Y. M. M. de; ROTTA, E. Área de distribuição geográfica nativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 1985, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985, p.17-36.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, v.1, 2005, 293 p.

OSADA, Y.; NAKAGAWA, T. **Membrane Science and Technology**. Marcel dekker, Inc., New York, 1992.

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)** 2009. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PAGLIOSA, C. M., VIEIRA, M. A., PODESTÁ, R., MARASCHIN, M., ZENI, A. L. B., AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PETRUS, J. C. C. **Preparação, modificação e caracterização de membranas assimétricas para clarificação de sucos de frutas**. Campinas, 1997, 139 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.

PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization system based on reverse osmosis. **Journal of Food Engineering**. V.69, p. 437–441, 2005.

PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M.S.; RIAL, D.; WOPEREIS. S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; DA SILVA, C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; COSTA-CAMPOS, L. . Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 465-473, 2008.

RAKOCEVICZ, M.; MEDRADO, M. J. S.; LUCAMBIO, F.; VALDUGA, T. A. Influência do sexo, da sombra e da idade de folhas no sabor do chimarrão. In: 4^o CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE. 2006, Argentina. **Actas**. Argentina: INYM, INTA, UNaM, EPAGRI, 2006, 1^a Ed, p. 31-36.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAUTENBACH, R.; ALBRECHT, R. **Membrane Processes**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1989. 470 p.

REITZ, R.; EDWIN, G. **Aquifoliceae**. Itajaí: Barbosa Rodrigues, 1967. 47 p.

RENNER, E; SALAM, M.H.A. Basic principles. In: RENNER, E.; SALAM, M.H.A. **Application of ultrafiltration in the industry**. London: Elsevier Science, 1991. cap. 2, p. 7-29.

RIJN C.J.M. **Nano and Micro Engineered Membrane Technology**. Amsterdam: Elsevier, v. 10, 2004. 398 p.

ROCHA JÚNIOR, W. F. **Análise do agronegócio da erva-mate com o enfoque da nova economia institucional e o uso da matriz estrutural prospectiva.** 2001. 133 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

ROCHA JÚNIOR, W. F.; MILOCA, L. M. **Sistema Agroindustrial Ervateiro: Perspectivas e Debates.** Cascavel: Coluna do Saber, 2007. 206 p.

ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane process in the dairy industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 12-19, 1995.

RUCKER, N. G.A. **Mercomate: cooperação na competitividade.** Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. Departamento de Economia Rural, 1996. 48 p.

RUCKER, N. G. A.; MACCARI JR., A.; ROCHA JR., W. F. **Agronegócio da erva-mate no estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas para 2003**, 2003. SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DO PARANÁ. Disponível em: < <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/ervamate.pdf> >. Acesso em: 19 jan. 2010.

SANCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Science Food Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANT-HILARIE, A. **Viagem pela comarca de Curitiba.** Curitiba: Fundação Cultural, 1995. 159 p.

SCHÄFER, A.I.; FANE, A.G; WAITE, T.D. **Nanofiltration – Principles and Applications.** Great Britain: Elsevier, 2006. 318 p.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; TOURNIER, H.; MARIA PRIETO, J.; SPEGAZZINI, E.; DEBENEDETTI, S.; MOSCA, S. M. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*: A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Research International**, v. 42, n. 10, p. 1403-1409, 2009.

SCHNEIDER, R.P.; TSUTIYA, M.T. **Membranas Filtrantes para o Tratamento de Água, Esgoto e Água de Reuso**. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2001. 234p.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* a. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SIGMA-ALDRICH. **Products**. 2008. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 22 de jan. de 2010.

SILVA, A. F. **Preparação, caracterização e aplicação de membranas de poli (fluoreto de vinilideno) para a redução de cor de efluente têxtil modelo**. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 289-326.

SUTHERLAND, K. Developments in filtration: What is nanofiltration? **Filtration & Separation**, v. 45, n. 8, p. 32-35, 2008.

STRATHMANN, H. Synthetic membranes and their preparation. In: PORTER, M.C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. New Jersey: Noyes Publications, 1990. p. 1-60.

STREIT, N. M.; HECKTHEUER, L. H. R.; CANTO, M. W.; MALLMANN, C. A.; STRECK, L.; PARODI, T. V.; CANTERLE, L. P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560-564, 2007.

THUONG, P. T.; SU, N. D.; NGOC, T. M.; HUNG, T. M.; DANG, N. H.; THUAN, N. D.; BAE, K.; OH, W. K. Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 139-145, 2009.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of Black and Black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.

VADI, P.K.; RIZDI, S.S.H. Experimental evaluation of a uniform transmembrane pressure crossflow microfiltration unit for the concentration of micellar casein from skim milk. **Journal of Membrane Science**, v.189, p. 69-82, 2001.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguayensis* Saint Hilarie e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate.** 1995, 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VINCZE, I.; BANYAI-STEFANOVITS, E.; VATAI, G. Concentration of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice with membrane separation. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 455-460, 2007.

XU, L.; WANG, S. The Ginkgo biloba extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 305-313, 2005.

WISEMAN, S.; WATERHOUSE, A.; KORVER, O. The health effects of tea and tea components: Opportunities for standardizing research methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, p. 387-412, 2001.

**CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO
AQUOSA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) UTILIZANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Resultados preliminares deste trabalho foram apresentados na forma de resumo no 8º *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, novembro de 2009 (ANEXO A e B).

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO
AQUOSA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FOLHAS DE
ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) UTILIZANDO A
METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

RESUMO

Nas folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) estão presentes uma grande quantidade de compostos com propriedades biológicas conhecidas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração aquosa de compostos fenólicos de folhas de erva-mate. As folhas foram caracterizadas quimicamente e utilizadas como matéria-prima para extração. A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada para determinar as condições ótimas de extração de compostos fenólicos. As variáveis independentes envolvidas na otimização foram pH (2,3 – 5,7), temperatura de extração (61,5 – 103,5 °C) e tempo de extração (0,6 – 12,4 min). O efeito da combinação destas variáveis sobre o teor de compostos fenólicos totais foi investigado. A caracterização química revelou que as folhas de erva-mate apresentam grande quantidade de fibras insolúveis e de minerais, destacando-se o Ca e o K. Os resultados da otimização mostraram que as variáveis pH e temperatura de extração influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o teor de compostos fenólicos totais extraídos. A condição satisfatória estabelecida para a extração desses compostos das folhas de erva-mate foi determinada em pH de 6,0, temperatura de extração de 100 °C e tempo de 3 minutos.

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., compostos fenólicos, otimização, metodologia de superfície de resposta.

OPTIMIZATION OF AQUEOUS EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) LEAVES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

ABSTRACT

In erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) leaves are present a large amount of compounds with known biological properties. The objective was to optimize the aqueous extraction of phenolic compounds from erva-mate leaves. The leaves were characterized chemically and used as raw material for extraction. The Response Surface Methodology (RSM) was used to determine the optimum conditions for extraction of phenolic compounds. The variables involved in the optimization were pH (2.3 – 5.7), extraction temperature (61.5 to 103.5 °C) and extraction time (0.6 – 12.4 min). The combined effect of these variables on the total phenolic content was investigated. The chemical characterization showed that the erva-mate leaves have a great amount of insoluble fiber and minerals, especially Ca and K. Optimization results showed that pH and temperature of extraction influenced significantly ($p < 0.05$) the total phenolic content extracted. The satisfactory condition established for the extraction of these compounds from the erva-mate leaves was determined at pH 6.0, extraction temperature 100 °C and time of three minutes.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., phenolic compounds, optimization, response surface methodology.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St Hil.) é uma planta originária da América do Sul, ocorrendo naturalmente na Argentina, Paraguai e Brasil. Na região Sul do Brasil, a erva-mate possui uma grande importância econômica e cultural. É nessa região que ocorre o maior consumo dessa planta (CARVALHO, 1994). As partes aéreas, principalmente as folhas, são usadas no preparo das bebidas típicas (chimarrão, tererê e chá mate) (BASTOS et al., 2007). Diversos compostos biologicamente ativos são extraídos das folhas do mate, como as metilxantinas, saponinas, minerais, vitaminas, clorofila e principalmente os fenólicos (HECK; MEJIA, 2007).

Os fenólicos são os compostos mais abundantes encontrados no mate, principalmente os derivados do ácido cafeico (ácido clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e os flavonóides (rutina, quercetina, kaempferol) (BASTOS et al, 2007; HECK; MEJIA, 2007). Algumas das propriedades biológicas do extrato aquoso das folhas do mate são atribuídas à presença desses compostos, como a atividade antioxidante (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), a inibição da proliferação de células cancerígenas (MEJIA et al., 2005) e a proteção do LDL contra a peroxidação lipídica (SILVA et al., 2008). Devido a essas e outras propriedades biológicas conhecidas, o extrato aquoso das folhas do mate vem sendo utilizado como fonte natural de compostos bioativos em formulações alimentícias (RACANICCI; DANIELSEN; SKIBSTED, 2008), cosméticas e farmacêuticas (HECK; MEJIA, 2007).

A eficiência da extração dos compostos fenólicos de materiais de plantas é influenciada por diversos parâmetros, como temperatura, tempo, solvente, pH, entre outros, e seus efeitos podem ser independentes ou podem interagir entre si (NACZK; SHAHIDI, 2004; SILVA; ROGEZ; LARONDELLE, 2007; MYLONAKI et al., 2008). Diferentes sistemas de solventes são usados para extração de compostos fenólicos, como por exemplo, metanol, etanol e acetona (NACZK; SHAHIDI, 2004). Apesar destes solventes serem usados com o objetivo de obter a máxima extração dos constituintes bioativos, o uso dos mesmos impede a aplicação em produtos alimentícios, e geram produtos ambientalmente tóxicos (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003; SONAGLIO et al., 2007). Muitos estudos de erva-mate empregam condições diversas para extração de compostos fenólicos (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; MEJIA, 2004; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; DELADINO et al., 2008), no entanto, a otimização dessas condições não foram relatadas para a extração aquosa desses compostos das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

O objetivo desse estudo foi aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para otimizar as condições de extração aquosa (temperatura, tempo e pH) das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., a fim de obter as melhores condições na extração de compostos fenólicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As folhas foram coletadas em agosto de 2008, no município de Catanduvas, localizado na região centro-oeste do estado de Santa Catarina, latitude sul 27°, longitude oeste 51,40° e altitude de 800 m, sendo a empresa fornecedora do material a MATERVA, produtora de erva-mate para chimarrão. As amostras foram coletadas de árvores com aproximadamente 25 anos, plantadas em ervais adensados, em área de sub-bosque de floresta de araucárias (Figura 1). A coleta das amostras ocorreu de forma aleatória.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para as análises foi usado o padrão ácido gálico (Sigma Chemical Co., MO, EUA). O reagente *Folin-Ciocalteu* foi obtido da Sigma Chemical Co. (MO, EUA), o carbonato de sódio, o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico foram obtidos da Vetec Química (MO, EUA).



Figura 1 - Sistema de cultivo adensado em área de sub-bosque de floresta de araucárias, Catanduvas – SC, agosto de 2008.

Fonte: acervo do autor (2008).

2.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 45 °C por 24 h (LAGOS, 2006) e trituradas em moinho de martelo marca INBRAS-ERIEZ, modelo 15A. As amostras secas foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno de alta densidade (embaladora a vácuo Selovac, modelo 200 B) e mantidas em freezer a -18 °C até o momento dos experimentos.

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS

As fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico. A umidade foi determinada em estufa a 105 ± 2 °C e a fração cinzas em forno mufla a 550 ± 1 °C. Para determinar o teor protéico (valor de nitrogênio x 6,25) foi utilizada a dosagem de nitrogênio total, pelo método Kjeldahl. A partir do método de Soxhlet foi determinada a fração lipídica. Todas as análises seguiram as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists*, métodos 991.43; 925.09; 923.03; 920.87 e 920.85, respectivamente (AOAC, 2005).

Os teores de minerais foram determinados segundo o método 985.35 descrito pela AOAC (2005). A concentração de cálcio (Ca), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e potássio (K) das folhas foi determinada a partir da digestão ácida das cinzas, seguida pela análise em espectrofotometria de absorção atômica (Perkin-Elmer Analyst 300). Na determinação de Ca, óxido de lantânio foi adicionado na solução ácida e na solução padrão (1 % m/v) para evitar possíveis interferências causadas por íons fosfatos. Potássio (K) foi determinado por fotometria de chama (B262 Micronal). Curvas de calibração com padrões de grau analítico foram utilizadas para quantificação dos minerais ($r^2 = 0,99$).

2.4 PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. foram preparados com 3 g de folhas trituradas em 100 mL de água ultrapura, de acordo com Turkmen, Sari e Velioglu (2006), com pequenas modificações. O pH (2,3 a 5,7) dos extratos foi ajustado adicionando as soluções de ácido clorídrico 0,1 N ou hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando um pHmetro da marca Quimis, modelo Q-400A. Diferentes temperaturas (61,5 à 103,5 °C) e tempos (0,6 a 12,4 minutos) foram usados na extração, com auxílio de um banho-maria (B. Braun Biotech, 18 BU). Para filtração dos extratos foi utilizado filtro de papel de 12,5 cm de diâmetro e com porosidade de 25 µm, com auxílio de uma bomba a vácuo (Primatec, 131). Os volumes dos extratos foram completados para 100 mL, garantindo assim um extrato de 3 % (m/v).

2.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada para determinar a condição ótima para a extração de compostos fenólicos das folhas de erva-mate. Para isso foi empregado o Delineamento Composto Central (CCD) com três variáveis independentes (BOX; WILSON, 1951; TEÓFILO; FERREIRA, 2006). As variáveis utilizadas foram: pH, temperatura (T) e tempo (t) de extração, que foram selecionadas a partir de estudos prévios (BIXBY et

al., 2005; MEJIA et al., 2005; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; NEGRÃO et al., 2009a; NEGRÃO et al., 2009b). O planejamento experimental foi composto por dezoito ensaios, sendo oito fatoriais (combinação dos níveis -1 e 1), seis axiais (combinação dos níveis -1,682 e 1,682) e quatro repetições no ponto central, conforme a Tabela 1. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória a fim de minimizar o efeito da variabilidade inesperada nas respostas observadas devido aos erros sistemáticos. A resposta (variável dependente) foi o teor de compostos fenólicos totais dos extratos aquosos de erva-mate.

Tabela 1 – Níveis codificados das variáveis independentes empregados na extração dos fenólicos totais utilizando o Delineamento Composto Central (CCD).

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,682	-1	0	1	1,682
pH	2,3	3,0	4,0	5,0	5,7
Temperatura (°C)	61,5	70,0	82,5	95,0	103,5
Tempo (min)	0,6	3,0	6,5	10,0	12,4

2.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu*

descrito por Singleton, Joseph e Rossi (1965), com algumas modificações. As diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas pelo reagente *Folin-Ciocalteu* e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio. A absorbância da cor resultante foi avaliada a 765 nm após 60 minutos, em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800). A curva de calibração foi construída utilizando o ácido gálico nas concentrações entre 0,01 e 0,15 mg/mL ($y = 10,371 x - 0,0162$; $r^2 = 0,99$). O teor de CFT foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de amostra.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes de regressão dos efeitos lineares, quadráticos e de interação foram determinados por Regressão Linear Múltipla (MLR). O teste *t*-Student foi usado para avaliar a significância estatística dos coeficientes de regressão derivados do modelo. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo. Os coeficientes de regressão foram usados para gerar a superfície de resposta. Todos os cálculos e gráficos do planejamento experimental foram feitos com o auxílio do Microsoft Excel 2003, de acordo com Teófilo e Ferreira (2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS

A composição química das folhas de erva-mate está apresentada na Tabela 2.

O teor de umidade está de acordo com os valores encontrados por Valduga (1995), que corresponde a uma faixa de 5,36 a 9,80 %. Enquanto que o teor do resíduo mineral fixo (cinzas) foi de 7,08 %, resultado similar ao encontrado por Esmelindro et al. (2002) (6,90 %). Jacques et al. (2007) observaram um aumento na quantidade de cinzas totais em plantas de erva-mate cultivadas à sombra, como é o caso das plantas utilizadas para este estudo, o que reflete em um maior conteúdo de minerais. Os conteúdos de proteína e lipídio estão de acordo com os valores encontrados para folhas nos estudos de Pagliosa (2009), 14,38 % e 7,12 %, respectivamente.

A quantidade de minerais presentes nas folhas é extremamente influenciada pela luminosidade, idade da planta, além do solo e de fatores climáticos (REISSMANN et al., 1994; RACHWAL et al., 2002; REISSMANN; CARNEIRO, 2004). Os minerais identificados em maior concentração nas amostras foram Ca e K. Elementos também identificados em maior quantidade em pesquisas anteriores realizadas com folhas de erva-mate (PAGLIOSA, 2009); produtos comerciais à base de erva-mate (GIULIAN et al., 2009) e no pó do mate (VIEIRA et al., 2008). Em relação aos valores encontrados para K (1789,70

mg/100g), Mn (97,77 mg/100g) e Mg (568,71 mg/100g), foi observado uma semelhança com os valores obtidos por Ducat e Quináia (2004), que avaliaram esses compostos em folhas de erva-mate cultivadas. Esses autores obtiveram valores de 1068,5; 109,7 e 611,1 mg/100g para o K, Mn e Mg, respectivamente. Os teores de Zn (3,67 mg/100g) e Ca (foram 881,19 mg/100g) estão de acordo com os resultados obtidos por Pagliosa (2009) para folhas de erva-mate, 3,01 e 750,04 mg/100g, respectivamente. Os minerais identificados na folha de erva-mate são de suma importância para o bom funcionamento metabólico de organismos vivos (HEINRICHS; MALAVOLTA, 2001), podendo considerá-la uma boa fonte alimentar desses nutrientes.

Tabela 2 - Composição química da folha da *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (base seca).

Componentes

Umidade (g/100g)	9,07 ± 0,21
Resíduo mineral fixo (g/100g)	7,08 ± 0,04
Proteína (nitrogênio total)* (g/100g)	15,93 ± 0,05
Lipídio (g/100g)	8,13 ± 0,21
Potássio (mg/100g)	1789,70 ± 0,00
Zinco (mg/100g)	3,67 ± 0,00
Manganês (mg/100g)	97,77 ± 0,00
Cálcio (mg/100g)	881,19 ± 0,00
Magnésio (mg/100g)	568,71 ± 0,00
Fibra alimentar insolúvel (g/100g)	35,07 ± 1,19
Fibra alimentar solúvel (g/100g)	8,07 ± 0,89
Fibra alimentar total (g/100g)	43,16 ± 0,35

* Valor de nitrogênio x 6,25.

Tem sido reconhecido que a ingestão de fibra alimentar sustenta uma variedade de benefícios à saúde, como por exemplo, contribuição para regular a função intestinal, atenuação do nível sérico de colesterol e glicose e na proteção contra o câncer de cólon (CHANDALIA et al., 2000; MARLETT; McBURNEY; SLAVIN, 2002; MEHTA, 2005).

A concentração de fibra alimentar total, bem como de fibra solúvel e insolúvel foram similares aos resultados encontrados por

Pagliosa (2009), que obteve para folhas de erva-mate “*in natura*” resultados de 39,81; 7,18 e 32,62 %, respectivamente. Barboza (2006) obteve resultados semelhantes de fibra alimentar total para erva-mate cancheada (47,79 a 53,29 %). No entanto, o valor de fibra alimentar total (43,16 %) foi superior aos valores de erva-mate comercial (21,89 %) e de folhas de erva-mate “*in natura*” (21,10 %) encontrados por Esmelindro et al. (2002).

Nas folhas em estudo foi observado considerável proporção de fibra alimentar insolúvel (81 %) em relação à fibra alimentar total, estando de acordo com a composição das folhas de árvores em geral (REDDY; YANG, 2005).

3.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As respostas obtidas para o teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) dos 18 ensaios estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados do teor de compostos fenólicos totais do extrato aquoso de folhas de erva-mate baseados no pH, temperatura e tempo de extração.

Ensaio ^a	Níveis			Resposta
	pH	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	CFT ^b
1	-1 (3,0)	-1 (70,0)	-1 (3,0)	1,183
2	-1 (3,0)	-1 (70,0)	1 (10)	1,478
3	-1 (3,0)	1 (95,0)	-1 (3,0)	1,767
4	-1 (3,0)	1 (95,0)	1 (10)	1,561
5	1 (5,0)	-1 (70,0)	-1 (3,0)	1,712
6	1 (5,0)	-1 (70,0)	1 (10)	1,712
7	1 (5,0)	1 (95,0)	-1 (3,0)	1,915
8	1 (5,0)	1 (95,0)	1 (10)	1,875
9	-1,682 (2,3)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,373
10	1,682 (5,7)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,865
11	0 (4,0)	-1,682 (61,5)	0 (6,5)	1,522
12	0 (4,0)	1,682 (103,5)	0 (6,5)	1,810
13	0 (4,0)	0 (82,5)	-1,682(0,6)	1,653
14	0 (4,0)	0 (82,5)	1,682(12,4)	1,664
15	0 (4,0)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,360
16	0 (4,0)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,409
17	0 (4,0)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,595
18	0 (4,0)	0 (82,5)	0 (6,5)	1,672

^a Os ensaios foram conduzidos em ordem aleatória.

^b mg de EAG/ml (EAG: Equivalentes de Ácido Gálico).

Os coeficientes de regressão múltipla estão apresentados na Tabela 4 e o gráfico de probabilidade normal está apresentado na Figura 2. Devido à alta precisão dos resultados do experimento, o erro puro foi pequeno, e o erro padrão foi calculado pelo quadrado médio residual.

Tabela 4 – Coeficientes de regressão, Erro padrão e valores de p para o modelo de extração aquosa dos compostos fenólicos totais das folhas de erva-mate.

Parâmetros	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t	p
Média	1,509 ^a	0,056	27,13	0,0000
bpH	0,150 ^a	0,060	4,99	0,0011
bTemp	0,111 ^a	0,060	3,69	0,0062
btempo	0,005	0,060	0,16	0,8738
b ² pH	0,038	0,063	1,20	0,2641
b ² Temp	0,054	0,063	1,73	0,1216
b ² tempo	0,052	0,063	1,65	0,1382
bpH x bTemp	-0,038	0,079	-0,96	0,3674
bTemp x btempo	-0,016	0,079	-0,41	0,6930
btempo x bpH	-0,068	0,079	-1,72	0,1243

^a Efeitos significativos. Nível de significância para o teste- t : 0,05, Graus de liberdade: 8.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, somente o efeito linear do pH e da temperatura de extração foram significativos no teste t -Student em nível de significância de 0,05, em relação aos níveis estudados. O tempo de extração utilizados neste estudo não teve

influência significativa na extração dos compostos fenólicos. O gráfico da probabilidade normal apresentado na Figura 2 valida a influência significativa dos efeitos lineares das variáveis pH e temperatura de extração. Esses resultados indicam que o aumento do pH e/ou da temperatura de extração provoca um aumento no teor de compostos fenólicos totais.

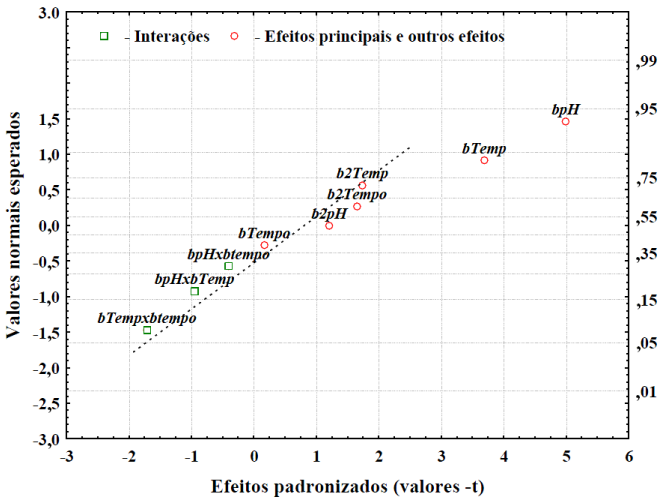


Figura 2 – Gráfico de probabilidade das interações e dos principais efeitos obtidos pelo delineamento composto central.

Diferentes resultados são encontrados na literatura em relação às variáveis que exercem influência na extração de compostos fenólicos de folhas. De acordo com Mylonaki et al. (2008), a extração de compostos fenólicos de folhas de oliveira foi favorecida pelo tempo,

porém o aumento do pH foi desfavorável para a extração desses compostos, diferente dos resultados encontrados neste trabalho. Silva, Rogez e Larondele (2007) obtiveram resultados similares com o aumento da temperatura de extração de folhas de ingá (*Inga edulis*). Entretanto, estes autores utilizaram álcool etílico como agente extrator.

O modelo construído para o teor de compostos fenólicos totais, obtido a partir dos coeficientes de regressão, está mostrado na Equação 1:

$$\text{CFT (mg de EAG/ml)} = 1,51 + 0,15 \text{ pH} + 0,11 \text{ Temperatura} \quad (\text{Equação 1})$$

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos na análise de variância (ANOVA). A regressão foi significativa, mas a falta de ajuste não foi significativa e o erro puro foi baixo. Uma indicação gráfica da qualidade do modelo pode ser visualizada nas Figuras 3 A e 3 B. A Figura 3 A mostra a relação linear dos valores preditos *versus* valores observados para o teor de CFT, com coeficiente de correlação de 0,9. O gráfico dos resíduos *versus* valores observados (Figura 3 B) mostra que a suposição de aleatoriedade dos resíduos foram satisfeitas.

Tabela 5 - Análise de variância dos teores de compostos fenólicos totais extraídos das folhas de erva-mate.

Varição	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	p
Regressão	0,591 ^a	9	0,066	5,291	0,0141
Resíduo	0,099	8	0,012		
Falta de ajuste	0,033	5	0,007	0,300	0,8858
Erro puro	0,066	3	0,022		
Total	0,690	17			

^a Coeficientes significativos para o teste-*t*: 0,05.

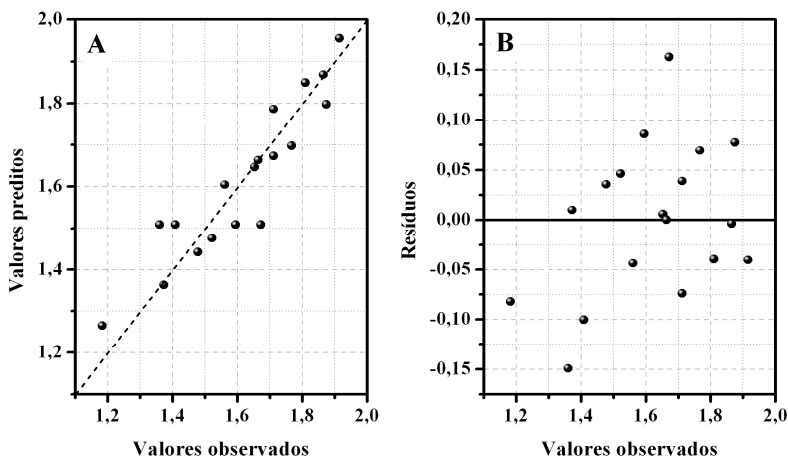


Figura 3 – (A) Gráfico do teor de compostos fenólicos totais predito *versus* observado dos extratos das folhas de erva-mate. (B) Gráfico dos resíduos *versus* o teor de compostos fenólicos totais observado nos extratos.

O gráfico de contorno construído a partir do modelo de regressão (Figura 4) mostra que existe um aumento linear na extração dos compostos fenólicos com simultâneos aumento no pH e na temperatura de extração.

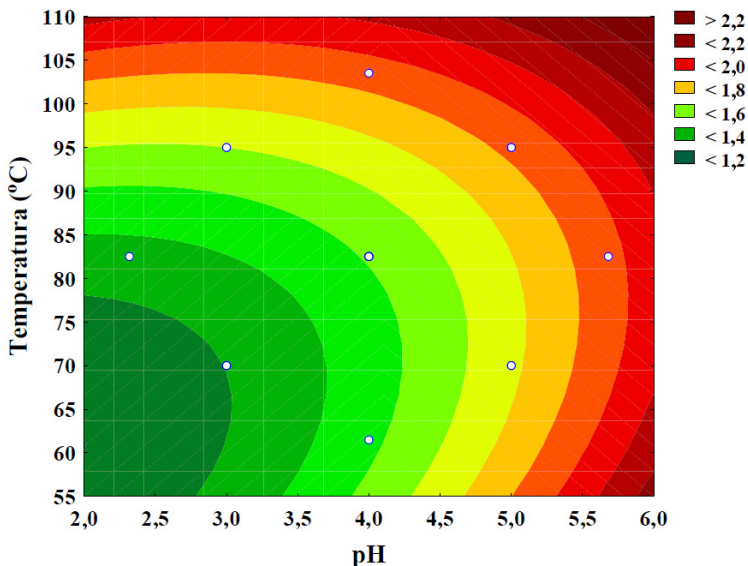


Figura 4 – Gráfico de contorno para os teores de compostos fenólicos totais do extrato aquoso das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. em função do pH e da temperatura de extração (°C).

De acordo com Cacace e Mazza (2003) altas temperaturas aumentam a solubilidade de compostos fenólicos, permitindo um maior rendimento de extração. Em relação ao pH, o extrato aquoso de erva-mate apresentou características que se adequaram a afirmação de Sonaglio et al. (2007), os quais sugerem que a extração dos fenólicos

deve ser realizada em pH próximos da neutralidade, pois desta forma a oxidação e a formação de isômeros são evitadas. Com base no modelo construído (Equação 1), uma possível condição para maximizar a extração dos compostos fenólicos das folhas de erva-mate pode ser o uso de temperatura de 100 °C, pH de 6,0 e tempo de 3 minutos, atingindo aproximadamente 1,94 mg de EAG/ml de compostos fenólicos totais (dentro dos níveis estudados).

4 CONCLUSÃO

A folha de erva-mate é um alimento rico em minerais, fibras e principalmente compostos fenólicos. Os resultados obtidos a partir da aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) indicam que as variáveis independentes, pH e temperatura de extração, podem ser consideradas estatisticamente significativas com o objetivo de aumentar a extração aquosa de compostos fenólicos totais das folhas de erva-mate. Através da Metodologia de Superfície de Resposta foi obtida a maximização da extração de compostos fenólicos de folhas de erva-mate, em temperatura de 100 °C, pH de 6,0 e tempo de 3 minutos. Este estudo pode ser útil para um processo industrial, não apenas para a obtenção de maiores teores de compostos fenólicos, como também para reduzir gastos energéticos, considerando que uma redução no tempo de extração não afetaria significativamente os teores desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists**. 18th Edition. Maryland, USA, 2005.

BARBOZA, L., M., V. **Desenvolvimento de bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) adicionada de fibra alimentar**. 2006, 260 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L.. *Yerba maté*: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007.

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

BOX, G. E. P; WILSON, K.B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1-45, 1951.

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

CACACE, J. E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenol compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379-389, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e uso da Madeira.** Curitiba: EMBRAPA/CNPFlorestas, 1994. 641 p.

CHANDALIA, M.; GARG, A.; LUTJOHANN, D.; BERGMANN, K. V.; GRUNDY, S. M. BRINKLEY, L. J. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 11, p. 1392 – 1398, 2000.

DELADINO, L.; ANBINDER, P. S.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 126-134, 2008.

DUCAT, G.; QUINÁIA, S. P., Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região Centro-Oeste do Estado do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 6, p. 31–42, 2004.

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

GIULIAN, R.; SANTOS, C. E. I. dos.; SHUBEITA, S. de M.; SILVA, L.; M.; da.; YONEAMA, M. L.; DIAS, J. F. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 74–80, 2009.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal o Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 781-785, 2001.

JACQUES, R.A.; SANTOS, J.G.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMARÃO, E. B. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 354–359, 2007.

LAGOS, J. B. **Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae**. 2006, 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, p. 419-427, 2005.

MARLETT, J. A.; McBURNEY, M. I.; SLAVIN, S. L. Position of the American Dietetic Association Health Implications of Dietary Fiber. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 10, p. 993 – 1000, 2002.

MEHTA, R. S. Dietary fiber benefits. **Cereal Foods World**, v. 50, n.2, p.66-71, 2005.

MEJIA, E. G.; YOUNG, S. S.; RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

MYLONAKI, S.; KLIASSOS, E.; MAKKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 977-985, 2008.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NEGRÃO, A. N.; AMORIM, A. L.; ZANOTTA, L.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E.; TEÓFILO, R. F.; AMBONI, R. D. M. C. Otimização de parâmetros experimentais visando a obtenção de extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) com maior teor de fenólicos totais. In: 8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009a.

NEGRÃO, A. N.; PRUDÊNCIO, A. P. A.; ZANOTTA, L.; DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; AMBONI, R. D. M. C. Avaliação da estabilidade dos compostos fenólicos totais em extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) em diferentes pHs. In: 8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. **Anais...** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009b.

PAGLIOSA, C. M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)** 2009. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

RACANICCI, A. M. C.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 255-260, 2008.

RACHWAL, M., F., G.; COELHO, G., C.; DEDECEK, R., A.; CURCIO, G., R.; SCHENKEL, E., P. **Influência da Luminosidade sobre a Produção de Massa Foliar e Teores de Macronutrientes, Fenóis Totais, Cafeína e Teobromina em Folhas de Erva-mate**, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Comunicado técnico 81. Colombo, Paraná, 5 p. 2002.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 21–27, 2005.

REISSMANN, C. B.; CARNEIRO, C. Crescimento e composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de calagem. **Revista Floresta**, v. 34, p. 381–386, 2004.

REISSMANN, C. B.; ROCHA, da H. O.; KOEHLER, C. W.; LIMA, R. de.; CALDAS, S.; HILDEBRAND, E. E. Bio-elementos em folhas e hastes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) sobre cambisolos na região de Mandirituba-PR. **Revista Floresta**, v. 22, p. 49–55, 1994.

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

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.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-149, 1965.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 289-326.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Cioltou methods. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 99, p. 835-842, 2006.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguayensis* Saint Hilarie e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. 1995, 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; MARASCHIN, M.; SIMAS, K. N. de.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; AMBONI, R. D. M. C.; PEDRO L. M. BARRETO, P. L. B.; AMANTE, E. R. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4637–4642, 2008.

CAPÍTULO 3 - CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) POR NANOFILTRAÇÃO

Parte deste trabalho foi apresentado na forma de resumo no 8º *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, novembro de 2009 (ANEXO C).

Artigo submetido à publicação na *Food Chemistry* (ISSN: 0308-8146) (ANEXO D).

CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) POR NANOFILTRAÇÃO

RESUMO

O extrato aquoso das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) contém uma grande quantidade de compostos químicos, entre eles os compostos fenólicos, que são os principais compostos responsáveis pela sua atividade antioxidante. A Nanofiltração (NF) é um processo de separação por membranas que tem sido aplicado para concentrar compostos de baixa massa molar de extratos naturais, como por exemplo, os compostos fenólicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a o teor de compostos fenólicos do extrato aquoso de erva-mate concentrado pelo processo de NF. O conteúdo total de compostos fenólicos presentes no concentrado e no permeado coletados em diferentes valores de Fator de Redução Volumétrico (FRV) foram distintos do encontrado no extrato aquoso inicial. A concentração dos compostos fenólicos alcançou uma porcentagem de retenção (*R*) máxima de 99,51 % quando o FRV foi 4,0. Neste FRV de melhor desempenho, foi avaliada a atividade antioxidante dos extratos pelo valor de EC50, que apresentou a seguinte sequência: concentrado > extrato aquoso inicial > permeado. Conforme resultados obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi verificado uma *R* de 95 e 100 % para os compostos ácido gálico e ácido 4,5-dicafeoilquinico, respectivamente, da mesma maneira que para o ácido 3,4-dihidroxibenzóico e o ácido clorogênico a *R* alcançada foi de 99 e 98 %, respectivamente. Esses resultados mostram que o processo de NF foi capaz de concentrar os compostos fenólicos do extrato aquoso das folhas de erva-mate.

Palavras-chaves: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., compostos fenólicos, atividade antioxidante, concentração, nanofiltração.

**CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN
AQUEOUS EXTRACT OF ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.
Hil.) THROUGH NANOFILTRATION**

ABSTRACT

Aqueous extract of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) leaves contains a large amount of chemical compounds, including phenolic compounds, which are the main compounds responsible for antioxidant activity. The Nanofiltration (NF) is a membrane separation process that has been applied to concentrate compounds of low molecular weight from natural extracts, such as phenolic compounds. The aim of this study was to evaluate the behavior of the aqueous extract from erva-mate concentration during the NF process. The total phenolic content present in the concentrate and the permeate collected at different values of Volumetric Reduction Factor (VRF) were different from the initial aqueous extract. The concentration of phenolic compounds achieved a retention percentage (*R*) of 99.51 %, when the VRF was 4.0. In this VRF with the better performance, the antioxidant activity was evaluated by EC50 value, which showed the following sequence: concentrate > initial aqueous extract > permeate. According to results obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the *R* of the gallic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid were of 95 and 100 %, respectively, in the same manner as for the 3,4-dihydroxybenzoic acid and chlorogenic acid reached a *R* of 99 and 98 %, respectively. These results show that the process of NF was able to concentrate phenolic compounds from aqueous extract of erva-mate leaves.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., phenolic compounds, antioxidant activity, concentration, nanofiltration.

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é encontrada naturalmente no Paraguai, no Brasil e na Argentina, países da América do Sul, considerados como os únicos produtores mundiais de erva-mate (RESENDE et al., 2000). O consumo dessa planta é feito, principalmente, sob a forma de bebidas típicas, como chimarrão, tererê e chá mate (BASTOS et al., 2007). As folhas são a base do preparo dessas bebidas e são nessas partes da planta que estão presentes uma grande quantidade de compostos fenólicos (HECK; MEJIA, 2007).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas folhas de erva-mate são os derivados do ácido cafeíco (ácido clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e os flavonóides (rutina, quercetina, kaempferol) (BASTOS et al., 2007; HECK; MEJIA, 2007). O extrato aquoso das folhas de erva-mate tem sido muito utilizado como fonte de compostos fenólicos em produtos alimentícios, como carne de frango (RACANICCI; DANIELSEN; SKIBSTED, 2008) e salame de carne suína (CAMPOS et al., 2007). Esses compostos são responsáveis por diversas atividades biológicas atribuídas ao mate, como a atividade antioxidante (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007), a inibição da proliferação de células cancerígenas (MEJIA et al., 2010), a oxidação da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL) em sistema *in vivo* (GUGLIUCCI, 1996) e a atividade anti-diabética (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005).

A concentração de extratos naturais é tradicionalmente realizada com aplicação de altas temperaturas por um longo período de tempo, o que promove alterações nutricionais significativas para o produto, principalmente quando se trata da presença de compostos instáveis, como os fenólicos (LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005; SONAGLIO et al., 2007). O processo de concentração por membranas tem sido amplamente utilizado com a finalidade de manter a alta qualidade desses compostos, considerando que utiliza baixas temperaturas e mínimo consumo energético. Esse processo é baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas através de membranas (XU; WANG, 2005; RAMARETHINAM; ANITHA; LATHA, 2006).

A Nanofiltração (NF) é um processo de separação por membranas compreendido entre a Ultrafiltração (UF) e a Osmose Reversa (OR), com massa molecular de corte entre 100 e 1000 daltons (g/mol), região onde se encontram os principais fenólicos do mate (HECK; MEJIA, 2007; STREIT et al. 2007).

A NF tem sido muito utilizada para a concentração de compostos fenólicos presentes em extratos de produtos naturais. Díaz-Reinoso et al. (2009) e Mello, Petrus e Hubinger (2010) utilizaram a nanofiltração para concentrar esses compostos a partir do extrato aquoso de bagaço de uva fermentado e extrato de própolis, respectivamente. No entanto, não existem dados na literatura de concentração de extrato aquoso de erva-mate utilizando a nanofiltração.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de erva-mate concentrado pelo processo de NF.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As folhas de erva-mate foram coletadas no município de Catanduvas, localizado na região centro-oeste do estado de Santa Catarina, em agosto de 2008. A empresa fornecedora do material foi a MATERVA, produtora de erva-mate para chimarrão. As amostras foram coletadas aleatoriamente de 30 árvores de *Ilex paraguariensis* A. St Hil. com aproximadamente 25 anos de idade, plantadas em ervais adensados, em área de sub-bosque de floresta de araucárias. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico ou cromatográfico.

Para as análises foram usados os padrões de ácido 4,5 dicafeoilquínico (Chengdy Biopurify Phytochemicals Ltd, China), ácido gálico, ácido 3,4 dihidroxibenzóico e ácido clorogênico (Sigma Chemical Co., MO, EUA). O reagente *Folin-Ciocalteu* foi obtido da Sigma Chemical Co. (MO, EUA), o carbonato de sódio, o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico foram obtidos da Vetec Química (MO, EUA).

2.2 PREPARO DAS FOLHAS

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 45 °C por 24 h (LAGOS, 2006) e trituradas em moinho de martelo marca

INBRAS-ERIEZ, modelo 15A. As amostras secas foram embaladas a vácuo em sacos de polietileno de alta densidade (embaladora a vácuo Selovac, modelo 200 B) e mantidas em freezer a -18 °C até o momento dos experimentos.

2.3 PREPARO DO EXTRATO

O preparo do extrato de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil foi realizado com as condições que maximizaram a extração dos compostos fenólicos das folhas. O extrato foi preparado a partir de 3 g de folhas trituradas em 100 mL de água ultrapura, empregando uma temperatura de 100 °C, pH 6,0 e tempo de 3 minutos. O pH do extrato foi ajustado adicionando as soluções de ácido clorídrico 0,1 N ou hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando um pHmetro da marca Quimis, modelo Q-400A. Para filtração do extrato foi utilizado filtro de papel de 12,5 cm de diâmetro com porosidade de 25 µm, com auxílio de uma bomba a vácuo (Primatec, 131). O volume do extrato foi completado para 100 mL, garantindo assim um extrato de 3 % (m/v).

2.4 NANOFILTRAÇÃO (NF)

A concentração do extrato aquoso foi realizada em um sistema de filtração tangencial utilizando uma unidade piloto, esquematizada na Figura 1, equipada com membrana de nanofiltração orgânica de polifluoreto de vinilideno, de configuração de espiral da marca Osmonics (modelo HL2521TF, Desal), com ponto molar de corte de 150 a 300 g/mol, área filtrante útil de 0,6 m² e 98 % de rejeição de MgSO₄ observada em um teste realizado a temperatura de 25 °C e 690 Kpa. A representação da unidade utilizada encontra-se no Apêndice A. Os parâmetros de operação controlados durante o processo de NF foram temperatura de 24 ± 1 °C, adequada para preservar as propriedades do extrato, e pressão transmembrana de 3 bar. Durante a nanofiltração, o fluxo de permeado (J) foi medido a cada 5 minutos e calculado de acordo com a Equação 1:

$$J = \frac{V_p}{t \times A_p} \quad (\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}) \quad (\text{Equação 1})$$

onde o V_p (L) é o volume do permeado coletado durante a o intervalo de tempo t (h) e A_p (m²) é a área de permeação da membrana.

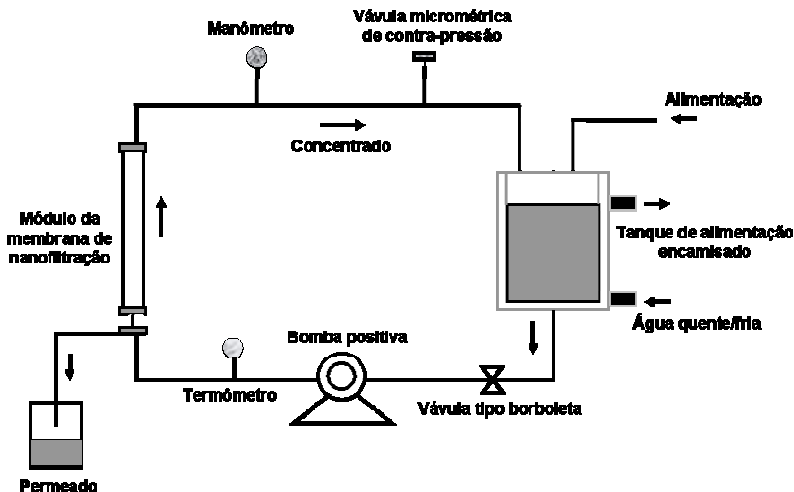


Figura 1 – Esquema simplificado da unidade piloto de nanofiltração utilizada nos experimentos.

Fonte: Arquivo pessoal do autor (2010).

A concentração foi realizada a partir da reciclagem do concentrado e remoção do permeado. O Fator de Redução Volumétrico (FRV) foi calculado de acordo com a relação entre o volume de alimentação inicial (L) e o volume do concentrado (L) no tempo de operação considerado. Amostras de permeado e concentrado foram coletadas em diferentes tempos de operação, relacionados a seis valores de FRV (1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0).

A qualidade do processo de filtração foi avaliada de acordo com o teor de compostos fenólicos totais presente no permeado e no concentrado. A eficiência do processo foi medida através da porcentagem de retenção, a qual demonstra a capacidade da membrana

em reter compostos de interesse. A porcentagem de retenção foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$R (\%) = (1 - C_p / C_c) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

onde o C_p (mg EAG/mL) é a concentração dos compostos fenólicos totais no permeado e o C_c (mg EAG/mL) equivale a concentração dos compostos fenólicos totais no concentrado.

O FRV com melhor desempenho em relação ao teor de compostos fenólicos totais foi selecionado e os seus respectivos permeado e concentrado foram avaliados quanto a atividade antioxidante e ao perfil de compostos fenólicos.

Após cada etapa do processamento, foi feita a limpeza da membrana com hidróxido de sódio a 0,25 % a fim de eliminar os materiais da superfície da membrana e do interior de seus poros e restabelecer o fluxo de permeado inicial. A solução de limpeza foi utilizada no sistema em circuito fechado, após uma pré-lavagem com água filtrada, por cerca de 10 minutos e posteriormente procedeu-se a um enxágue do equipamento com água destilada.

2.5 ANÁLISE QUÍMICA

2.5.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu* descrito por Singleton, Joseph e Rossi (1965), com algumas modificações. As diluições apropriadas dos extratos foram oxidadas pelo reagente *Folin-Ciocalteu* e a reação foi neutralizada com carbonato de sódio. A absorbância da cor resultante foi avaliada a 765 nm após 60 minutos, em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800). A curva de calibração foi construída utilizando o ácido gálico nas concentrações entre 0,01 e 0,15 mg/mL ($y = 10,371 x - 0,0162$; $r^2 = 0,99$). O teor de CFT foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de amostra.

2.5.2 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com metodologia adaptada de Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), utilizando o radical estável DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila). As leituras de absorbância foram monitoradas a cada 10 minutos em comprimento de onda 515 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1800), onde foi observada a redução da absorbância até sua

estabilização. Os resultados foram avaliados a partir da curva padrão de DPPH ($y = 37,721 x + 0,0009$; $r^2 = 0,99$) e definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH (Concentração Eficiente = EC50 (mL da amostra/g de DPPH)).

2.5.3 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Para a quantificação dos compostos fenólicos, as amostras foram submetidas à extração em fase sólida, utilizando coluna (cartucho) SPE – C18, 40 μm , 500 mg/6m previamente condicionada com 6 mL de acetonitrila:ácido fórmico, 6 mL de hexano e 9 mL de metanol. A partir de 1,5 mL da amostra eluída, adicionou-se 9 mL de metanol. A fração foi coletada e concentrada em N_2 antes de ser analisada.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10, Japão) equipado com coluna de fase reversa (Shim-pack C₁₈, 4,6 mm \varnothing x 250 mm comprimento), na temperatura de 40 °C, e detector UV-Vis (Shimadzu SPD 10A, $\lambda = 280$ nm). Os analitos foram eluídos isocraticamente, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, utilizando como fase móvel uma mistura de água: ácido acético: *n*-butanol (350:1:10, v/v/v). O volume injetado foi de 10 μL / amostra previamente preparada.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção dos padrões com os das amostras. A quantificação foi baseada nas curvas de calibração, construídas para cada composto identificado no material em estudo. As curvas apresentaram boa linearidade e seguiram a Lei de Beer, apresentando coeficiente de determinação, r^2 , de 0,99.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o *software* STATISTICA versão 6.0 (2001) (StatSoft Inc., EUA) e expressos pelo valor da média \pm desvio padrão de três determinações ($n = 3$). Foram aplicados a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tuckey para identificar diferenças significativas entre o extrato aquoso inicial e as amostras de diferentes valores de FRV. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 NANOFILTRAÇÃO (NF)

A Nanofiltração (NF) do extrato aquoso das folhas de erva-mate obteve um fluxo de permeado médio de $4,53 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Como era esperado, verificou-se um declínio de J com o tempo (Figura 2), devido à camada de polarização por concentração e o *fouling* da membrana. Esse comportamento foi similar ao observado por Diaz-Reinoso et al. (2009), que empregaram pressão de 2 e 4 bar, e temperatura de 20 ± 4 °C no processo de NF de extrato aquoso de bagaço de uva fermentado. Xu e Wang (2005) utilizaram a nanofiltração para concentrar flavonóides de extrato aquoso de *Ginkgo biloba* e obtiveram um fluxo de permeado entre $5,9$ e $9,5 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, empregando pressão de 12 bar e temperatura de 35 a 40 °C. Durante a concentração de suco de maçã e de pêra pelo processo de NF, Warczok et al. (2004) utilizaram uma pressão de 12 bar e temperatura de 30 °C, conseguindo valores de J entre 1,8 e $5,9 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ e 1,4 e $5,6 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, respectivamente. No processo de concentração do extrato aquoso das folhas de erva-mate foi utilizada pressão mais baixa do que os processos citados na literatura. Porém, essa condição pode ser considerada como viável, principalmente devido ao baixo consumo energético exigido para gerar pressões mais baixas. A pressão empregada não é característica de nanofiltração, mas foi suficiente para realizar o procedimento de concentração.

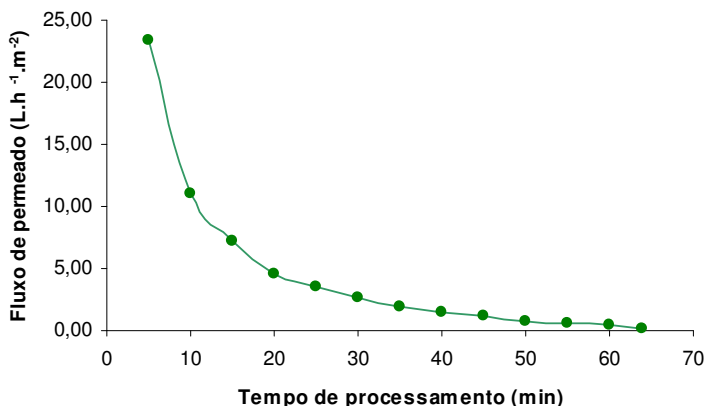


Figura 2 – Comportamento do fluxo de permeado (J) durante o processo de NF do extrato aquoso de folhas de erva-mate.

Conforme observado na Tabela 1, o teor de compostos fenólicos totais no permeado e no concentrado coletados nos diferentes valores de FRV foram significativamente diferentes do resultado encontrado para o extrato inicial. A concentração dos compostos fenólicos aumentou conforme o aumento do FRV, alcançando a maior porcentagem de retenção (R) de 99,51 %, quando o FRV foi de 4,0. Esse resultado foi melhor do que os verificados por Todisco, Tallarico e Gupta (2002) e por Cassano et al. (2009) na concentração de compostos fenólicos de chá preto e suco de tangerina por ultrafiltração, obtendo R de 92,0 % e 83,6 %, respectivamente. Enquanto que Mello, Petrus e Hubinger (2010) alcançaram uma R de 84,0 % na concentração de compostos fenólicos do extrato aquoso do própolis, empregando a nanofiltração. Variações nos valores de R são comumente encontradas, pois de acordo com Al-

Malack e Anderson (1997) modificações nos parâmetros operacionais do equipamento como pressão, temperatura, tempo do processo, tipo e porosidade de membrana, matéria-prima, FRV, apresentam diferentes comportamentos em um processo de separação por membranas.

O mecanismo responsável pela alta retenção de compostos fenólicos pela membrana de nanofiltração é atribuído principalmente ao tamanho molecular, porém a densidade de elétrons no anel aromático desses compostos também é uma propriedade que pode estar envolvida nessa retenção. Segundo Bandini e Mazzoni (2005) a maioria das membranas de NF mostram um comportamento anfótero, que é determinado pela natureza dos grupos funcionais presentes na camada ativa da membrana, sendo sua carga de superfície fortemente dependente do pH. López-Munoz et al. (2009) observaram um aumento significativo na retenção de compostos fenólicos com o aumento do pH. Esse efeito pode ser explicado pela repulsão eletrostática que ocorre entre a superfície da membrana, que se torna carregada por cargas negativas, e os compostos fenólicos, que se encontram dissociados nesse meio.

Como o maior teor de CFT ($p < 0,05$) foi obtido no FRV 4,0 (Tabela 1) e segundo Bravo, Goya e Lecumberri, (2007) e Heck, Schmalko e Mejia (2008) esses compostos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da erva-mate, os permeado e concentrado obtidos nesta condição foram verificados quanto à atividade antioxidante.

Tabela 1 – Resultados do teor de Compostos Fenólicos Totais (CFT) (media \pm desvio padrão) do extrato aquoso inicial, do concentrado e do permeado obtidos pelo processo de nanofiltração do extrato aquoso das folhas de erva-mate.

	CFT (mg EAG* /mL)
Extrato aquoso inicial	2,497 ^{fA} \pm 0,002
Concentrado	
FRV 1,5	3,548 \pm 0,023 ^e
FRV 2,0	4,688 \pm 0,051 ^d
FRV 2,5	4,752 \pm 0,040 ^d
FRV 3,0	6,192 \pm 0,035 ^c
FRV 3,5	6,565 \pm 0,012 ^b
FRV 4,0	8,378 \pm 0,058 ^a
Permeado	
FRV 1,5	0,013 \pm 0,001 ^E
FRV 2,0	0,018 \pm 0,001 ^D
FRV 2,5	0,019 \pm 0,001 ^D
FRV 3,0	0,029 \pm 0,006 ^C
FRV 3,5	0,034 \pm 0,006 ^{BC}
FRV 4,0	0,041 \pm 0,003 ^B

^{a-f} Letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o extrato aquoso inicial e os concentrados coletados em seis diferentes valores de FRV.

^{A-E} Letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre o extrato aquoso inicial e os permeados coletados em seis diferentes valores de FRV.

*EAG= Equivalentes de Ácido Gálico.

O valor de EC50 está inversamente relacionado a atividade antioxidante, ou seja, quanto menor o valor de EC50 maior será a atividade antioxidante da amostra avaliada (BRAND-WILLIAN; CUVELIER; BERSET, 1995). Conforme os resultados apresentados na Tabela 2, a sequência do potencial antioxidante obtido foi: concentrado > extrato aquoso inicial > permeado. Como já bem conhecida e descrita na literatura, a atividade antioxidante da erva-mate está relacionada a diversas atividades biológicas, entre elas a redução da oxidação da lipoproteína no plasma humano, a diminuição do risco de doenças neurodegenerativas e a prevenção de câncer de cólon (MILIOLI et al., 2007; SILVA et al., 2008; MEJIA et al., 2010). No entanto, a atividade antioxidante do concentrado apresentou um resultado aproximadamente 30 vezes maior que o extrato aquoso de erva-mate inicial, o que pode tornar o concentrado um atrativo nas pesquisas relacionadas a esse efeito. Porém, a capacidade antioxidante não depende apenas do conteúdo total de compostos fenólicos, mas também dos tipos de compostos fenólicos. Considerando isso, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada para identificar os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso inicial, no concentrado e no permeado.

Tabela 2 - Compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) e valor de EC_{50} (mL/g de DPPH) do extrato de erva-mate inicial, do concentrado e do permeado correspondentes ao FRV 4,0.

	Extrato aquoso inicial	Concentrado	Permeado
EC₅₀ (mL/g de DPPH)	129,79 \pm 4,12	4,19 \pm 1,23	3023,60 \pm 82,66
Composto fenólicos			
Ácido Gálico	60,93 \pm 3,38	277,31 \pm 1,59	14,69 \pm 0,08
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	48,95 \pm 1,57	417,44 \pm 12,50	2,58 \pm 0,19
Ácido Clorogênico	1991,38 \pm 4,32	9997,92 \pm 178,44	207,76 \pm 3,10
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	484,75 \pm 0,79	2391,97 \pm 44,34	ND

Valores médios \pm Desvio Padrão (n = 3).

^a tempo de retenção (min)

^b Massa Molar (g/mol)

ND: Não Detectado

A Tabela 2 e o Apêndice B mostram os resultados da análise quantitativa dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso inicial, no concentrado e no permeado obtidos no processo de NF com FRV 4,0. Pode ser observado que 24 % e 10 % do ácido gálico e ácido clorogênico, respectivamente presentes no extrato aquoso inicial, foram perdidos para o permeado. O ácido 3,4-dihidroxibenzóico teve uma perda de apenas 5 %, enquanto que o ácido 4,5-dicafeoilquínico não foi perdido para o permeado. Apesar dessas perdas para o permeado, os resultados demonstram uma alta porcentagem de retenção desses compostos e sugerem que o processo de nanofiltração é apropriado para concentrar compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate.

Todos os compostos fenólicos avaliados foram encontrados em grande quantidade no concentrado (Tabela 2). O ácido gálico obteve uma porcentagem de retenção (*R*) de 95 %, enquanto que o ácido 3,4-dihidroxibenzóico e o ácido clorogênico alcançaram uma *R* de 99 e 98 %, respectivamente. Dentre os compostos fenólicos identificados no concentrado obtido no FRV 4,0, o ácido clorogênico e o ácido 4,5-dicafeoilquínico, compostos derivados do ácido cafeíco, presentes em maior concentração na erva-mate (PAGLIOSA et al., 2010), apresentam elevada capacidade antioxidante, conforme demonstrado nos estudos *in vitro* de Heo et al. (2007) e Iwai et al. (2004), respectivamente. Além desta propriedade, outros efeitos biológicos têm sido atribuídos ao ácido clorogênico, como por exemplo, propriedade anti-inflamatória (TATEFUJI et al., 1996) e benefícios para o metabolismo lipídico (CHO et al., 2010). Mishima et al. (2005) creditaram ao ácido 4,5-dicafeoilquínico a supressão do crescimento de células tumorais. O ácido gálico, também presente no concentrado, apresenta atividade antioxidante e neuroprotetora (LU et al., 2006), inibe o crescimento de microrganismos (KANG et al., 2008) e possui atividade anti-viral (KRATZ et al., 2008). O ácido 3,4-dihidroxibenzóico também apresenta atividade antioxidante (LITOS et al., 2007), atividade anticarcinogênica e mutagênica (LIU et al., 2002; KRAJKA-KUŻNIAK; SZAEFER; BAER-DUBOWSKA, 2004).

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a NF pode ser considerada uma alternativa viável para a concentração do extrato aquosos da erva-mate, uma vez que a membrana reteve a maioria dos compostos fenólicos, com consequente aumento da atividade antioxidante. O uso desta tecnologia poderia aumentar a utilização desse extrato, sendo possível ampliar a investigação do mesmo, como também desenvolver novos produtos com propriedades funcionais, principalmente enfatizando a atividade antioxidante. Em comparação com outros métodos de concentração, no processo de separação por membranas o produto é submetido a baixas temperaturas, reduzindo o consumo de energia e preservando as propriedades funcionais dos compostos de interesse, neste caso, os fenólicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato aquoso de folhas de erva-mate com alto teor de compostos fenólicos foi obtido a partir das condições otimizadas de temperatura, pH e tempo de extração. Nessas condições, apenas a temperatura e o pH de extração foram significativos para a obtenção desse extrato. O extrato otimizado foi submetido à membrana de nanofiltração para concentração dos compostos fenólicos das folhas da erva-mate. Os teores de compostos fenólicos totais no concentrado e no permeado coletados em diferentes valores de Fator de Redução Volumétrica (FRV) foram distintos do encontrado no extrato aquoso inicial. A concentração dos compostos fenólicos aumentou com o aumento do valor do FRV, alcançando um maior valor no FRV 4,0. Também foi observado que neste FRV de melhor desempenho o concentrado obteve uma maior atividade antioxidante quando comparado ao extrato aquoso inicial e ao permeado. A partir dos resultados de CLAE obtidos para o concentrado e para o permeado no FRV 4,0 foi observado uma grande diversidade e quantidade de compostos fenólicos concentrados por essa membrana, entre eles o ácido gálico, o ácido 4,5-dicafeoilquínico, o ácido 3,4-dihidroxibenzóico e o ácido clorogênico.

Estas características tendem a conferir a este extrato concentrado grande potencial de uso em indústrias alimentícias, principalmente ao considerar a alta atividade antioxidante. A substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais é uma preocupação cada vez maior, considerando que essas substâncias

sintéticas apresentam uma segurança altamente questionada. Neste caso, o extrato de erva-mate concentrado poderia ser estudado como um possível substituto dessas substâncias.

Porém muitos estudos ainda poderão ser realizados com esse extrato de erva-mate concentrado, como a caracterização de outros compostos de grande importância na erva-mate, por exemplo, metilxantinas e saponinas, como também a avaliação de testes *in vivo* para verificar possíveis benefícios para a saúde humana e presença ou não de toxicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MALACK, M. H.; ANDERSON, G. K. Crossflow microfiltration with dynamic membranes. **Water Research**, v. 31, n.8, p. 1969-1979, 1997.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L.. *Yerba maté*: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2007.

BANDINI, S.; MAZZONI, C. Modelling the amphoteric behavior of polyamide nanofiltration membranes. **Desalination**. v. 184, n.1-3, 2005.

BRAND-WILLIAN, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

CAMPOS, R. M. L.; HIERRO, E.; ORDONEZ, J. A.; BERTOL, T. M.; TERRA, N. N.; HOZ, L. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. **Food Chemistry**, v.103, p. 1159-1167, 2007.

CASSANO, A.; TASSELLI, F.; CONIDI, C.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of Clementine mandarin juice by hollow fibre membranes. **Desalination**, v. 241, p. 302-308, 2009.

CHO, A.; JEON, S.; KIM, M.; YEO, J.; SEO, K.; CHOI M. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 3, p. 937-943, 2010.

DÍAZ-REINOSO, B., MOURE, A., DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 4, p. 587-593, 2009.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.224, p. 338-344, 1996.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal o Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

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

HEO, H. J.; KIM, Y. J.; CHUNG, D.; KIM, D. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. **Food Chemistry**, v. 104, p. 87–92, 2007.

IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y.; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4893–4898, 2004.

KANG, M.S.; OH, J.S.; KANG, I.C.; HONG, S.J.; CHOI, C.H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **Journal of Microbiology**. v. 46, p. 744–750, 2008.

KRAJKA-KUŹNIAK, V.; SZAEFER, H.; BAER-DUBOWSKA, W. Modulation of 3-methylcholanthrene-induced rat hepatic and renal cytochrome P450 and phase II enzymes by plant phenols: protocatechuic and tannic acids. **Toxicology Letters**, v. 152, n. 2, p. 117-126, 2004.

KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; TRYBALA, E.; BERGSTROM, T.; BARARDI, C.R.; SIMOES, C.M. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, p. 903-907, 2008.

LAGOS, J. B. **Estudo comparativo da composição química das folhas e cascas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae.** 2006, 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005.

LITOS, C.; ALETRAS, V.; HATZIPANAYIOTI, D.; KAMARIOTAKI, M.; LYMBEROPOULOU-KARALIOTA, A. CV and NMR study on the reaction of Mo(VI) with 3,4-dihydroxybenzoic acid and ascorbic acid in aqueous solution. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 7, p. 2321-2330, 2007.

LIU, C. L.; WANG, J. M.; CHU, C.Y; CHENG, M. T.; TSENG, T. H. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 635-41, 2002.

LÓPEZ-MUNOZ, M.; SOTTO, A.; ARSUAGA, J. M.; BRUGGEN, B. V. Influence of membranes, solute and solution properties on the retention of phenolic compounds in aqueous solution by nanofiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 1, 2009.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P. S.; TANG, H; ZHAO, B. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 4, p. 263–274, 2006.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76 p. 419-427, 2005.

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

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 533-539, 2010.

MILIOLI, E. M.; COLOGNI, P.; SANTOS, C. C.; MARCOS, T. D.; YUNE, V. M.; FERNANDES, M. S.; SCHOENFELDER, T.; COSTA-CAMPOS L. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St. Hilarie (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 771-776, 2007.

MISHIMA, S.; INOH, Y.; NARITA, Y.; OHTA, S.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 20, p. 5814–5818, 2005.

PAGLIOSA, C. M.; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

RACANICCI, A. M. C.; DANIELSEN, B.; SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 227, p. 255-260, 2008.

RAMARETHINAM, S.; ANITHA, G. R.; LATHA, K. Standardization of conditions for effective clarification and concentration of green tea extract by membrane filtration. **Journal of Scientific e Industrial Research**, v. 65, p. 821-825, 2006.

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. S. C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela EMBRAPA – resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa florestas, circular técnica 43, 2000. 67 p.

SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAOKA, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, p. 973-979, 2008.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG/Editora da UFSC, 2007. p. 289-326.

STREIT, N. M.; HECKTHEUER, L. H. R.; CANTO, M. W.; MALLMANN, C. A.; STRECK, L.; PARODI, T. V.; CANTERLE, L. P. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560-564, 2007.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, p. 966–970, 1996.

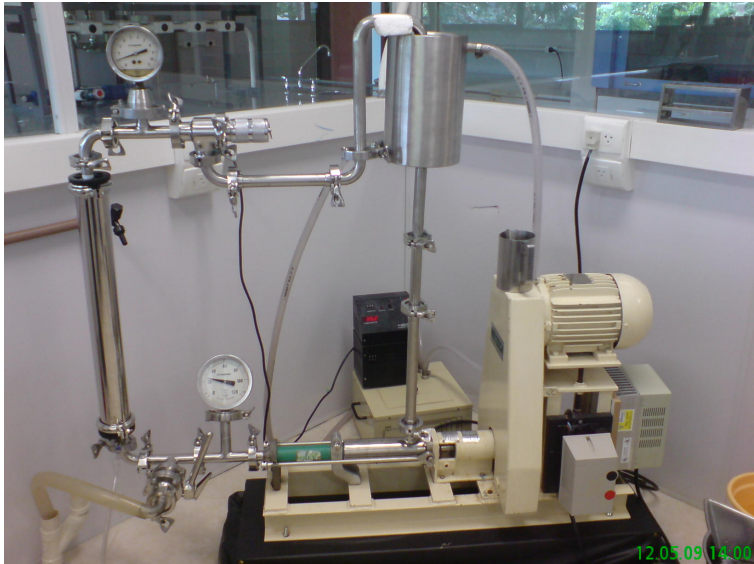
TODISCO, S.; TALLARICO, P.; GUPTA, B. B. Mass transfer and polyphenols retention in the clarification of bael tea with ceramic membranes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 255-262, 2002.

XU, L.; WANG, S. The *Ginkgo biloba* extract concentrated by nanofiltration. **Desalination**, v. 184, p. 305-313, 2005.

WARCZOK, J.; FERRANDO, M.; LÓPEZ, F.; GÜELL, C. Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 63-70, 2004.

APÊNDICE A

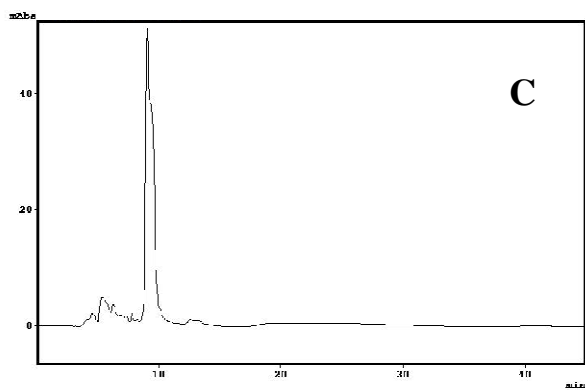
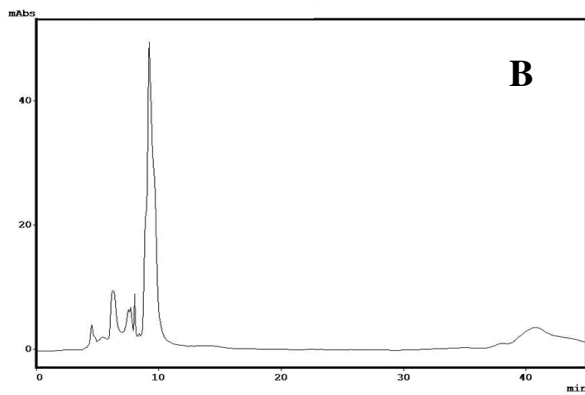
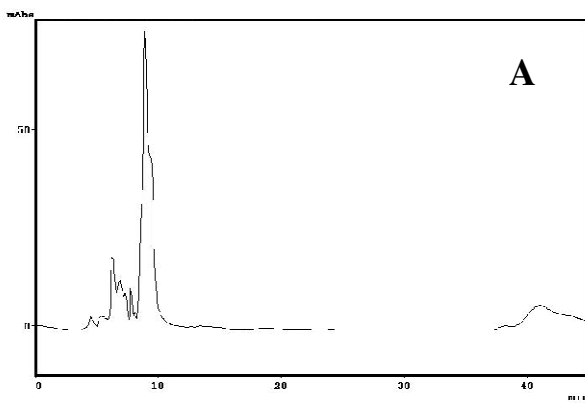
**Representação da unidade de membrana utilizado no processo de
concentração do extrato aquoso de erva-mate**



Local: Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos/Laboratório de Processos de Separação com Membranas, Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus.

APÊNDICE B

Perfil cromatográfico do extrato aquoso inicial (A) (diluição de 1:10 v/v), do concentrado (B) (diluição de 1:100 v/v) e do permeado (C) (diluição de 1:2 v/v)

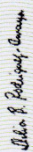



ANEXO A - Resultados preliminares do Capítulo 2 apresentados na forma de resumo no *8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, novembro de 2009.

Certificado

8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos
Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas

Certificamos que o trabalho intitulado "OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS VISANDO À OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS ST. HILL) COM MAIOR TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS" de autoria NEGRÃO, A. N.; AMORIM, A. L.; ZANOTTA, L.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; TEÓFILO, R. F.; AMBONI, R. D. M. C; foi apresentado em forma de poster no 8º SLACA - *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas"*, realizado de 08 a 11 de Novembro de 2009, Campinas – São Paulo – Brasil.


Dna. Déia Rodriguez Amaya
Coordenadora do Comitê de Programação


Dna. Gabriela Alves de Macedo
Coordenadora do Comitê Científico




Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento



Realização:

Campinas, 08 de novembro de 2009.



**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS VISANDO À
OBTENÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (*Ilex
paraguariensis* St. Hil.) COM MAIOR TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS**

NEGRÃO, A. N. (1); AMORIM, A. L (1); ZANOTTA, L.(1); PRUDÊNCIO, E. S. (1); AMANTE, E. (1); TEÓFILO, R. F. (2); AMBONI, R. D. M. C. (1)

(1) Departamento de Ciência de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC. (2) Departamento de Química - Universidade Federal de Viçosa - Viçosa - MG. Email: nananegrao@gmail.com

Amplamente utilizada pelos habitantes do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma das espécies arbóreas naturais de maior importância econômica nessas regiões. Dentre a variedade de compostos potencialmente ativos presentes nas folhas da erva-mate, os fenólicos têm se destacado pela sua diversidade e quantidade, sendo responsáveis pela prevenção e inibição da proliferação do câncer, propriedades já conhecidas da erva-mate. O objetivo deste estudo foi otimizar a extração aquosa dos compostos fenólicos presentes nas folhas de erva-mate, aplicando a metodologia de superfície de resposta. Para isso foi utilizado um planejamento composto central com três variáveis independentes, concentração de folha seca (1,5 - 5 %), temperatura (70 - 95 °C) e tempo de extração (3 - 10 min.), e uma variável dependente, teor de compostos fenólicos, determinado através da metodologia de reativo de *Folin-Ciocalteu*. O delineamento experimental foi composto por 18 ensaios, sendo oito fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), cinco axiais (variáveis no nível $\pm \alpha$ e zero) e cinco repetições no ponto central (três variáveis no nível zero). Os pontos axiais (α) foram codificados por -1,682 e +1,682. A análise estatística do experimento indicou que apenas a concentração de folhas teve efeito significativo na extração dos compostos fenólicos, sugerindo que quanto maior a concentração de folhas, maior o teor de fenólicos totais para o extrato aquoso das folhas de erva-mate.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/SEBRAE e Materva® pela disponibilização da erva-mate.

Palavras Chave: erva-mate, compostos fenólicos, metodologia de superfície de resposta

ANEXO B - Resultados preliminares do Capítulo 2 apresentados na forma de resumo no *8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, novembro de 2009.

Certificado

8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos
Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas

Certificamos que o trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSISST. HILL) EM DIFERENTES PHS"** de autoria **NEGRÃO, A. N.; PRUDÊNCIO, A. P. A.; ZANOTTA, L.; MURAKAMI, F. S.; DEBON, J.; PRUDÊNCIO, E. S.; MARASCHIN, M.; AMBONI, R. D. M. C.**; foi apresentado em forma de poster no **8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas"**, realizado de 08 a 11 de Novembro de 2009, Campinas – São Paulo – Brasil.

Julia P. Rodriguez Amaya

Dra. Dêlia Rodriguez Amaya
Coordenadora do Comitê de Programação

Gráziela

Dra. Gráziela Alves de Macedo
Coordenadora do Comitê Científico



Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento



Realização:

Campinas, 08 de novembro de 2009.



**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS
TOTAIS EM EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*
St. Hil.) EM DIFERENTES pHs**

NEGRÃO, A. N. (1); PRUDÊNCIO, A. P. A. (1); ZANOTTA, L.(1); DEBON,
J. (2); PRUDÊNCIO, E. S. (1); MARASCHIN, M. (3); AMBONI, R. D. M. C.

(1)

(1) Departamento de Ciência de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias -
Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC. (2)
Departamento de Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de
Santa Catarina - Florianópolis - SC. (3) Departamento de Fitotecnia -
Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC. Email:
nananegrao@gmail.com

A *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-mate. A folha é a parte da planta mais utilizada na produção de alimentos, nela se encontram altas concentrações de compostos potencialmente ativos, como os fenólicos. A extração desses compostos fenólicos se mostra eficiente pelo método de infusão, porém a estabilidade em meio aquoso pode ser influenciado pelo pH, considerando que em condições ácidas a conservação é favorecida. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos no extrato aquoso de folhas de erva-mate em diferentes pHs. A partir da folha de erva-mate, devidamente higienizada e desidratada, preparou-se o extrato aquoso (3 % m/v), empregando na extração temperatura de 100 °C por 3 minutos. Após, o extrato foi filtrado e os pHs corrigidos com HCl 0,1 N para 4 e 6. Os extratos permaneceram protegido da luminosidade em temperatura de ± 4 °C e foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais nos tempos pré-estabelecidos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A partir dos teores obtidos, os dados foram linearizados para obtenção de gráficos a fim de definir a cinética de degradação dos compostos fenólicos. Os resultados indicaram que o modelo que melhor descreveu a cinética de degradação dos compostos no extrato em pH 4 foi de zero ordem, apresentando $k = 0,130064 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 384$ horas. Para o extrato em pH 6 observou-se cinética de segunda ordem, com $k = 1,16473 \times 10^{-5} \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 858$ horas. Através dos parâmetros cinéticos avaliados sugere-se que os compostos fenólicos do extrato aquoso de erva-mate em pH 6 foram mais estáveis, comparados ao extrato em pH 4.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/SEBRAE e Materva® pela disponibilização da erva-mate.

Palavras Chave: erva-mate, compostos fenólicos, estabilidade

ANEXO C - Parte do Capítulo 3 apresentado na forma de resumo no 8º *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, novembro de 2009.

Certificado


8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos
Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas

Certificamos que o trabalho intitulado "O EMPREGO DA NANOFILTRAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (ILEX PARAGUARIENSIS ST. HILL)" de autoria NEGRÃO, A. N.; ZANOTTA, L.; ROSA, D.; DEBON, J.; PETRUS, J. C.C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C; foi apresentado em forma de poster no 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", realizado de 08 a 11 de Novembro de 2009, Campinas – São Paulo – Brasil.


Dra. Déia Rodriguez Amaya
Coordenadora do Comitê de Programação


Dra. Gabriela Alves de Macedo
Coordenadora do Comitê Científico


Dra. Gláucia Maria PaStore
Presidente do Evento


Realização:


Realização:


Realização:

Campinas, 08 de novembro de 2009.



O EMPREGO DA NANOFILTRAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO EXTRATO AQUOSO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

NEGRÃO, A. N. (1); ZANOTTA, L.(1); PETRUS, J. C.C. (2); PRUDÊNCIO, E. S. (1); MARASCHIN, M. (3); AMANTE, E. (1); AMBONI, R. D. M. C. (1)
(1) Departamento de Ciência de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC. (2) Departamento de Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC. (3) Departamento de Fitotecnia - Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC.

A nanofiltração (NF), tecnologia de membranas, tem despertado o interesse na concentração de compostos ativos, pois apresenta vantagens sob o processo de concentração tradicional, como a utilização de baixas temperaturas. A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), planta de ocorrência natural restrita na América do Sul, apresenta grandes quantidades de compostos potencialmente ativos em suas folhas, principalmente os fenólicos, substâncias com propriedade antioxidante conhecida. Estes compostos são sensíveis as altas temperaturas, sendo, portanto instáveis diante das tecnologias tradicionais de concentração. O objetivo desse trabalho foi avaliar a porcentagem de recuperação (% Rc) de compostos fenólicos totais do extrato da folha de erva-mate presentes no concentrado, líquido que não ultrapassa a membrana, obtido pela NF. A partir da folha de erva-mate, devidamente higienizada e desidratada, preparou-se o extrato aquoso (3 % m/v), empregando na extração temperatura de 100 °C por 3 minutos. O extrato foi submetido à NF em uma unidade piloto empregando membrana de configuração espiral com diâmetro médio dos poros entre 150 e 300g/mol (Osmonics®) e área filtrante útil de 0,6m², sendo mantidos durante o processo pressão de 3 bar e temperatura de 24 ± 1 °C. O Fator de Redução Volumétrico (FRV) e o Fluxo do Permeado (J) médio foram iguais a 3 e 0,94 L/h.m², respectivamente. O teor de compostos fenólicos no extrato e concentrado foi obtido através da metodologia de reativo de *Folin-Ciocalteu*. Este teor foi 2,506 mg GAE/mL no extrato, enquanto no concentrado igual a 4,688 mg GAE/mL, resultando em uma % Rc de compostos fenólicos de 187,4 %. Desta forma pode-se concluir que a NF é uma alternativa viável e recomendada na concentração de compostos fenólicos totais do extrato das folhas de erva-mate.

Agradecimentos: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/SEBRAE e Materva® pela disponibilização da erva-mate.

Palavras Chave: erva-mate, nanofiltração, compostos fenólicos.

ANEXO D - Artigo “Concentration of phenolic compounds in aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through nanofiltration” submetido à publicação na *Food Chemistry* (ISSN: 0308-8146).

----- Mensagem encaminhada de esubmissionsupport@elsevier.com -----

Data: 22 Apr 2010 20:10:02 +0100

De: Food Chemistry <esubmissionsupport@elsevier.com>

Endereço para Resposta (Reply-To): Food Chemistry <esubmissionsupport@elsevier.com>

Assunto: Submission Confirmation

Para: ramboni@cca.ufsc.br

Dear Dra. Renata Dias de M. C. Amboni,

Your submission entitled "Concentration of phenolic compounds in aqueous extract of mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil) through nanofiltration" has been received by Food Chemistry

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodchem/>.

Your username is: ramboni

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/foodchem/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Food Chemistry

----- Final da mensagem encaminhada -----