

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE
CULTIVO SOBRE OS TEORES DE COMPOSTOS DE
INTERESSE PRESENTES NOS EXTRATOS DE ERVA-MATE
(*Ilex paraguariensis*) OBTIDOS POR CO₂ A ALTAS PRESSÕES**

JONATHAN DOS SANTOS GIRARDI

**FLORIANÓPOLIS - SC
2010**

JONATHAN DOS SANTOS GIRARDI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE
CULTIVO SOBRE OS TEORES DE COMPOSTOS DE
INTERESSE PRESENTES NOS EXTRATOS DE ERVA-MATE
(*Ilex paraguariensis*) OBTIDOS POR CO₂ A ALTAS PRESSÕES**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Engenharia
Química em cumprimento parcial aos
requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Ariovaldo Bolzan

**FLORIANÓPOLIS - SC
2010**

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE OS TEORES DE COMPOSTOS DE INTERESSE PRESENTES NOS EXTRATOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) OBTIDOS POR CO₂ A ALTAS PRESSÕES

JONATHAN DOS SANTOS GIRARDI

Dissertação de mestrado submetida à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan
Orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do CPENQ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Mara Gabriela Novy Quadri

Prof. Dr. Marcelo Lanza

Prof. Dr. Ricardo A. F. Machado

Florianópolis, 17 de dezembro de 2010.

*Aos meus pais Hamilton e Edgeley,
minhas manas Tizi e Kahu,
e todos da família,
sem os quais não conseguiria.
Kitty....não esqueci e vc!*

AGRADECIMENTOS

Aos professores do curso de Pós Graduação em Engenharia Química da UFSC, em especial ao Prof. Ariovaldo pela orientação, amizade e incentivo.

À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim, RS, e aos Prof. Cláudio Dariva e José Vladimir de Oliveira por ceder as instalações para obtenção de parte dos dados experimentais.

À Prof^ª. Rosângela Jacques e à colega Ângela Esmelindro pela amizade e auxílio na condução das análises químicas dos extratos.

A todos os colegas e amigos que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

Réserve brut Chandon!!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO II	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Erva-mate	5
2.1.1 Características botânicas	6
2.1.2 Distribuição geográfica	7
2.1.3 Mercado e aspectos químicos gerais	8
2.1.4 Compostos de interesse industrial	12
2.1.4.1 Cafeína	12
2.1.4.2 Teobromina	14
2.1.4.3 Fitol	15
2.1.4.4 Esqualeno	16
2.1.4.5 Vitamina E	17
2.1.4.6 Estigmasterol.....	19
2.2 Uso de altas pressões na extração de produtos naturais	20
2.2.1 Fluido supercrítico (FSC).....	21
2.2.2 Processo de extração a altas pressões.....	22
2.2.3 Seleção do solvente	24
2.3 Modelagem matemática das extrações a altas pressões.....	25
2.3.1 Modelo de Sovová (2005).....	27
CAPÍTULO III	29

3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Materiais e reagentes.....	29
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Experimento de campo.....	29
3.2.2 Preparo das amostras.....	30
3.2.3 Determinação das massas específicas	30
3.2.3.1 Determinação da massa específica aparente	30
3.2.3.2 Determinação da massa específica real.....	31
3.2.4 Determinação da porosidade do leito.....	31
3.2.5 Determinação da densidade do solvente	31
3.2.6 Determinação da solubilidade experimental	31
3.2.7 Condições experimentais propostas	32
3.2.7.1 Proposta para análise das condições de operação de extração da erva-mate com CO ₂ pressurizado.....	32
3.2.7.2 Proposta para análise das variáveis de cultivo da erva-mate.....	33
3.2.8 Procedimento de extrações com CO ₂ pressurizado.....	33
3.2.9 Caracterização química dos extratos.....	34
3.2.10 Modelagem dos dados experimentais	35
CAPÍTULO IV	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
4.1 Massas específicas aparente e real	39
4.2 Porosidade do leito.....	39
4.3 Extrações de erva-mate com CO ₂ a altas pressões.....	39
4.3.1 Influência das condições de operação sobre o rendimento de extrato de erva-mate.....	40
4.3.2 Influência das condições de cultivo sobre o rendimento das extrações	43
4.3.2.1 Influência da intensidade de luz e época de colheita no rendimento de extrato	44

4.3.2.2	Influência da idade da folha no rendimento de extrato	47
4.4	Solubilidade experimental	53
4.5	Análise química dos extratos de erva-mate obtidos sob diferentes condições de extração e cultivo da planta	56
4.5.1	Influência das condições de extração sobre os teores dos compostos.....	57
4.5.2	Influência das variáveis de cultivo nos teores dos compostos de interesse.....	61
4.5.2.1	Influência da intensidade de luz e época de colheita nos teores dos compostos	61
4.5.2.2	Influência da idade de folha nos teores dos compostos.....	65
4.6	Modelagem das extrações de erva-mate.....	73
	CAPÍTULO V	77
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
5.1	Rendimento de extrato	77
5.2	Solubilidade experimental.....	77
5.3	Análise química dos extratos.....	78
5.4	Modelagem - Sovová (2005).....	79
5.5	Sugestões para trabalhos futuros	79
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da erva-mate (EMBRAPA FLORESTAS).....	8
Figura 2. Estrutura química da cafeína: $C_8H_{10}N_4O_2$	13
Figura 3. Estrutura química da teobromina: $C_7H_8N_4O_2$	15
Figura 4. Estrutura química do fitol: $C_{20}H_{40}O$	15
Figura 5. Estrutura química do esqualeno: $C_{30}H_{50}$	16
Figura 6. Estrutura química da vitamina E.....	18
Figura 7. Estrutura química do estigmasterol: $C_{29}H_{48}O$	20
Figura 8. Diagrama de fases para uma substância pura (McHUGH e KRUKONIS, 1994).....	21
Figura 9. Esquema representativo do processo de extração supercrítica.	23
Figura 10. Experimento de campo: (a) plantas expostas ao sol e (b) plantas cobertas com sombrite (retém 75 % da luminosidade).	29
Figura 11. Unidade experimental utilizada nas extrações com CO_2 a altas pressões.....	33
Figura 12. Curvas de extração da erva-mate com 6 meses de idade da folha sob diferentes condições de temperatura e pressão.	41
Figura 13. Influência da pressão nas curvas de rendimento da extração de erva-mate a 20 °C.	42
Figura 14. Influência da pressão nas curvas de rendimento da extração de erva-mate a 40 °C.	43
Figura 15. Curvas de extrações da erva-mate com 6 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.....	45
Figura 16. Curvas de extrações da erva-mate com 12 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.....	46
Figura 17. Curvas de extrações da erva-mate com 18 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.....	46

Figura 18. Curvas de extrações de amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno expostas a pleno sol.	48
Figura 19. Curvas de extrações de amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno mantidas sob sombreamento.	48
Figura 20. Curvas de extrações de amostras de 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão expostas a pleno sol.	49
Figura 21. Curvas de extrações de amostras de 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão mantidas sob sombreamento.	50
Figura 22. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no verão de plantas expostas a pleno sol.	51
Figura 23. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no verão de plantas sob sombreamento.	51
Figura 24. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas expostas a pleno sol.	52
Figura 25. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas sob sombreamento.	53
Figura 26. Isotermas de solubilidade do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões.	55
Figura 27. Cromatograma típico do extrato de erva-mate. Picos: PI – padrão interno (bifenila), 1- cafeína, 2 – teobromina, 3 - fitol, 4 - esqualeno, 5 - vitamina E e 6 – estigmasterol.	57
Figura 28. Influência da pressão sobre concentração dos compostos extraídos com CO ₂ a 20 °C.	59
Figura 29. Influência da pressão sobre concentração dos compostos extraídos com CO ₂ a 40 °C.	59
Figura 30. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 6 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.	63
Figura 31. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 12 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.	64
Figura 32. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 18 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.	64
Figura 33. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno expostas a pleno sol.	66

Figura 34. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno, sombreadas.....	66
Figura 35. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno, expostas a pleno sol.....	67
Figura 36. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno, mantidas sob sombreamento.....	68
Figura 37. Concentração dos compostos em amostras de 6 e 12 meses coletas no verão de plantas exposta a pleno sol.....	69
Figura 38. Concentração dos compostos em amostras de 6 e 12 meses coletas no verão de plantas sob sombreamento.....	69
Figura 39. Concentração dos compostos em amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas expostas ao sol.....	70
Figura 40. Concentração dos compostos em amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas sob sombreamento.....	71
Figura 41. Curvas experimentais e simuladas de extrações com CO ₂ a altas pressões na temperatura de 20 °C.....	74
Figura 42. Curvas experimentais e simuladas de extrações com CO ₂ a altas pressões na temperatura de 40 °C.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas das substâncias no estado gasoso, líquido e supercrítico (RIZVI <i>et al.</i> , 1986a).....	22
Tabela 2. Propriedades críticas de alguns solventes (McHUGH e KRUKONIS, 1994).....	24
Tabela 3. Condições experimentais propostas para análise das variáveis na extração com CO ₂ pressurizado.....	33
Tabela 4. Condições experimentais e rendimentos médios obtidos nas extrações com CO ₂ a altas pressões de erva-mate (6 meses).	40
Tabela 5. Condições de cultivo da planta, média dos rendimentos e desvio padrão obtidos nas extrações utilizando CO ₂ a 30 °C e 175 atm.	44
Tabela 6. Solubilidade experimental do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões.....	54
Tabela 7. Influência das condições de operação sobre a concentração dos compostos de interesse obtidos nas extrações de erva-mate com CO ₂ a altas pressões (mg _{composto} /g _{extrato}).....	60
Tabela 8. Influência das variáveis de manejo sobre a concentração dos compostos de interesse obtidos nas extrações de erva-mate a 30 °C e 175 atm (mg _{composto} /g _{extrato}).	62
Tabela 9. Quantidade de cafeína presente nos extratos de erva-mate obtidos com CO ₂ a altas pressões.....	72
Tabela 10. Parâmetros de transferência de massa obtidos com o modelo de Sovová (2005).	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Agricultural Chemists;
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
CO ₂	Dióxido de carbono;
Cor.	Corrida experimental de extração;
ESC	Extração supercrítica;
FSC	Fluído supercrítico;
He	Hélio;
LabMat	Laboratório de materiais da Universidade Federal de Santa Catarina;
MAO	Monoamina oxidase;
na	Análise química não realizada;
NP	Número de pontos experimentais;
PI	Padrão interno (bifenila);
<i>SEQ</i>	Somatório do erro quadrático;

LISTA DE SÍMBOLOS

a_{extrato}	Coefficiente angular da curva de massa de extrato extraída em função do tempo;
a_s	Área específica entre a região de células intactas e quebradas (m^{-1});
a_{solvente}	Coefficiente angular da curva de massa de CO_2 consumido em função do tempo;
C	Concentração mássica de soluto na fase fluida ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{solvente}}$);
C_1	Constante de ajuste do modelo Sovová (2005);
C_2	Constante de ajuste do modelo Sovová (2005);
c_u	Quantidade de soluto contido no sólido não tratado ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{amostra}}$);
d	Diâmetro;
e_{cal}	Rendimento obtido pelo modelo Sovová (2005);
e_{exp}	Rendimento experimental de extrato ($\text{g}_{\text{extrato}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$);
h	Distância axial ao longo do leito (cm);
H	Altura do leito de extração (cm);
K	Coefficiente de partição;
k_s	Coefficiente de transferência de massa na fase sólida (s^{-1});
$k_s a_s$	Parâmetro de transferência de massa etapa difusiva (s^{-1});
m	Massa de amostra carregada no extrator (g);
N_m	Massa de sólido insolúvel ($\text{g}_{\text{sólido}}$);
P	Pressão (atm);
P_c	Pressão crítica (bar);
q	Quantidade relativa de solvente consumido ($\text{g}_{\text{CO}_2}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
\dot{Q}	Taxa de solvente na alimentação ($\text{g}_{\text{solvente}}/\text{g}_{\text{amostra}}$);
Q	Vazão mássica de solvente (g/s);
q_c	Quantidade relativa de solvente consumido quando todo o soluto disponível nas células quebradas foi extraído ($\text{g}_{\text{CO}_2}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
r	Eficiência de moagem (fração de células quebradas);
R^2	Coefficiente de correlação;

Se	Solubilidade experimental ($\text{mg}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{solvente}}$);
t	Tempo (s)
T	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$);
Tc	Temperatura crítica (K);
u	Velocidade superficial do solvente (cm/s);
v	Volume interno do extrator (cm^3);
x	Concentração mássica de soluto na fase sólida ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
x_k	Quantidade inicial de soluto de difícil acesso ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
x_u	Concentração de soluto na amostra não tratada ($\text{g}_{\text{soluto}}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
y_o	Solubilidade ($\text{g}_{\text{extrato}}/\text{g}_{\text{CO}_2}$);
ε	Porosidade do leito;
γ	Relação de solvente-matriz sólida no leito ($\text{g}_{\text{CO}_2}/\text{g}_{\text{sólido}}$);
ρ_c	Densidade crítica (g/cm^3);
ρ_f	Densidade do fluido (g/cm^3);
ρ_l	Densidade aparente do leito (g/cm^3);
ρ_s	Densidade do sólido (g/cm^3);

GIRARDI, Jonathan dos Santos. Avaliação da influência das condições de cultivo sobre os teores de compostos de interesse presentes nos extratos de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) obtidos por CO₂ a altas pressões. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência das condições de cultivo da erva-mate no teor de compostos de interesse comercial (caféina, teobromina, fitol, esqualeno, vitamina E e estigmasterol) obtidos por extração com dióxido de carbono a altas pressões. Inicialmente investigou-se a influência das condições de operação empregadas nas extrações de amostras de erva-mate com 6 meses de idade da folha. As variáveis estudadas foram: temperatura de 20 a 40 °C e pressão de 100 a 250 atm. Posteriormente foram investigadas as condições de cultivo: intensidade de luz (expostas ao sol ou sombreadas), época de colheita (inverno ou verão) e idade das folhas (6, 12 e 18 meses). A quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A extração de erva-mate realizada a 40 °C e 100 atm proporcionou o menor rendimento de extrato entre todas as condições avaliadas, em contrapartida, gerou extrato com maiores concentrações de todos os compostos estudados (no caso da caféina foi observado aumento de cerca de 350 % em seu teor). As condições de cultivo também exerceram grande influência sobre o rendimento e concentração dos compostos avaliados. Maiores rendimentos foram obtidos de amostras com 12 meses de idade das folhas, expostas a pleno sol e coletadas no período do inverno, enquanto que maiores teores de todos os compostos foram obtidos de amostra com 6 meses, cultivadas sob sombreamento e coletadas no inverno. As isotermas de solubilidade do extrato de erva-mate no dióxido de carbono permitiram identificar o ponto de transição próximo a 150 atm, sendo que abaixo desta pressão, maior eficiência do processo é obtida na temperatura de 20 °C, enquanto acima as extrações devem ser conduzidas a 40 °C. Os resultados mostram a eficiência do processo de extração da erva-mate com CO₂ pressurizado e o efeito das condições de cultivo na potencialização dos teores dos compostos estudados no extrato. O modelo de Sovová (2005) ajustou-se adequadamente aos dados experimentais obtidos.

GIRARDI, Jonathan dos Santos. Evaluation of the influence of management agronomic conditions on the levels of compounds of interest present in extracts of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) obtained by CO₂ at high pressures. 2010. Dissertation. Universidade Federal de Santa Catarina.

ABSTRACT

The aim of this work is to assess the influence of the conditions cultivation, as light intensity (plants with direct sun exposure and in a controlled light intensity), harvest season (winter or summer) and age of leaves (6, 12 and 18 months) on the concentration of compounds of commercial interest (caffeine, theobromine, phytol, squalene, vitamin E and stigmasterol) in mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from carbon dioxide at high pressures. First were examined the operating conditions for extraction with pressurized CO₂ (temperature: 20 – 40 °C and pressure: 100 – 250 atm). Extract of mate tea leaves obtained from carbon dioxide at 40 °C and 100atm gave lower yields, however, generated extract with high concentration in all studied compounds (caffeine showed an increase of 350 % content). Conditions cultivation were subsequently examined and exerted strong influence on the liquid yield and on the concentration of the compounds evaluated of the extracts. Higher yields were obtained from samples with 12-month-old leaves exposed to full sun and collected during the winter period, while higher levels of all compounds were obtained from sample 6 months, grown under shade and collected in the winter. Isotherms of solubility of the mate tea leaves extracts in carbon dioxide indicated 150 atm as the point of transition where, below this pressure, the greater efficiency of the process is achieved in the operating temperature of 20 °C, while above the extractions should be conducted at 40 °C. The results show the efficiency of extraction of mate using pressurized CO₂ and the effect of conditions cultivation on enhancement of the levels of these compounds in the extract. The model of Sovová (2005) adjusted appropriately to experimental data.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate é um importante produto natural no contexto sócio-cultural da região sul do país. Suas folhas eram consumidas pelos indígenas sul-americanos com a finalidade de estimular física e espiritualmente seus guerreiros. Atualmente as folhas da erva-mate basicamente são utilizadas no preparo do chimarrão, tererê, mate solúvel e chá mate. Devido a suas propriedades químicas, além das tradicionais bebidas, uma pequena parte da produção de erva-mate é utilizada em preparações farmacêuticas e cosméticas, e tem sido incorporada a várias farmacopéias. No Ministério da Saúde brasileiro estão registradas 14 preparações derivadas de *Ilex paraguariensis* St. Hill. em função das propriedades terapêuticas, onde é recomendada como estimulante, anti-inflamatório, anti-reumático, tônico e diurético.

Recentemente, alguns estudos têm conseguido comprovar cientificamente efeitos benéficos ao organismo relacionados ao consumo de erva-mate. Trabalhos indicam efeitos farmacológicos de extratos de erva-mate como a atividade quimiopreventiva (evita danos celular causados por doenças crônicas), o efeito colerético (aumenta o fluxo biliar), efeito vasodilatador intestinal de propulsão, a inibição da glicação (reação entre o açúcar no sangue, proteínas e lipídios que provoca lesões nas células) e inibição do estresse oxidativo (BASTOS *et al.*, 2007)

O consumo da erva-mate na forma de chá, ou como ingrediente em alimentos formulados e ainda como suplementos dietéticos tem aumentado e desperta o interesse no mercado mundial. O crescente número de patentes relacionadas a produtos formulados com erva-mate indica o recente interesse nas atividades biológicas desta planta, bem como seu potencial econômico para aplicação. Atualmente são cerca de 29 patentes internacionais de produtos de *Ilex paraguariensis* registradas desde 1963, porém a maioria após o ano de 2000 (BASTOS *et al.*, 2007).

O processamento da erva-mate permanece praticamente inalterado desde a antiguidade. As diferenças entre a matéria-prima e a forma de secagem industrial utilizada não permitem reproduzir a

composição química de um ano para o outro. Da mesma maneira, as condições de processamento (tempo, temperatura de secagem) e outros parâmetros, tais como a variabilidade genética da planta, tipo de solo, intensidade de luz, idade de poda das folhas e adubação variam muito, e exercem influência na qualidade, características sensoriais e na quantidade de substâncias bioativas presentes no produto final.

No caso de óleos essenciais de produtos naturais, alguns trabalhos apontam que as condições de cultivo interferem diretamente na concentração dos compostos químicos presentes nas plantas. Desta forma, conhecer quais são os fatores e como eles influenciam os teores dos compostos é de extrema importância, uma vez que o mercado consumidor exige qualidade e padronização dos produtos (VIEIRA *et al.*, 2003; JACQUES *et al.*, 2007).

A indústria de alimentos, bem como a farmacêutica e cosmética, freqüentemente faz uso dos óleos essenciais oriundos do processamento de produtos naturais. Seus aromas característicos resultam de complexa interação entre as centenas de componentes presentes na mistura. Tradicionalmente, obtêm-se os óleos essenciais utilizando-se extração com solventes orgânicos ou por destilação. No entanto, tais métodos apresentam certos problemas, como a separação do solvente do extrato após o processamento, geralmente por evaporação, o que pode vir a degradar compostos termolábeis.

Os métodos convencionais para realizar a extração da erva-mate tem se mostrado ineficientes, principalmente devido à pequena quantidade de extrato obtido, baixa seletividade, às elevadas temperaturas empregadas no processo e à utilização de solventes orgânicos, tóxicos para a utilização em indústria de alimentos e fármacos. Os fluidos supercríticos se apresentam como alternativa aos métodos tradicionais, uma vez que podem ser utilizados a temperaturas relativamente baixas. A extração com fluido supercrítico tem sido amplamente estudada e seu emprego para obtenção de óleos essenciais, princípios ativos e outros constituintes de plantas têm se mostrado viável, além do grande potencial em escala de laboratório. O crescente interesse pela tecnologia de extração com fluidos supercríticos, principalmente dióxido de carbono supercrítico, está associado às vantagens do processo, pois além de propiciar produtos de elevada qualidade sem que ocorram alterações das propriedades das matérias-

primas, é uma tecnologia que não degrada o meio ambiente (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

Desta forma, como a erva-mate é uma planta de composição química complexa, além dos atributos já conhecidos, podem-se vislumbrar muitas aplicações potenciais, as quais poderiam vir a ampliar seu consumo. Para tal, é de fundamental importância determinar a influência das condições de cultivo nos teores dos compostos de interesse, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos, além de permitir obter uma matéria-prima de qualidade e com características distintas em função de sua aplicação.

Para facilitar a compreensão, este documento está organizado em cinco capítulos. No Capítulo I foi apresentada uma breve introdução destacando alguns aspectos que motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, bem como os objetivos. No Capítulo II é apresentada uma revisão bibliográfica com os fundamentos teóricos sobre a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e o processo de extração com CO₂ a altas pressões. Em seguida, no Capítulo III, são apresentados os materiais e as metodologias utilizadas durante o desenvolvimento do trabalho. As discussões e resultados obtidos na realização dos experimentos de extração da erva-mate com CO₂ pressurizado são apresentados no Capítulo IV. Por fim, o Capítulo V apresenta as considerações finais e sugestões para desenvolvimentos de trabalhos futuros.

1.1 Objetivos

A seguir são apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos das condições de cultivo da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre o teor de compostos de interesse industrial obtidos por extração com CO₂ a altas pressões (subcrítico e supercrítico).

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar a influência das variáveis de extração com dióxido de carbono a altas pressões (temperatura e densidade) sobre o rendimento e

concentração de compostos de interesse presentes no extrato de erva-mate com 6 meses de idade da folha.

Avaliar os efeitos das condições de cultivo da erva-mate (intensidade de luz - sol e sombreada, idade de poda das folhas - 6, 12 e 18 meses e época de colheita - inverno e verão) sobre o rendimento e concentração dos compostos de interesse presentes no extrato de erva-mate obtido por extrações com CO₂ a altas pressões.

Determinar a solubilidade experimental do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões.

Quantificar, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), os teores dos compostos de interesse (cafeína, teobromina, fitol, esqualeno, vitamina E e estigmasterol) presentes nos extratos de erva-mate obtidos por CO₂ a altas pressões.

Realizar a modelagem matemática dos dados experimentais obtidos utilizando o modelo proposto por Sovová (2005).

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo tem-se como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica acerca da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), do processo de extração com dióxido de carbono a altas pressões e da modelagem matemática das curvas experimentais obtidas.

2.1 Erva-mate

A utilização da erva-mate como alimento data desde os primórdios. Os indígenas sul-americanos utilizavam as folhas para o preparo de bebida com finalidade estimulante. Os índios caingangues associavam à erva-mate o termo “Cangoy”, que significa na linguagem indígena “o que alimenta” (MACCARI e SANTOS, 2000). Pajés e caciques atribuíam à erva-mate poderes sobrenaturais, e passaram a utilizá-la para estimular seus guerreiros (BERKAI e BRAGA, 2000).

Há relatos da utilização da erva-mate pelos povos indígenas durante a ocupação castelhana no Paraguai, no século XVI. Próximo à cidade de Lima (Peru), foram encontradas, em túmulos pré-colombianos, folhas de erva-mate, demonstrando seu uso pelos povos incas. Posteriormente constatou-se que indígenas brasileiros, que habitavam as margens do rio Paraná, também faziam uso da planta (MAZUCHOWSKI, 1989).

O uso da erva-mate por indígenas vem sendo relatado desde os primórdios das colonizações espanholas e portuguesas, muito antes de sua comercialização na Europa pelos jesuítas, datada de 1610. A Companhia de Jesus e os 30 povos das Missões de Guaraní, situados nas faixas de terras ao longo dos rios Paraguai, Paraná e Uruguai, implementaram o plantio da erva-mate, contribuindo para expansão da bebida, a qual passou a ser chamada de “Chá dos Jesuítas”. Os jesuítas, a partir desta época, definiram preceitos sobre época de colheita das sementes, preparo e cultivo da erva-mate (DA CROCE e FLOSS, 1999; LINHARES, 1970).

Durante o período de colonização, o uso do mate foi transmitido aos novos habitantes e logo incorporado aos hábitos alimentares da população. Mais do que um hábito alimentar, o consumo da erva-mate

logo foi promovido à categoria de tradição em algumas regiões da América do Sul, tendo o chimarrão como bebida típica (MACCARI e SANTOS, 2000).

O processo histórico-geográfico do cultivo da erva-mate está atrelado aos ciclos econômicos e ao sistema de transporte, denominado de tropeirismo, fazendo com que, em conexão com o gado, a madeira e a produção agrícola dos núcleos coloniais da época, a erva-mate ganhasse valorização econômica, tornando-se moeda de troca predominante, durante o século XIX e início do século XX (MACCARI e SANTOS, 2000).

Atualmente, devido aos constituintes químicos das folhas, a erva-mate pode ser empregada em inúmeras aplicações industriais, como produtos de higiene, cosméticos, produtos para tratamento ambiental e em diversos medicamentos. Destaca-se, porém, sua aplicação como alimento sob a forma de bebidas como o chimarrão, tererê, refrigerantes, chá mate queimado, verde e/ou solúvel, (MACCARI e SANTOS, 2000).

2.1.1 Características botânicas

Por volta de 1820, o naturalista francês Auguste Saint Hilaire desembarcou em terras brasileiras e, com base em exemplares coletados em Curitiba, fez a classificação botânica da planta, registrada junto à Academia de Ciências do Instituto da França como *Ilex paraguariensis* (COSTA, 1995).

A erva-mate é uma espécie arbórea, que ocorre naturalmente nas regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, especialmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Peru, sendo característica em regiões com altitudes acima de 400 metros (DA CROCE e FLOSS, 1999).

Pertencente à família Aquifoliaceae e o gênero *Ilex* possui mais de 550 espécies, das quais 60 ocorrem no Brasil, mas apenas cinco delas são beneficiadas para consumo (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999).

O porte da planta de erva mate lembra a laranjeira, cujo o caule é um tronco de cor acinzentado, podendo atingir 50 centímetros de diâmetro. A altura é variável, dependendo da idade e do tipo de sítio, podendo atingir 15 metros, mas geralmente, quando podadas, não passam de 7 metros (COSTA, 1995).

As folhas constituem a parte mais importante do vegetal, pois dão origem ao produto erva-mate após os processamentos devidos. Apresentam-se de forma alternada nos ramos, sendo do tipo subcoriáceo até coriáceas. Mostram-se estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. O pecíolo, um tanto retorcido, é relativamente curto, medindo de 7 a 15 milímetros de comprimento. A folha inteira mede de 8 a 10 centímetros de comprimento por 4 ou 5 centímetros de largura (REITZ, 1967).

As flores apresentam coloração branca, são pouco vistosas e pequenas, dispostas na axila das folhas superiores. A floração ocorre entre os meses de setembro e dezembro, predominando outubro. Em relação ao comportamento das flores, a erva-mate é uma planta dióica, apresentando flores masculinas e femininas separadamente. Na floração, apresenta cachos de 30 a 40 flores brancas com quatro pétalas agrupadas (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999; REITZ, 1967).

O fruto da erva-mate é definido como uma drupa, globoso ou baciforme, de superfície lisa e lustrosa que durante o processo de maturação muda sua coloração de verde para branca, vermelha, roxa e quase preta quando maduro. Nesta fase os frutos atraem os pássaros que deles se alimentam, expelindo posteriormente as sementes envolvidas em dejeções, o que favorece a disseminação das plantas. O fruto bem maduro compõe-se de quatro sementes pequenas e apresenta tegumento áspero e duro. A semente de erva-mate é dura, de tamanho e forma variáveis e coloração amarelo clara (KARAS, 1982)

É uma planta de clima tropical ou subtropical que necessita de clima moderado e úmido, com temperaturas variando entre 15 a 21 °C e 1500 mm de precipitação de chuva por ano, levando até 25 anos para se desenvolver completamente (ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999).

A erva-mate é uma espécie silvestre que cresce em associação com o pinheiro (*Araucária angustifolia*) nos ambientes ecológicos determinados pelos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e seus afluentes (COSTA, 1995).

2.1.2 Distribuição geográfica

A erva-mate é uma planta originária da América do Sul, estando distribuída em uma área de aproximadamente 540000 km², que abrange,

no Brasil, os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul; na Argentina, a Província de Misiones, parte da Província de Corrientes e pequena parte da Província de Tucumã; e, no Paraguai, a área entre os rios Paraná e Paraguai (Figura 1). Esta região localiza-se entre as latitudes de 22° S e 30° S e longitudes 48° 30' W e 56° 10' W, com altitudes que variam entre 500 m a 1500 m sobre o nível do mar. Entretanto, cerca de 80 % da área de ocorrência pertence ao Brasil, correspondendo a 450000 km², e representando cerca de 5 % do território nacional. Na América do Sul corresponde a 3 % da área (EMBRAPA FLORESTAS).

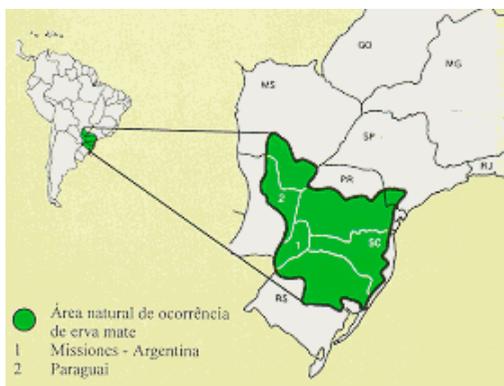


Figura 1. Distribuição geográfica da erva-mate (EMBRAPA FLORESTAS).

2.1.3 Mercado e aspectos químicos gerais

Segundo relatado na literatura, Trommsdorff, em 1836, realizou as primeiras investigações relativas à composição química da erva-mate, constatando a presença de substâncias resinosas, ácido tânico, corante amarelo, entre outras. Logo em seguida, Stenhouse, em 1843, relatou a presença da cafeína, principal alcalóide entre os constituintes da erva-mate. Oehri, em 1927, utilizou amostras de *Ilex paraguariensis* e identificou a presença de um novo alcalóide em menores quantidades, a teobromina (ALIKARIDIS, 1987; CENI, 2005).

Estudos demonstram que em relação aos seus constituintes a erva-mate apresenta composição química complexa, destacando-se compostos como as metilxantinas, saponinas, taninos, vitaminas, componentes minerais, substâncias aromáticas, ácidos graxos, terpenos,

alcoóis, cetonas, aldeídos, fenóis, entre outros (ZAMPIER, 2001; ATHAYDE, 1993; CANSIAN, 2003).

Segundo citado por Valduga (1994), em 1944 Veronese identificou como constituintes da erva-mate a água, celulose, gomas, dextrinas, mucilagem, glicose, pentoses, substâncias graxas, resina aromática, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido virídico, clorofila, colesterolina e óleo essencial. As cinzas são compostas por grande quantidade de potássio, lítio, ácido fosfórico, sulfúrico, carbônico, clorídrico e cítrico, além de magnésio, manganês, ferro, alumínio e traços de arsênio.

Os alcalóides cafeína, teobromina e a teofilina são constituintes da erva-mate com grande potencial terapêutico que se diferenciam principalmente pela potência de suas ações sobre o sistema nervoso central. Estas metilxantinas estão presentes em diversos produtos de uso medicinal (MACCARI e SANTOS, 2000). Neste sentido, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com intuito de avaliar o efeito terapêutico destes alcalóides. O teor de cafeína na erva “in natura” atinge em média 1,6 %, enquanto que em infusões o valor é de 1,1 % (VALDUGA, 1994).

Os flavonóides são metabólicos secundários das plantas com propriedades antioxidantes. Ocorrem em frutas e vegetais e apresenta ação biológica, anti-inflamatória, anti-tumoral, anti-trombogênica, anti-viral. Podem aumentar a imuno resposta do organismo (BLUMBERG e CAPPELLANO, 2002).

A erva-mate possui cerca de 20 a 30 % da composição constituída por polifenóis hidrosolúveis tais como ácido isoclorigênico, ácido cafeico e ácido clorogênico, os quais apresentam alta capacidade antioxidante e conferem às suas infusões, propriedade hepatoprotetora, além de reforçarem a defesa antioxidante do organismo (CAMPOS *et al.*, 1986; FILIP *et al.*, 2001). Flavonóides presentes nas folhas de *Ilex paraguariensis* conferem efeitos farmacológicos de interesse, destacando-se a redução do apetite (OHEM e HOLZL, 1988).

Os principais flavonóides presentes na erva-mate são a rutina, a quercetina-3-glicosídeo e o canferol-3-rutinosídeo (FILIP *et al.*, 2001). Estes compostos também apresentam propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas. Estudos sugerem que o constante consumo de

alimentos ricos em quercetina pode ser benéfico para prevenção e controle de alguns tipos de câncer (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004; DE MEJIA *et al.*, 2005).

As saponinas são substâncias glicosídicas, que reduzem a tensão superficial e apresentam propriedade detergente e emulsificante. Em solução aquosa, provocam a formação de espuma. Além da formação de espuma, as saponinas presentes na erva-mate conferem o amargor característico do vegetal (VALDUGA, 1994).

Gosmann *et al.* (1989) e Kraemer (1997) descrevem como constituintes da erva-mate 11 glicosídeos, como agliconas, ácido ursólico e ácido oleanólico e os açúcares arabinose, glicose e ramnose. Athayde *et al.* (2000) verificaram a presença de saponinas em folhas e frutos de *Ilex paraguariensis*, enquanto Kraemer *et al.* (1996) em ramos, raízes e frutos verdes e maduros.

Trabalhos demonstram que aminoácidos essenciais ao organismo humano, açúcar assimilável em forma de glicose e vitaminas, também estão entre os compostos presentes na erva-mate. A vitamina E é benéfica aos diversos tipos de tecidos do organismo humano, enquanto a vitamina C participa da circulação sanguínea, agindo como defesa orgânica. Em maior escala aparecem as vitaminas do complexo B, como o ácido pantotênico, que participa do aproveitamento do açúcar pelos músculos e nervos, e da atividade cerebral (COSTA, 1995; FAGUNDES, 1980).

Entre as enzimas, estão presentes em folhas de erva-mate as oxidases que, junto com a cafeína, exerce a função de nutrição do organismo humano (FAGUNDES, 1980).

Segundo Filip *et al.* (2000) a erva-mate possui propriedades antioxidantes, conservadas mesmo após o preparo das folhas como mate. Conforme citado por Barbosa (2006), uma patente de Invenção publicada nos EUA aponta o extrato de erva-mate como inibidor da monoamina oxidase (MAO), sendo útil em aplicações terapêuticas, como o tratamento da depressão, desordens de atenção e foco, desordens emocionais, doença de Parkinson, hipertensão, substituição do cigarro, entre outras.

Além destes compostos, a erva-mate contém quantidades significativas de minerais como cálcio, potássio, magnésio e manganês.

De acordo com Garcia *et al.* (1997), minerais como ferro, cálcio, manganês, magnésio, sódio, potássio, zinco e cobre são encontrados tanto nas folhas como no produto comercial oriundo da erva-mate do Paraguai.

O cultivo comercial da erva-mate apresenta duas épocas de colheita: inverno e verão, chamadas respectivamente de safra e safrinha. Reismann *et al.* (1994) investigaram os níveis de 22 nutrientes em duas épocas do ano distintas de cultivo de *I. paraguariensis* e observaram um aumento considerável de fósforo, nitrogênio e potássio no mês de outubro, enquanto que para cálcio e magnésio os maiores valores foram observados em coletas realizadas em julho.

As concentrações de minerais em erva-mate são determinadas pela espécie (fator genético), tecido e idade da planta, além do ambiente externo (MALAVOLTA, 1980; ALIKARIDIS, 1987).

Mazzafera (1994) observou diferenças nos níveis de cafeína e teobromina quando comparou folhas jovens e velhas e frutos maduros e imaturos, de *I. paraguariensis*, e observou a influência da idade da folha sobre o perfil químico do vegetal.

Bertoni *et al.* (1992) ressalta que o tipo de solo, idade da planta, data de coleta e características climáticas, influenciam significativamente a composição química da erva-mate.

O consumo de erva-mate no mercado brasileiro é crescente, porém a disponibilidade comercial e industrial do produto ainda é limitada. Quanto ao mercado, as maiores possibilidades de ampliação, parecem ser oferecidas pela diversificação de produtos ofertados e modernização do processo de produção, em que sua adequação tecnológica e otimização dos processos são fundamentais (CAMPOS, 1996).

Os estudos com erva-mate têm revelado diversas propriedades nutritivas, fisiológicas e medicinais do produto, o que pode conferir grande potencial de aproveitamento para o mate (PARANÁ, 2000; CAMPOS, 1996).

A necessidade da conquista de novos mercados e suas exigências crescentes são sempre acompanhadas pela geração de novos produtos. Neste sentido, os produtos naturais originários da erva-mate apresentam

importância socioeconômica cada vez maior, uma vez que a aceitação de novos produtos com finalidades específicas (cosméticos, alimentícios e fármacos) tende a ser maior e melhor no mercado, em função da busca por melhor qualidade de vida por parte dos consumidores (BALCEWICZ, 1997).

O processo de desenvolvimento de novos produtos baseia-se fundamentalmente na habilidade de identificar melhores formas de atender às necessidades do mercado e na capacidade de traduzir essas informações em produtos que ofereçam de fato melhor solução para tais necessidades (REGO e RÉ, 1997). Em se tratando da erva-mate, o desenvolvimento de novos produtos constitui-se um desafio importante para a Ciência e Tecnologia de Alimentos, tanto sob o ponto de vista científico como aplicado, ao promover melhor aproveitamento das tecnologias empregadas, na adaptação de novas tecnologias e ainda no uso de matéria-prima pouco explorada (PENNA, 1999).

2.1.4 Compostos de interesse industrial

2.1.4.1 Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetil- 1*H*-purino- 2,6(3*H*,7*H*)-diona) também chamada de 1,3,7-trimetilxantina é uma substância do grupo das metilxantinas que ocorre naturalmente em folhas, sementes ou frutos de cerca de 60 espécies de plantas em todo mundo. As fontes mais conhecidas de cafeína são o café, cacau, nozes e chás de folhas, como as de erva-mate (*I. paraguariensis*). Em sua forma pura, é um pó inodoro, branco, cristalino e possui gosto amargo (WATSON, 2003). Sua função botânica é atuar como uma espécie de pesticida natural, agente antifúngico e inseticida, preservando o desenvolvimento da planta. Elevados níveis de cafeína são encontrados em mudas jovens que estão desenvolvendo folhagens, e ainda não possuem proteção mecânica. Desta forma, a cafeína paralisa e mata determinados insetos que tentam se alimentar da planta (FRISCHKNECHT *et al.*, 1986; NATHANSON, 1984).

A cafeína foi isolada pela primeira vez em 1820, por Runge e Van Giese. A partir de 1823 passou a ser incluída no vocabulário médico, porém, apenas em 1875 teve sua fórmula estrutural descrita. A cafeína é um alcalóide do grupo das xantinas, designado quimicamente

como 1,3,7-trimetilxantina, conforme observado na Figura 2 (WATSON, 2003).

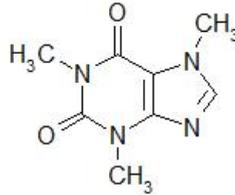


Figura 2. Estrutura química da cafeína: $C_8H_{10}N_4O_2$.

A cafeína, tanto natural como a sintética, tem sido muito utilizada como agente aromatizante em alimentos e bebidas e como um componente ativo de uma variedade de cosméticos e produtos farmacêuticos. Além da cafeína natural, obtida pelo processo de descafeinação industrial, a cafeína também pode ser obtida pela metilação de teobromina ou por síntese química total com dimetilcarbamida e ácido malônico como reagentes (ARNAUD, 2005).

A cafeína é uma das substâncias farmacologicamente ativa mais consumida no mundo e, dependendo da quantidade ingerida, age como estimulante do sistema nervoso central, melhora a memorização, facilitando a associação de idéias e a percepção dos sentidos. Além disso, pode promover o aumento da pressão arterial e conseqüentemente a atividade do coração (FREDHOLM *et al.*, 1999). Também melhora a oxigenação dos pulmões, aumenta a velocidade do metabolismo e acelera o batimento cardíaco (JAMES, 1998). A cafeína, como estimulante leve, atua sobre a contração muscular, propiciando o alívio da fadiga e do cansaço, favorece o funcionamento gástrico e, em alguns casos, atua nos rins, produzindo uma melhor diurese (MANDEL, 2002; JAMES, 1991).

Das metilxantinas presente na erva-mate, a cafeína apresenta maior potencial como estimulante cerebral, enquanto a teofilina apresenta maior poder de diurese (KOROLKOVAS e BURCKHALTER 1988).

Em contra partida, a ingestão excessiva de cafeína, como a maior parte dos fármacos, pode provocar agitação, ansiedade, irritabilidade,

tremores musculares, insônia, cefaléia, distúrbios sensoriais e até problemas gastrintestinais (ARONSON, 2006).

2.1.4.2 Teobromina

A teobromina (3,7-Dihidro-3,7-dimetil-1H-prine-2,6-diona) é um alcalóide derivado da purina amplamente distribuído na natureza numa variedade de plantas, tais como *Cammelia thea*, *Theobroma cacao*, *Cola acuminata*, *Paullinia cupana*, e várias espécies de *Ilex*, incluindo a *I. paraguariensis*. Cerca de 1,5 a 3 % de teobromina são encontrados em grãos de cacau e, desta forma, bebidas e alimentos a base de cacau, como chocolate, são uma das principais fontes de teobromina (ETENG *et al.*, 1997).

Existe grande interesse sobre o consumo de alcalóides, como a teobromina, e seus possíveis efeitos, benéficos ou não, sobre a saúde humana. Sabe-se que diversas bebidas comumente consumidas em vários países são produzidas com base em extratos de plantas (guaraná, erva-mate, cola, cacau) que contém quantidades consideráveis de teobromina, vem despertando grande interesse médico devido aos efeitos estimulantes no cérebro, coração, secreção gástrica e funcionamento dos rins (ETENG *et al.*, 1997).

Doses terapêuticas de 500 mg/kg de teobromina têm sido usadas no tratamento de edema cardíaco e angina peitoral, e até mesmo durante quimioterapia para tratamento de alguns cânceres (GIL *et al.*, 1993 e CHANG *et al.*, 1993). Além disso, destacam-se as propriedades diuréticas e vaso dilatadora da teobromina (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002). Por outro lado, estudos apontaram a morte súbita por insuficiência cardíaca de animais expostos a refeições a base de cacau contendo altas quantidades de teobromina, apesar de não ter sido possível relacionar a causa da morte com a presença do alcalóide (SOFFIETTI *et al.*, 1989).

A teobromina é conhecida quimicamente como 3,7 dimetilxantina, diferenciando-se da cafeína apenas por um grupamento metil, conforme mostra a Figura 3.

A cafeína, teobromina e teofilina, são alcalóides estritamente relacionados os quais se diferenciam pela potencia de suas ações sobre o sistema nervoso central, sendo que em relação à teobromina destacam-se

as suas propriedades diuréticas e vaso dilatadora (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

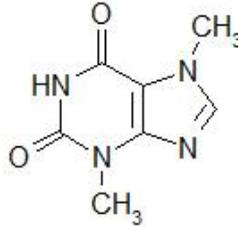


Figura 3. Estrutura química da teobromina: $C_7H_8N_4O_2$.

2.1.4.3 Fitol

O fitol é um líquido viscoso, quase incolor com um odor floral, de vasta ocorrência na natureza de fontes que contenham a presença de clorofila (McGINTY *et al.*, 2010). Sua estrutura química é mostrada na Figura 4. Corresponde quimicamente a um álcool alifático ramificado de cadeia longa, ligado à molécula de clorofila por uma ligação éster (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2E-enol). Uma vez que essa ligação pode ser quebrada em algumas situações, pela clorofilase ou durante o processamento dos vegetais, o fitol, assim liberado, pode então ser absorvido pelo intestino e posteriormente convertido para ácido fitânico, um ácido graxo ainda pouco conhecido (ácido 3,7,11,15-tetrametilexadecanóico), mas que apresenta importantes efeitos biológicos (MARQUEZ, 2003).

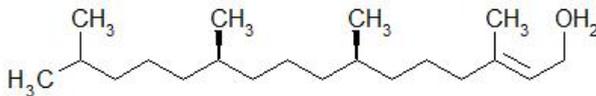


Figura 4. Estrutura química do fitol: $C_{20}H_{40}O$.

É importante mencionar que o organismo humano não é capaz de sintetizar o fitol, desta forma, ele é fornecido pela dieta alimentar e desempenha diversas funções biológicas de interesse, como a ação preventiva da teratogênese, causada pela ingestão excessiva de vitamina A. Entretanto, indivíduos com uma desordem metabólica de lipídeos, de caráter recessivo, denominada de “Síndrome de Refsum”, são incapazes

de metabolizar o ácido fitânico e acumulam quantidades muito elevadas desse ácido graxo no sangue e em diversos órgãos, tais como fígado, rins e outros. Essa desordem caracteriza-se por degeneração progressiva da visão (retinite pigmentosa), polineuropatia periférica e falta de coordenação muscular (ataxia cerebelar), entre outros sintomas graves (MARQUEZ, 2003).

A indústria cosmética utiliza o fitol como um dos principais ingredientes em cremes, perfumes, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene, além de produtos de limpeza e detergentes (McGINTY *et al.*, 2010). Segundo Brito (2010), o fitol é um terpeno conhecido por possuir propriedades como balancear o fluxo de óleo natural da pele e melhorar sua tenacidade. Estudos também o citam como um composto orgânico muito utilizado na síntese da vitamina E e vitamina K₁ (ODINOKOV *et al.*, 2003).

2.1.4.4 Esqualeno

Esqualeno (2,6,10,15,19,23 hexametil 2,6,10,14,18,22 tetracosahexane) é um hidrocarboneto triterpênico com seis ligações duplas, conforme visualizado na Figura 5. É encontrada em muitos organismos marinhos, sendo as principais fontes comerciais o óleo do fígado de tubarão e de baleias. Entretanto, incertezas quanto à futura oferta e disponibilidade de óleos de fígado de animais, em decorrência da preocupação internacional com a conservação da ecologia marinha, associado ao fato da dificuldade de purificação do esqualeno devido à presença de compostos semelhantes, como o colesterol, fazem surgir o interesse em outras fontes potenciais de esqualeno (FAN *et al.*, 2010). As maiores fontes vegetais de esqualeno são o óleo de oliva com cerca de 7 mg/g e de sementes de *Amaranthus*, de onde se obtém em torno de 5,64 mg/g (LI *et al.*, 2009)

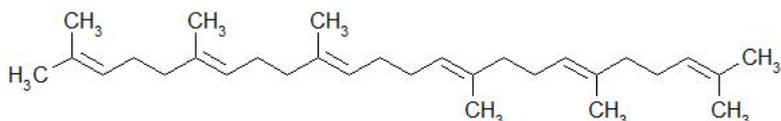


Figura 5. Estrutura química do esqualeno: C₃₀H₅₀.

Estudos associam o elevado consumo de óleo de oliva em países mediterrâneos à diminuição do risco de doenças coronárias e câncer, em decorrência da presença do esqualeno. Além disso, o esqualeno tem

mostrado ser eficaz na redução do colesterol total, colesterol de baixa densidade, de lipoproteínas e triglicérides em indivíduos que estão com hipercolesterolemia. Também tem sido sugerido que o esqualeno tenha um efeito quimiopreventivo do câncer de cólon (FAN *et al.*, 2010).

Esqualeno é comercializado como suplemento alimentar capaz de auxiliar na renovação das células do corpo e fortalecer o sistema imunológico (KAYA, 1990). Investigações clínicas indicam que de 60 a 85 % do total de esqualeno obtido de fontes alimentares é efetivamente absorvida e distribuída para vários tecidos do corpo e aumenta assim o interesse por alimentos funcionais com uma maior proporção de esqualeno (FAN *et al.* 2010).

O esqualeno é um precursor da biossíntese de esteróides que estão naturalmente presentes no organismo humano, concentrando-se na pele, fornecendo proteção contra germes e danos oxidativos causados por radicais livres. Assim, o esqualeno apresenta propriedades que o tornaram muito importante em cosmética e medicina, já que, além da ação anti-oxidativa melhora a oxigenação e regeneração dos tecidos, sendo absorvido rápida e profundamente (FAN *et al.*, 2010).

2.1.4.5 Vitamina E

O termo genérico "Vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis. Tanto tocoferóis como tocotrienóis ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol (Figura 6) (GUINAZ *et al.*, 2009).

Tocoferóis e tocotrienóis são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que as fontes principais são óleos vegetais, germe de trigo, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e fígado. Os isômeros mais abundantes nesses alimentos são o γ - e o α -tocopherol. Atualmente, vários alimentos são enriquecidos e fortificados com fontes ricas em vitamina E (GUINAZ *et al.*, 2009).

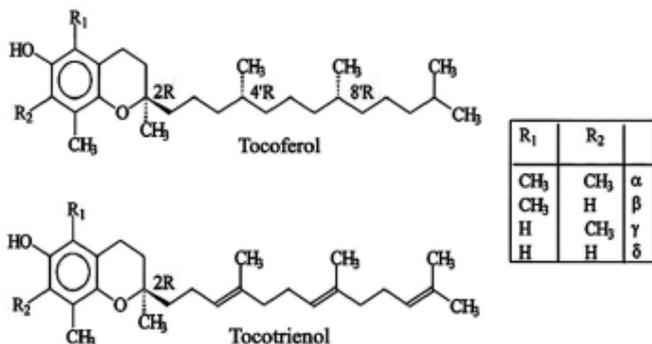


Figura 6. Estrutura química da vitamina E.

A forma mais ativa da vitamina E é o α -tocoferol (C₂₉H₅₀O₂), amplamente distribuída na natureza, com diferentes atividades biológicas e também presente no extrato de erva-mate. É um importante antioxidante lipossolúvel responsável pela proteção contra a peroxidação lipídica das membranas, retardando o processo de envelhecimento em seres humanos ou animais (THAKUR e SRIVASTAVA, 1996).

A vitamina E tem sido extensivamente estudada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que desempenha papéis especialmente importantes na reprodução e em mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais. A ingestão de vitamina E tem despertado interesse e preocupação, pois compõe juntamente com a vitamina C, β -caroteno, selênio e flavonóides, o grupo denominado como antioxidantes alimentares. Este grupo tem sido freqüentemente associado à prevenção de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (GUINAZ *et al.*, 2009). A vitamina E age como protetor da membrana celular, antioxidante biológico, evita danos em fibras musculares cardíacas e esqueléticas, tendo atividade na coagulação sanguínea, transporte de elétrons, proteção do organismo contra metais pesados, possuindo ainda mecanismo modulador da resposta imune dos animais, protegendo os leucócitos e macrófagos durante a fagocitose (PORTZ *et al.*, 2007).

A deficiência em Vitamina E pode resultar em síndrome neurológica em pessoas com má absorção crônica. Aplicações clínicas da vitamina E já são conhecidas em doenças como a abetalipoproteinemia, fibrose cística, doença hepática, anemias

hemolíticas, dificuldade respiratória, epilepsia, envelhecimento, câncer, doenças isquêmicas do coração e da catarata (THAKUR e SRIVASTAVA, 1996).

Os óleos vegetais comestíveis, que possuem altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo em nível mundial, constituindo-se, portanto, os alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população. O óleo de girassol parece ser o mais rico em α -tocoferol, seguido pelo de algodão, palma, canola, amendoim, oliva, milho, soja e coco. O γ -tocoferol é o composto predominante em óleos de soja e de milho, sendo que o óleo de palma é o que apresenta maior teor de tocotrienóis. O óleo de soja, devido ao grande consumo em nível mundial, é o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população (GUINAZ *et al.*, 2009).

2.1.4.6 Estigmasterol

O estigmasterol é um composto químico de natureza esteroidal triterpenóide, considerado um dos mais difundidos entre as espécies vegetais superiores, assim como o β -sitosterol e o campesterol (PRIDHAM, 1967; HELLGREN e SANDELIUS, 2001). É tido como ativo anti-enrijecimento, baseado no saneamento do sintoma desenvolvido em cobaias com síndrome de deficiência de origem dietária. O seu isolamento primordial foi realizado em 1906 por Windaus e Hauth, a partir de fava de Calabar. Posteriormente, foi isolado da mistura de esteróides do óleo de soja, na proporção de 12 a 25 % da fração não saponificável. A sua obtenção para fins comerciais é procedida a partir da mistura de fitoesteróis da soja ou sementes de fava de Calabar (*Physostigma venenosum*) (FIESER, 1959; WINDHOLZ *et al.*, 1983).

Assim como outras substâncias esteroidais naturais (sarsapogenina, ergosterol, sarmentogenina, ácido cólico), o estigmasterol é utilizado para a síntese de hormônios esteroidais, os quais são utilizados para tratamentos médicos em seres humanos, especialmente a cortisona. Sua presença em grande quantidade na mistura de esteróides do óleo de soja fez do estigmasterol uma das matérias-primas mais abundantes para a síntese de hormônios esteroidais (FERGUSON, 1956; FIESER, 1959).

2.2.1 Fluido supercrítico (FSC)

A utilização de fluidos supercríticos foi reportada pela primeira vez no pioneiro trabalho de Hannay e Hogarth no encontro da Royal Society of London em 1879, no qual é descrita uma de suas habilidades: dissolver materiais sólidos de baixa volatilidade. Porém, somente a partir da década de 70, os FSC tornaram-se alvo de um maior interesse por parte de comunidade científica (GOSMANN *et al.*, 1989).

O estado supercrítico é atingido quando a temperatura e a pressão a que uma substância é submetida são elevadas ao seu ponto crítico. A partir deste, não existe mais distinção entre a fase gasosa e a líquida, e o fluido não é liquefeito com o aumento da pressão, nem tampouco é transformado em gás pelo aumento da temperatura (SHIVONEN *et al.*, 1999).

No diagrama $P \times T$ para uma substância pura, apresentado na Figura 8, pode-se visualizar três partes distintas: a linha que corresponde à sublimação, que vai até o ponto comum entre as três fases (ponto triplo); a bifurcação a partir deste ponto origina a linha de fusão e a linha de vaporização. O avanço na linha de vaporização conduz à existência de um outro ponto, conhecido como ponto crítico. A região de fluido supercrítico no diagrama $P \times T$ representa a região de interesse da extração supercrítica (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

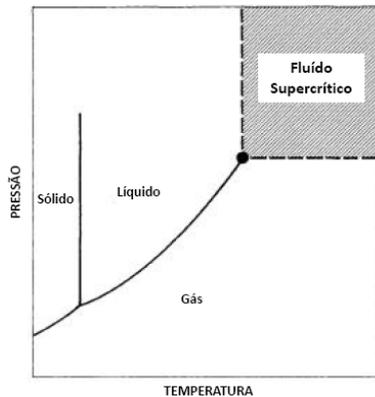


Figura 8. Diagrama de fases para uma substância pura (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

A pressão crítica é definida como a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido a um gás pelo aumento da temperatura. Analogamente, a temperatura crítica é considerada a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido a um líquido pelo aumento da pressão. Desta forma, acima do ponto crítico, variações de pressão e de temperatura não modificam a fase do fluido, e ele adquire propriedades intermediárias àquelas apresentadas na forma de gás e de líquido (Tabela 1) (RIZVI *et al.*, 1986a).

Tabela 1. Propriedades físicas das substâncias no estado gasoso, líquido e supercrítico (RIZVI *et al.*, 1986a).

Estado	Massa Específica [g/cm ³]	Difusividade [cm ² /s]	Viscosidade [g/cm.s]
Gás	(0,6 - 2,0)x10 ⁻³	0,1 - 0,4	(1,0 - 3,0)x10 ⁻⁴
Supercrítico	0,2 - 0,5	0,7x10 ⁻³	(1,0 - 3,0)x10 ⁻⁴
Líquido	0,6 - 1,6	(0,2 - 2,0)x10 ⁻⁵	(0,2 - 3,0)x10 ⁻²

A combinação destas propriedades singulares é a responsável pelas altas taxas de transferência de massa observadas quando fluidos supercríticos são empregados como solventes. As altas densidades conferem ao fluido supercrítico um grande poder de solubilização (uma característica de líquidos), enquanto que os baixos valores de viscosidade combinados aos altos valores de difusividade (propriedades de transporte dos gases) conferem ao fluido supercrítico poder de penetração na matriz do sólido. Na região supercrítica próxima a pressão crítica, a densidade é semelhante à densidade do gás (menor do que a do estado líquido), porém nesta região pequenas variações de pressão e temperatura provocam grande variação na densidade. Este fato pode ser utilizado com vantagens num processo de separação fracionada (STUART, 1995).

2.2.2 Processo de extração a altas pressões

Qualquer processo físico que dependa ou resulte em diferenças no potencial químico, é amplamente adequado como técnica de separação. Exemplos destas técnicas são a destilação, a absorção gasosa e a extração líquida, cujas teorias são bem conhecidas. Atualmente, a atenção tem sido voltada para técnicas alternativas, como a extração utilizando altas pressões. Isto é resultado das propriedades dos solventes quando no estado supercrítico e da crescente disponibilidade de

equipamentos para operar em pressões elevadas. Com isto, a extração com solvente no estado gasoso tem se tornado constante objetivo de estudo, com possibilidades de aplicação bem atrativas (STUART, 1995).

Na extração a altas pressões o solvente normalmente é fornecido ao sistema por cilindros sifonados (A) de solvente liquefeito mantido sob pressão. A pressão de operação, se superior à do cilindro, pode ser obtida por uma bomba (D) ou um trocador de calor, e a temperatura de operação por um trocador de calor (C). A matriz do soluto é “lavada” pelo solvente no extrator (E) e a mistura solvente-soluto é submetida a uma descompressão por válvula redutora de pressão (G). Em ambos os casos, a mistura passa a ser gás-soluto, o último é precipitado e recolhido no tubo coletor (F), este processo é interrompido quando não se nota mais alteração da massa de soluto no tubo. A Figura 9 mostra esquematicamente o processo de extração a altas pressões.

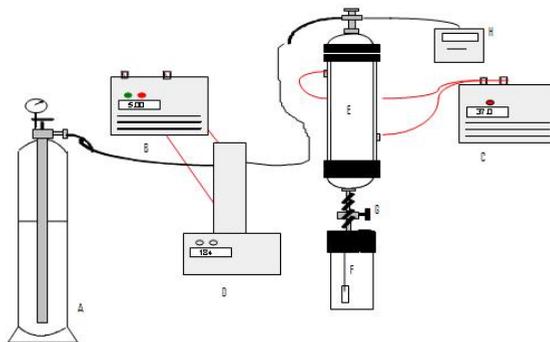


Figura 9. Esquema representativo do processo de extração supercrítica.

O processo de extração com fluido supercrítico se apresenta como um método de grande importância para indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, devido à possibilidade de obter novos produtos sem resíduos tóxicos decorrentes do processo de extração, nem degradação de princípios ativos, e com elevado grau de pureza. Vários estudos sobre extrações de óleos essenciais têm sido publicados utilizando matrizes vegetais como sementes, frutos, folhas, flores, rizomas, raízes, cascas de frutas, e galhos de árvores (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

2.2.3 Seleção do solvente

A complexidade química das substâncias presentes em diversos produtos, e sua vulnerabilidade para reagir e degradar a elevadas temperaturas, enfatiza as considerações a serem feitas numa seleção de solventes gasosos empregados nos processos de extração a alta pressão (FERREIRA, 1996).

A Tabela 2 apresenta as propriedades críticas de alguns compostos utilizados em processos de extrações a altas pressões. Pode-se observar que o dióxido de carbono possui características críticas relativamente brandas ($T_c = 31,2\text{ }^\circ\text{C}$ e $P_c = 73,8\text{ bar}$).

Tabela 2. Propriedades críticas de alguns solventes (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

Solvente	T_c [K]	P_c [bar]	ρ_c [g/cm ³]
CO ₂	304,2	73,8	0,468
Etileno	282,4	50,4	0,218
Etano	305,3	48,8	0,203
Água	647,3	220,5	0,322

Qualquer substância pode ser usada como solvente supercrítico, porém fatores como a viabilidade técnica (propriedades críticas), toxicidade, custo, poder de solvatação e disponibilidade a alta pureza irão determinar qual o mais adequado para o processo. De todos os fluido possíveis utilizados em extrações supercríticas, o dióxido de carbono é o mais empregado devido apresentar vantagens como ser atóxico, seguro, de fácil remoção do produto, custo baixo, não é inflamável e por apresentar características críticas moderada.

O CO₂ quando utilizado na extração de óleos demonstra boa solubilidade devido à baixa polaridade, não altera as propriedades nutricionais do óleo produzido, e não deixa resíduos do solvente no extrato (BRUNETTI *et al.*, 1989; REVERCHON e OSSÉO, 1994). O dióxido de carbono é um solvente particularmente atrativo para aplicações farmacêuticas, química e alimentos, pois além de atender aos critérios para escolha do solvente, apresenta certas características que comprovam a sua habilidade e justificam seu uso. O CO₂ supercrítico é completamente miscível com hidrocarbonetos de baixo peso molecular e compostos orgânicos oxigenados. Sua solubilidade mútua com a água é pequena, o que possibilita sua utilização na extração de compostos

orgânicos de soluções aquosas. Tem alta volatilidade, comparado com qualquer composto orgânico, facilita a separação e possibilita a recuperação do produto e sua recirculação como solvente. As propriedades de transporte são boas, pois tem baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Com seu baixo calor de vaporização, especialmente perto do ponto crítico, o requerimento de energia em muitos processos é baixo (STUART, 1995).

O dióxido de carbono pode existir no estado líquido nas faixas de 218 a 304 K e de 5 a 74 bar. Isto possibilita grandes variações nas condições de operação (relativamente amenas) para a sua utilização no estado líquido. No estado líquido o CO₂ é miscível com todos os solventes líquidos comuns, do metanol ao pentano, e com hidrocarbonetos monoterpênicos puros, monoterpênicos aldeídicos e todos os ácidos carbônicos líquidos. Além disto, como os óleos essenciais são formados principalmente por hidrocarbonetos terpênicos e monoterpênicos, a presença destes compostos torna os óleos essenciais solubilizáveis pelo dióxido de carbono liquefeito (STUART, 1995).

Outros gases além do CO₂ podem ser usados como solventes na extração supercrítica, porém, por apresentarem custos mais elevados, toxicidade, inflamabilidade, entre outras razões são pouco utilizados (MAUL *et al.*, 1998; ILLÉS *et al.*, 2000).

2.3 Modelagem matemática das extrações a altas pressões

Um dos meios de compreensão e descrição do processo de extração supercrítica consiste na construção de modelos matemáticos, os quais podem ser obtidos a partir dos mecanismos de transferência de massa e da termodinâmica de equilíbrio de fases para altas pressões. A maioria dos modelos de extração supercrítica propostos pela literatura considera apenas a mistura binária, ou seja, o dióxido de carbono como solvente e o extrato como sendo um pseudo componente. O comportamento cinético de um processo de extração é controlado pelos mecanismos de transporte de massa que determina a taxa na qual o material é extraído de uma partícula. A otimização dos processos de extração supercrítica necessita do conhecimento de propriedades termodinâmicas (solubilidade e seletividade) e propriedades cinéticas (taxa com que o soluto é transferido para a fase supercrítica), para fazer possível a predição da viabilidade de processos de extração a altas

pressões em escala industrial (REVERCHON, 1997; MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

O processo de extração depende de condições de operação tais como temperatura, pressão, vazão de solvente, morfologia do material, tratamento prévio da matriz sólida e das propriedades físicas do leito fixo como a porosidade, distribuição de tamanho de partícula, conteúdo inicial de soluto na matriz sólida e altura do leito fixo (RIBEIRO, 2007).

Vários modelos de transferência de massa estão disponíveis na literatura e são utilizados para descrever as curvas de extração obtidas de dados experimentais. Reverchon (1997) comparou diversos modelos, sendo que três destes foram empregados para a modelagem matemática de extração supercrítica de óleos essenciais: modelos empíricos, modelos baseados em analogias de transferência de calor e modelos baseados na integração do balanço de massa diferencial.

Em relação aos modelos empíricos, Reverchon (1997) cita alguns autores que representaram o rendimento da extração em função do tempo de extração em termos de uma equação empírica que considera um rendimento máximo num tempo infinito. Outros trataram a ESC como uma reação química e utilizaram uma constante cinética ao invés de relacionar transferência de massa e equilíbrio. As aproximações empíricas podem ser usadas quando faltam informações relacionadas ao mecanismo que rege o fenômeno de transferência de massa e de equilíbrio.

Nos modelos baseados em analogias com a transferência de calor, a ESC é tratada como um fenômeno de transferência de calor, onde cada partícula do vegetal é considerada como uma bola quente, resfriando numa média uniforme. Assumindo que os componentes extraídos estão uniformemente distribuídos dentro das partículas, e todas as partículas estão nas mesmas condições de extração, pode-se aplicar analogias de transferência de calor. A partir da transformada de Fourier, da segunda Lei da Difusão de Fick e do balanço de massa através da superfície das partículas, pode-se obter um modelo que, ao ser resolvido, descreve a curva de rendimento da ESC de óleos essenciais. Porém, segundo Reverchon (1997), modelos deste tipo tendem a superestimar o rendimento da extração, visto que desprezam as interações entre as partículas.

Por fim, modelos baseados na integração do balanço de massa diferencial ao longo de um leito de extração têm sido muito utilizados para descrever o comportamento da ESC de óleos essenciais de vegetais. Os modelos de balanço de massa propostos na literatura foram desenvolvidos considerando a dispersão axial desprezível, a densidade e vazão do solvente constante ao longo do leito e ainda, considerando que o óleo essencial pode ser modelado como um pseudo componente. Dentre estes, o modelo proposto por Sovová (2005), o qual é composto de um sistema de três equações diferenciais parciais, constituído por equações de balanço de massa e resolvido por integração numérica, se apresenta como um dos mais utilizados para modelagem de dados da ESC de óleos vegetais devido à simplicidade e eficiência (REVERCHON, 1997).

2.3.1 Modelo de Sovová (2005)

O modelo proposto por Sovová (2005) é baseado em balanços de massas no leito de extração. O modelo considera que o óleo essencial está contido numa estrutura esférica, com células quebradas nas extremidades e células intactas no seu interior, onde r representa a fração volumétrica de células quebradas (eficiência da moagem). Assume-se que o soluto está uniformemente distribuído nas partículas sólidas não tratadas carregadas no extrator. O soluto facilmente acessível, devido às células quebradas, é diretamente transferido para a fase fluida, enquanto que o soluto contido nas células intactas primeiramente se difunde para as células quebrada e posteriormente para a fase fluida. Isso conduz a curvas de extrações com duas fases distintas relacionadas a cada um dos processos de transferência de massa. As características do leito (porosidade, área superficial específica, densidade aparente, densidade do fluido) permanecem inalteradas durante o processo de extração. Considera-se ainda que o escoamento se dá por fluxo em pistão, no sentido axial. Perdas de carga e gradientes de temperatura são negligenciáveis, bem como a transferência de massa devido à dispersão axial e radial. A fase fluida é uma mistura binária, constituída pelo solvente e o soluto, o qual é considerado como um pseudo componente.

Outra hipótese do modelo proposto é assumir que o equilíbrio entre o solvente e o soluto, no interior das células quebradas, é estabelecido durante a pressurização do extrator, ou seja, antes do início do processo de extração. Em contra partida, assume-se que a

concentração nas células quebradas permaneça inalterada e igual à concentração no material não tratado até o início da extração.

Sovová (2005) levou em conta diferentes padrões de fluxo e matrizes vegetais, o que proporcionou a descrição de várias situações distintas e possibilitou simplificações do modelo. Particularmente, quando não existe interação entre soluto-matriz, certa quantidade de soluto vai difundir das células intactas até as quebradas durante a extração do soluto facilmente acessível.

CAPÍTULO III

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e as metodologias utilizadas para o desenvolvimento do trabalho.

3.1 Materiais e reagentes

As amostras de erva-mate foram cedidas por uma indústria ervateira localizada no Rio Grande do Sul. Para os procedimentos de extração a altas pressões foi utilizado dióxido de carbono White Martins com 99,9 % de pureza. Os padrões cafeína, teobromina, esqualeno, vitamina E, estigmasterol, fitol e bifenila foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Foram preparadas soluções estoques de cada padrão (1000 µg/mL) em diclorometano e acondicionadas sob refrigeração. Os solventes (grau p.a.) utilizados foram adquiridos da Merck e foram bidestilados.

3.2 Métodos

3.2.1 Experimento de campo

Para obtenção das amostras, um experimento de campo foi montado nas dependências de uma indústria ervateira da região sul do país. O experimento dispunha de 14 plantas as quais foram mantidas sob mesmas condições de adubação e sob controle de intensidade de luz, conforme visualizado na Figura 10.



(a)



(b)

Figura 10. Experimento de campo: (a) plantas expostas ao sol e (b) plantas cobertas com sombrite (retém 75 % da luminosidade).

No início do experimento, as plantas tinham em torno de 7 anos de idade e foram podadas sob idênticas condições. Após a poda,

considerou-se todas as plantas como tendo tempo zero de idade de folhas. O efeito da idade de folha e época de colheita das amostras foi averiguado com coletas periódicas semestrais e possibilitou a análise de folhas com idade de 6, 12 e 18 meses, coletadas no período de inverno e verão. Amostras coletadas no mês de julho foram consideradas inverno, enquanto amostras coletadas no mês de janeiro consideradas verão. Para controle de intensidade de luz, parte das plantas foi coberta com uma tela de sombreamento (sombrite), a qual retém 75 % da luminosidade incidente, enquanto as plantas restantes ficavam expostas a pleno sol.

3.2.2 Preparo das amostras

Em cada uma das plantas, cerca de 600 g de folhas e ramos finos foram coletadas da parte superior, média e inferior. Após a coleta, as amostras foram secas em microondas sob potência máxima, em pequenos lotes com uma única camada de folhas (cerca de 20 g) por um período de 5 minutos. Para secagem foram empregados fornos de microondas domésticos (Panasonic NN-S56BK 800 w). Para cada uma das amostras, a umidade final do material foi determinada pela metodologia padrão da AOAC (1997), em estufa a 105 °C até atingir peso constante, apresentando valor médio de umidade de 3,00 ±0,18 %. Após secas, as amostras foram moídas, classificadas quanto à granulometria em peneiras da série Tyler (12-35 mesh), acondicionadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados, abrigadas da luz (frascos embalados com papel alumínio) e mantidos sob refrigeração.

3.2.3 Determinação das massas específicas

Foram determinadas as massas específicas aparente (ρ_l) e real (ρ_s) para as amostras de erva-mate utilizadas nas extrações.

3.2.3.1 Determinação da massa específica aparente

Com o objetivo de determinar a densidade aparente da erva-mate o extrator foi completamente carregado com a amostra. Como o volume interno do extrator e a massa de amostra eram conhecidos, a massa específica aparente foi determinada pela Equação I.

$$\rho_l = \frac{m}{v} \tag{I}$$

Onde:

ρ_l - densidade aparente (g/cm^3);

m - massa de amostra carregada no extrator (g);

v - volume interno do extrator (cm^3).

3.2.3.2 Determinação da massa específica real

A massa específica real (ρ_s) foi determinada no Laboratório de Materiais da UFSC (LabMat), onde foram realizados cinco ensaios da técnica de picnometria por gás hélio em equipamento Quantachrome modelo 1000.

3.2.4 Determinação da porosidade do leito

Conhecendo-se as massas específicas real (ρ_s) e aparente (ρ_l), para a amostra de erva-mate, foi possível determinar a porosidade do leito com a Equação II a seguir:

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{\rho_l}{\rho_s} \right) \quad (\text{II})$$

Onde:

ε - porosidade do leito;

ρ_l - densidade aparente (g/cm^3);

ρ_s - densidade do sólido (g/cm^3).

3.2.5 Determinação da densidade do solvente

Para cada uma das condições de temperatura e pressão as densidades do dióxido de carbono foram obtidas de dados fornecidos por Angus *et al.* (1976).

3.2.6 Determinação da solubilidade experimental

A solubilidade do extrato de erva-mate no dióxido de carbono a altas pressões foi determinada utilizando-se um método dinâmico, caracterizado por ter uma das fases do sistema sujeita a um

deslocamento em relação à outra. A solubilidade experimental foi determinada nas condições de temperatura e pressão as quais foram realizadas as extrações. Inicialmente o soluto foi pressurizado no leito e se aguardava em torno de 60 minutos para que o sistema atingisse o equilíbrio. Desta forma, no início do processo de extração o solvente estará saturado. Com os dados experimentais são traçadas as curvas de massa de extrato obtida e massa de solvente consumido ao longo do tempo de extração. A solubilidade experimental é então calculada utilizando-se apenas a parte linear das curvas obtidas, conforme a Equação III a seguir:

$$S_e = \frac{a_{extrato}}{a_{solvente}} \quad (III)$$

Onde:

S_e - solubilidade experimental ($g_{extrato}/g_{solvente}$);

$a_{extrato}$ - coeficiente angular da curva de massa de extrato extraída em função do tempo;

$a_{solvente}$ - coeficiente angular da curva de massa de CO_2 consumido em função do tempo.

3.2.7 Condições experimentais propostas

Foram definidas condições distintas para avaliar a influência das variáveis de extração e do cultivo da erva-mate sobre a composição do extrato obtido.

3.2.7.1 Proposta para análise das condições de operação de extração da erva-mate com CO_2 pressurizado

Para avaliar as variáveis de extração foram estabelecidas condições experimentais com dois níveis em temperatura e quatro níveis de pressão, conforme mostra a Tabela 3. Foram avaliados os efeitos das variáveis na extração com CO_2 pressurizado sobre o rendimento de extrato de erva-mate e sua solubilidade no dióxido de carbono, bem como sobre os teores dos compostos de interesse. Em cada um dos experimentos realizados, as variáveis, vazão de solvente e massa de

amostra, foram mantidas constantes em 2,0 g/min e 28 g, respectivamente.

Tabela 3. Condições experimentais propostas para análise das variáveis na extração com CO₂ pressurizado.

		Pressão [atm]			
		100	150	200	250
Temperatura [°C]	20	20 – 100	20 – 150	20 – 200	20 – 250
	40	40 – 100	40 – 150	40 – 200	40 – 250

3.2.7.2 Proposta para análise das variáveis de cultivo da erva-mate

Para avaliar os efeitos das variáveis de cultivo da erva-mate sobre o rendimento de extrato e teores dos compostos de interesse os experimentos foram conduzidos na condição de 30 °C e 175 atm.

3.2.8 Procedimento de extrações com CO₂ pressurizado

As extrações a altas pressões foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões (URI), campus de Erechim, RS, em uma unidade experimental de bancada, como mostra a Figura 11. A unidade experimental para obtenção do extrato de erva-mate com dióxido de carbono a alta pressão consiste de um cilindro de CO₂, dois banhos termostáticos (Quimis), uma bomba de alta pressão (Syringe pump, ISCO 260D), um extrator encamisado com volume interno aproximado de 100 ml, tubo coletor, uma válvula micrométrica e um transdutor absoluto de pressão (Smar LD 301).

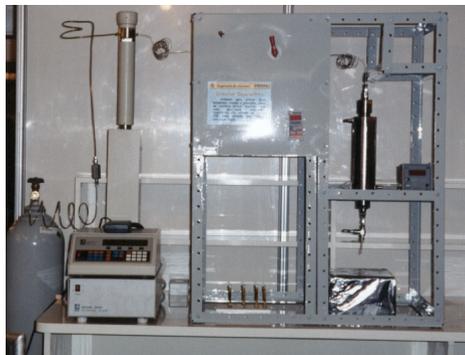


Figura 11. Unidade experimental utilizada nas extrações com CO₂ a altas pressões.

Para realização dos experimentos, utilizou-se um extrator de aço inox com 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura. Cerca de 28 g de amostra foram carregadas no seu interior e mantidas por duas peneiras de 300 mesh, fixadas em ambas às extremidades. Após o fechamento do extrator e conexão a linha, a temperatura foi ajustada no banho termostático. A condição de pressão do experimento foi alcançada com auxílio da bomba de seringa (Syringe pump, ISCO 260D). Antes de iniciar a coleta do extrato o sistema foi estabilizado por cerca de 60 minutos. Após este período a válvula micrométrica do equipamento foi aberta e o extrato de erva-mate coletado em períodos de tempo pré-determinados (20 minutos), sendo a massa de extrato determinada por pesagem em balança analítica. Em seguida, o tubo coletor foi reconectado ao equipamento e este procedimento repetido até quando o tempo pré-estabelecido fosse atingido. A vazão do CO₂ foi mantida constante em torno de 2,0 g/min. O tempo de extração foi estabelecido em 320 minutos após a realização de testes preliminares, os quais demonstraram que a partir deste já se atinge a etapa de taxa de extração constante. Uma corrida experimental teve duração aproximada de 8 horas entre carregamento, extração, despressurização e descarga do extrator. As curvas experimentais de extração foram construídas através da massa total de extrato de erva-mate em função da massa de dióxido de carbono utilizada, a qual foi monitorada pelo volume do solvente consumido na bomba.

3.2.9 Caracterização química dos extratos

Os procedimentos e condições cromatográfica para análise química dos extratos de erva-mate foram obtidas de Jacques *et al.* (2004). Para cada um dos extratos obtidos a altas pressões foram preparadas amostras de 40000 mg/L em diclorometano, contendo 100 mg/L de padrão interno (bifenila), que foram armazenadas em frascos de vidros sob atmosfera inerte até o momento das análises. Os extratos foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (SHIMADZU QP5090A). O volume de injeção foi de 1 µL no modo split (1:10), com temperatura do injetor de 290 °C e da interface 310 °C. Gás hélio (He) foi empregado como gás de arraste com fluxo de 1 ml/min. Foi utilizada coluna capilar DB-5 com dimensões de 30 m, 0,25 mm, 25 µm e condições de corrida cromatografica: 70 °C/3 min, 3 °C/min até 230 °C, 4 °C/min até 310 °C/15 min. A energia do detector foi de 1,0 kv. Todas as injeções foram realizadas em triplicata. Para análise dos efeitos sobre os constituintes

químicos da erva-mate, foram selecionados seis compostos de interesse: cafeína, teobromina, fitol, esqualeno, vitamina E e estigmasterol. As áreas de todos os compostos identificados foram normalizadas pela área do padrão interno.

3.2.10 Modelagem dos dados experimentais

O modelo Sovová (2005) foi testado de modo a descrever os dados experimentais obtidos nas extrações de erva-mate a altas pressões. O somatório do erro quadrático dos rendimentos experimentais e calculados para o modelo foi determinado de acordo com a Equação IV.

$$SEQ = \left(\frac{1}{NP} \right) \sum_{i=1}^{NP} (e_{\text{exp}} - e_{\text{cal}})^2 i \quad (\text{IV})$$

Onde:

NP – número de pontos experimentais;

Os parâmetros do modelo desenvolvido por Sovová (2005) foram ajustados utilizando a técnica de algoritmos genéticos baseado no trabalho de Claumann (1999), para estimar coeficientes.

Sovová (2005) considera que a extração supercrítica pode ser dividida em duas etapas distintas. Na primeira, predomina o soluto de fácil acesso (extrato exposto), em que a resistência à transferência de massa encontra-se na fase fluida, enquanto na segunda etapa, o extrato de fácil acesso esgota-se, predominado o processo difusivo de extração do extrato contido no interior das células. Neste modelo de equilíbrio, a primeira e a segunda fase da curva de extração são representadas pelas Equações V e VI, respectivamente.

$$e_{\text{cal}} = q \cdot \frac{K \cdot x_u}{1 + K \cdot (\gamma / r)} = q \cdot y_o \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (\text{V})$$

$$e_{\text{cal}} = x_u \cdot [1 - C_1 \cdot \exp(-C_2 \cdot q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (\text{VI})$$

Onde:

e_{cal} – rendimento estimado pelo modelo;

K - coeficiente de partição;

x_u - concentração de soluto na amostra não tratada ($g_{soluto}/g_{sólido}$);

r - eficiência de moagem;

γ - relação de solvente-matriz sólida no leito ($g_{CO2}/g_{sólido}$);

y_o - solubilidade do extrato no CO_2 ($g_{extrato}/g_{CO2}$);

q - quantidade relativa de solvente consumido ($g_{CO2}/g_{sólido}$);

q_c - quantidade relativa de solvente consumido quando todo o soluto disponível nas células quebradas foi extraído ($g_{CO2}/g_{sólido}$);

C_1 e C_2 – constantes de ajuste do modelo.

Neste trabalho, os valores de x_u e q_c foram obtidos das curvas experimentais. Para determinar x_u , levaram-se em consideração os dados obtidos nas corridas de extração as quais obtiveram as maiores massas de extrato. A partir destes, definiu-se x_u igual a $0,010 g_{soluto}/g_{sólido}$, o qual foi considerado constante para todas as condições. Para determinar q_c , traçou-se uma reta na parte linear de cada uma das curvas de extração, sendo que o ponto de transição era definido no melhor ajuste encontrado. Em cada experimento eram conhecidos os dados de massa de amostra, densidade do fluido, porosidade do leito, tempo de extração, fluxo de solvente, temperatura e pressão. Com o valor de x_u conhecido, foi possível determinar a quantidade de extrato contido na amostra não tratada (c_u) (Equação VII) e posteriormente a quantidade de sólido insolúvel (N_m) (Equação VIII).

$$c_u = \frac{x_u}{(1 + x_u)} \quad (VII)$$

$$N_m = (1 - c_u).m \quad (VIII)$$

Onde:

c_u – quantidade de soluto contido no sólido não tratado ($g_{soluto}/g_{amostra}$);

N_m – massa de sólido insolúvel ($g_{sólido}$);

m – massa de amostra (g);

Nota-se que inicialmente o equilíbrio está representado pela solubilidade do extrato no CO₂ (y_0), obtida da inclinação da parte linear da curva de extração, e relacionada com a quantidade de extrato disponível devido a quebra das células durante a trituração das amostras (r). Da segunda parte das curvas de extração são obtidas as constantes de ajuste do modelo, C_1 e C_2 , as quais possibilitam estimar os parâmetros de transferência de massa utilizando as Equações IX e X.

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 \cdot q_c / 2) \quad (\text{IX})$$

$$k_s a_s = (1 - r) \cdot (1 - \varepsilon) \cdot Q \cdot C_2 / N_m \quad (\text{X})$$

Onde:

- $k_s a_s$ – parâmetro de transferência de massa etapa difusiva;
- k_s – coeficiente de transferência de massa na fase sólida (s^{-1});
- a_s – área específica entre a região de células intactas e quebradas (m^{-1});
- ε - porosidade do leito;
- Q – vazão mássica de solvente (g/cm^3).

Para estimar os parâmetros, x_u e q_c eram conhecidos, sendo o C_2 determinado de forma a minimizar a função objetiva do erro quadrático (Equação IV). De posse destes, a constante C_1 foi calculada.

As equações de balanço de massa, condições iniciais e condições de contorno utilizadas pelo modelo Sovová (2005) são apresentadas em anexo (Anexo I).

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões em relação aos dados obtidos na extração de erva-mate utilizando CO₂ a altas pressões.

4.1 Massas específicas aparente e real

A massa específica aparente (ρ_l) das amostras de erva-mate utilizadas nas extrações foi determinada com auxílio da Equação I, em 0,291 g/cm³. Já para a massa específica real (ρ_s), determinada por picnometria com gás hélio, o valor encontrado foi de 1,080 g/cm³.

4.2 Porosidade do leito

A partir da Equação II foi calculada a porosidade do leito de 0,729 para os experimentos de extração realizados.

4.3 Extrações de erva-mate com CO₂ a altas pressões

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de temperatura e pressão na extração de erva-mate com CO₂ pressurizado. Avaliou-se também os efeitos da intensidade de luz, idade de poda das folhas e época de colheita sobre a extração de compostos da erva-mate. Foram traçadas as curvas de extração (massa de extrato em função da massa de CO₂ utilizado) as quais possibilitaram a avaliação da influência de cada uma das variáveis sobre o rendimento das extrações. O rendimento das extrações (e_{exp}) foi obtido a partir da Equação XI:

$$e_{exp} = \left(\frac{m_{extrato}}{m} \right) \cdot 100 \quad (XI)$$

Onde:

e_{exp} – rendimento experimental (g_{extrato}/100g_{amostra});

$m_{extrato}$ – massa de extrato (g);

m – massa de amostra (g)

4.3.1 Influência das condições de operação sobre o rendimento de extrato de erva-mate

Para avaliar a influência das condições de operação sobre o rendimento foram utilizadas amostras de erva-mate com 6 meses de idade de folhas, cultivadas expostas ao sol, sem adubação auxiliar e coletadas durante o período de inverno. A Tabela 4 apresenta as condições de operação, rendimentos médios e desvio padrão obtidos para cada uma das corridas experimentais realizadas. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicatas, totalizando 18 corridas de extrações.

Tabela 4. Condições experimentais e rendimentos médios obtidos nas extrações com CO₂ a altas pressões de erva-mate (6 meses).

Corrida	T [°C]	P [atm]	Densidade [g/cm ³]	e_{exp} [g _{extrato} /100g _{amostra}]	
1	20	100	0,854	0,37 ±0,04	Subcrítico
2	20	150	0,904	0,48 ±0,04	
3	20	200	0,937	0,45 ±0,07	
4	20	250	0,963	0,53 ±0,03	
5	30	175	0,870	0,64 ±0,05	
6	40	100	0,612	0,18 ±0,11	Supercrítico
7	40	150	0,780	0,64 ±0,09	
8	40	200	0,840	0,85 ±0,09	
9	40	250	0,880	0,84 ±0,04	

Na Tabela 4, pode-se verificar que a densidade do solvente sofre uma grande variação dentro da faixa investigada (0,612 a 0,963 g/cm³). Da mesma forma, o rendimento de extrato variou consideravelmente em função da temperatura e pressão empregada. A condição de 200atm e 40 °C atingiu 0,85 g_{extrato}/100g_{amostra} e foi a que apresentou maior rendimento de extrato de erva-mate.

Outro fator observado é que para as pressões de 150, 200 e 250 atm, o aumento da temperatura de 20 para 40 °C, produziu um acréscimo no rendimento de extrato obtido, apesar da queda na densidade do solvente. Tal fato não foi verificado na pressão de 100 atm, onde o aumento da temperatura conduziu a uma redução no rendimento da extração, já que nesta condição, o efeito de queda da densidade é muito mais pronunciado (0,854 a 0,612 g/cm³).

As propriedades do solvente como densidade, viscosidade e difusividade são alteradas quando ocorrem mudanças na pressão e/ou temperatura do processo. O aumento da pressão conduz a maiores densidades, característica que favorece o rendimento da extração, por outro lado, menores difusividades e maiores viscosidades são obtidos, o que desfavorece o processo. Já em relação à temperatura, seu acréscimo ocasiona uma diminuição da densidade, desfavorecendo a obtenção do extrato, mas também um aumento da difusividade e diminuição da viscosidade, características as quais favorecem o processo de extração de compostos. O aumento de temperatura também provoca um aumento na pressão de vapor do extrato, favorecendo o incremento do rendimento na extração (McHUGH e KRUKONIS, 1994). Assim, conforme apresentado na Figura 12, fica evidente o quanto o efeito da temperatura e da pressão é complexo no processo de extração com CO₂ pressurizado, sendo que a sinergia entre as características citadas acima, determinará o rendimento de extrato em cada uma das condições experimentais.

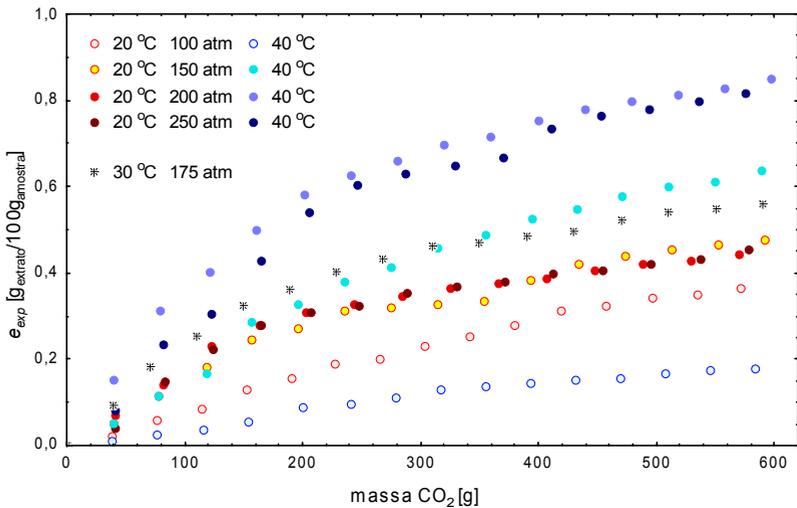


Figura 12. Curvas de extração da erva-mate com 6 meses de idade da folha sob diferentes condições de temperatura e pressão.

A influência da pressão sobre o rendimento de extrato pode ser evidenciada observando as Figuras 13 e 14. Os dados da Figura 14 mostram que na temperatura de 40 °C, o aumento da pressão resulta em um pronunciado acréscimo no rendimento de extrato, pois ocorre um

significativo aumento da densidade do solvente. Na temperatura de 20 °C, conforme mostra a Figura 13, nas pressões de 150, 200 e 250 atm, observa-se um aumento da massa de extrato em relação a extração a 100 atm, porém praticamente não ocorre variação no rendimento obtido entre elas. Nesta temperatura, com o aumento da pressão, o acréscimo no valor da densidade não é tão significativo quando comparado à temperatura de 40 °C.

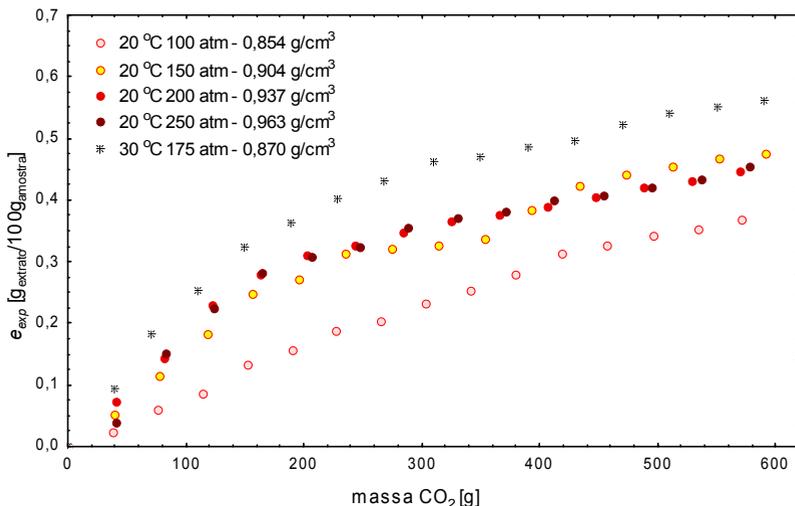


Figura 13. Influência da pressão nas curvas de rendimento da extração de erva-mate a 20 °C.

Resultado semelhante ao obtido pelo presente trabalho foi apresentado por Rodrigues *et al.* (2002), que avaliou o efeito das condições do processo sobre o rendimento de extrato de manjerona e orégano, obtidos por CO₂ em temperaturas na faixa de 20 a 40 °C e pressões de 100 a 200 bar. Tanto para o orégano, quanto para manjerona, maiores rendimentos de extrato foram obtidos na condição de 40 °C e 200 bar, sendo 1,32 e 1,45 g_{extrato}/100g_{amostra}, respectivamente.

Jacques *et al.* (2007) apresentaram a caracterização química dos extratos de folhas de erva-mate obtidos com CO₂ em temperaturas de 20 e 40 °C, e pressões de 100 e 250 bar. Os rendimentos de extrato variaram consideravelmente com as condições de operação, sendo que menores massas de extrato foram obtidas a 40 °C e 100 bar (0,53

$\text{g}_{\text{extrato}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$) e maiores quantidades na condição de 40 °C e 250 bar (2,46 $\text{g}_{\text{extrato}}/100\text{g}_{\text{amostra}}$). Ao visualizar os dados da Tabela 4 é possível perceber que o efeito das condições de operação sobre o rendimento de extrato da erva-mate foi o mesmo observado por Jacques *et al.* (2007), porém, no presente trabalho, quantidades muito inferiores de extrato foram obtidas. Tal fato pode estar relacionado com as condições de cultivo a que as plantas foram submetidas.

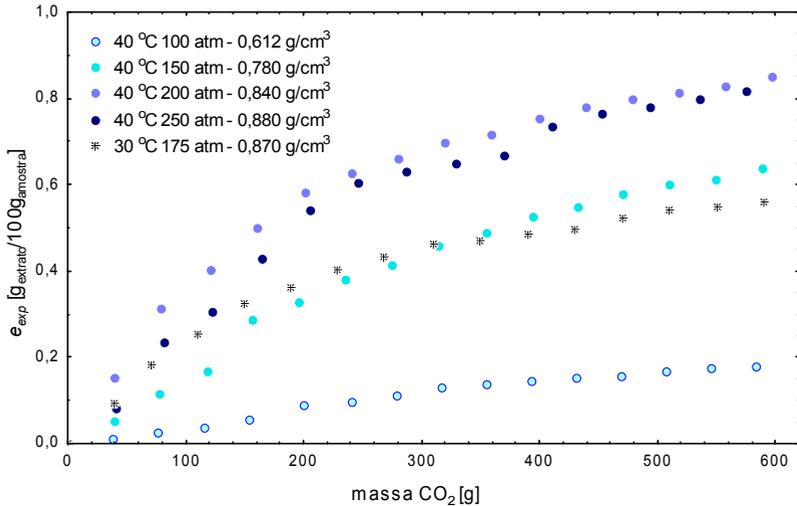


Figura 14. Influência da pressão nas curvas de rendimento da extração de erva-mate a 40 °C.

4.3.2 Influência das condições de cultivo sobre o rendimento das extrações

Para avaliar o efeito das condições de manejo da planta sobre o rendimento do extrato de erva-mate todos os experimentos foram conduzidos a 30 °C e 175 atm, com a densidade do CO₂ em torno de 0,870 g/cm³. Foram realizadas 12 corridas experimentais que possibilitaram avaliar a influência da idade de poda das folhas (6, 12 e 18 meses), época de colheita (inverno e verão) e a intensidade de luz a que as plantas estavam expostas (sol e sombreada). Amostras coletadas no mês de julho foram consideradas inverno, enquanto amostras coletadas no mês de fevereiro consideradas verão. Para controle de intensidade de luz, parte das plantas foi coberta com uma tela de sombreamento (sombrite), a qual retém 75 % da luminosidade incidente,

enquanto as plantas restantes ficavam expostas a pleno sol. Todos os experimentos foram replicados, sendo que os resultados de rendimento médio e desvio padrão obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Condições de cultivo da planta, média dos rendimentos e desvio padrão obtidos nas extrações utilizando CO₂ a 30 °C e 175 atm.

Corrida	Idade [meses]	Intensidade de Luz	Estação de Colheita	e_{exp} [g _{extrato} /100g _{amostra}]
10	6	Sombra	Inverno	0,20 ±0,02
11	6	Sombra	Verão	0,94 ±0,05
12	6	Sol	Inverno	0,56 ±0,04
13	6	Sol	Verão	1,38 ±0,04
14	12	Sombra	Inverno	1,20 ±0,06
15	12	Sombra	Verão	0,90 ±0,01
16	12	Sol	Inverno	1,96 ±0,18
17	12	Sol	Verão	1,59 ±0,04
18	18	Sombra	Inverno	0,94 ±0,06
19	18	Sombra	Verão	0,48 ±0,04
20	18	Sol	Inverno	1,69 ±0,08
21	18	Sol	Verão	1,11 ±0,09

Na Tabela 5 percebe-se que as condições de manejo a que as plantas são submetidas exercem grande influência sobre o rendimento de extrato obtido. A Corrida 16, com amostras de 12 meses, a pleno sol e coletada no inverno, propiciou rendimento de 1,96 g_{extrato}/100g_{amostra}, cerca de dez vezes superior ao obtido na Corrida 10, com amostras de 6 meses, sombreada e coletada no inverno, a qual atingiu 0,20 g_{extrato}/100g_{amostra}.

4.3.2.1 Influência da intensidade de luz e época de colheita no rendimento de extrato

A Figura 15 apresenta o efeito da intensidade de luz sobre o rendimento de extrato obtido em plantas com idade de poda de 6 meses coletadas no período de inverno e verão. De acordo com os resultados, para uma mesma época de colheita, a quantidade de extrato obtida de plantas submetidas ao sombreamento foi inferior, quando comparados aos rendimentos obtidos das plantas expostas a pleno sol.

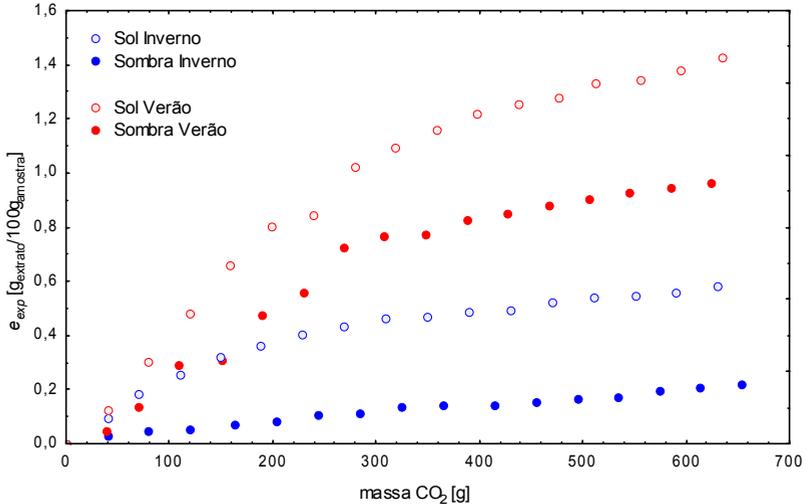


Figura 15. Curvas de extrações da erva-mate com 6 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.

As Figuras 16 e 17 apresentam o efeito da intensidade de luz de amostras coletadas no inverno e verão com idade de poda das folhas de 12 e 18 meses, respectivamente. Da mesma forma que nas amostras de 6 meses de idade, observa-se que independentemente da época de colheita das amostras de 12 e 18 meses, o sombreamento conduziu a uma queda no rendimento dos compostos extraídos. Assim, fica evidente que a maior intensidade de luz (exposição ao sol) aumenta consideravelmente o rendimento das extrações de erva-mate, independente da idade de poda e da época de colheita.

Jacques *et al.* (2007) também avaliaram o efeito da intensidade de luz sobre o rendimento de extrações com CO₂ a 30 °C e 175 bar de amostras de erva-mate com 18 meses de idade e sob diferentes condições de adubação, evidenciando que maiores quantidades de extrato foram obtidas de plantas expostas ao sol.

Segundo Vieira *et al.* (2003), as condições do microclima durante a época de colheita no inverno e da colheita no verão, juntamente com a radiação solar, exercem influência sobre a área folhar e produção de fitomassa, independente do estágio de desenvolvimento da planta.

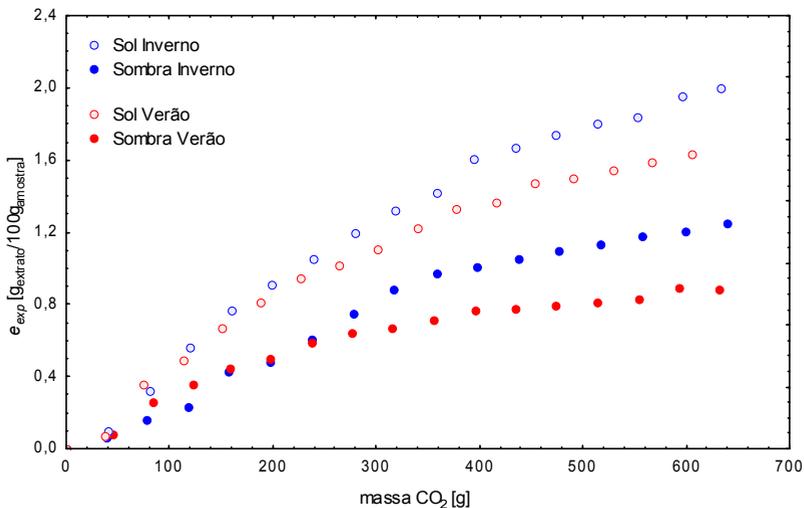


Figura 16. Curvas de extrações da erva-mate com 12 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.

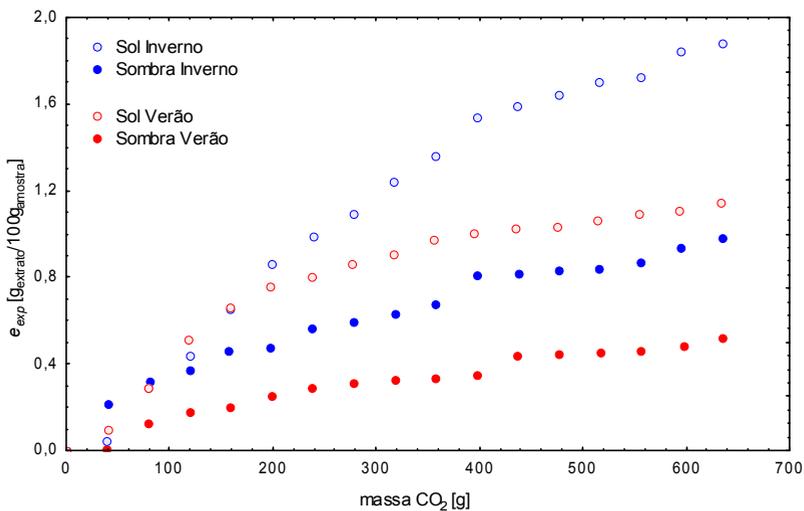


Figura 17. Curvas de extrações da erva-mate com 18 meses de idade de folha extraídos a 30 °C e 175 atm.

A Tabela 5 também apresenta a influência da época da colheita sob o rendimento do extrato de folhas de erva-mate com idade de 6, 12 e 18 meses, mantidas sob controle da intensidade de luz. Observa-se que plantas com idade de 12 e 18 meses (Figuras 16 e 17) possuem comportamento semelhante em relação à estação de colheita. Para estas, sempre que compararmos uma mesma condição de cultivo (idade de folha e intensidade de luz), maiores rendimentos de extratos foram obtidos de amostras coletadas no período de inverno. Por outro lado, as amostras de 6 meses (Figura 15) apresentaram comportamento inverso, onde maiores rendimentos foram obtidos de plantas coletadas durante o verão, tanto na sombra quanto no sol.

4.3.2.2 Influência da idade da folha no rendimento de extrato

A cada período de seis meses foram realizadas coletas de amostras as quais possibilitaram avaliar o efeito da idade de poda das folhas (6, 12 e 18 meses). Cabe ressaltar que as estações do ano inverno e verão também se alternam a cada seis meses, desta forma, no período dos 18 meses do teste para avaliação de idade da folha teremos amostras coletadas durante o inverno, bem como amostras coletadas durante o verão, sendo que a data do início das coletas vai determinar qual das estações vai predominar. Assim, foi possível avaliar a idade de poda sobre duas condições distintas em relação à época do ano no momento da coleta. Na primeira condição as plantas foram coletadas com 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno, enquanto na segunda condição tinham 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão.

Nas Figuras 18 e 19 é possível observar a influência da idade de poda sobre amostras com 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno, de plantas expostas a pleno sol e sombreadas, respectivamente. Nota-se que independente da intensidade de luz a que eram submetidas, o comportamento observado foi o mesmo, onde amostras de 6 meses inverno obtiveram os menores rendimentos, enquanto que entre as amostras de 12 meses verão e 18 meses inverno praticamente não ocorre variação no rendimento do extrato da erva-mate.

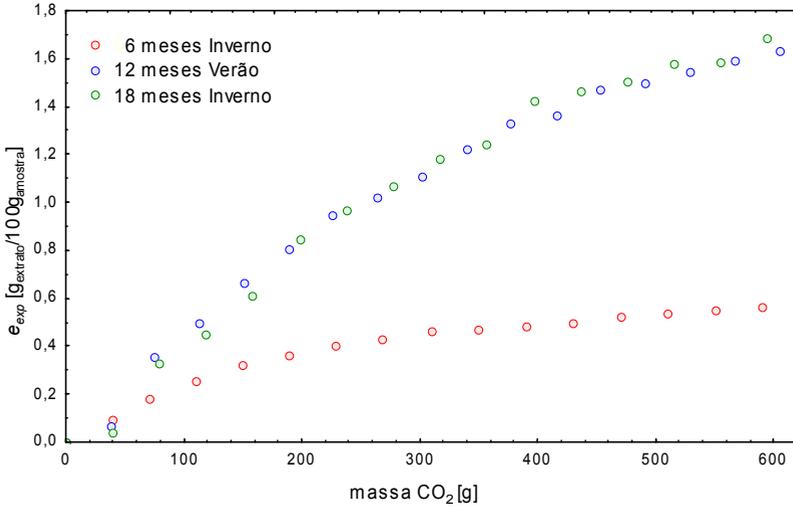


Figura 18. Curvas de extrações de amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno expostas a pleno sol.

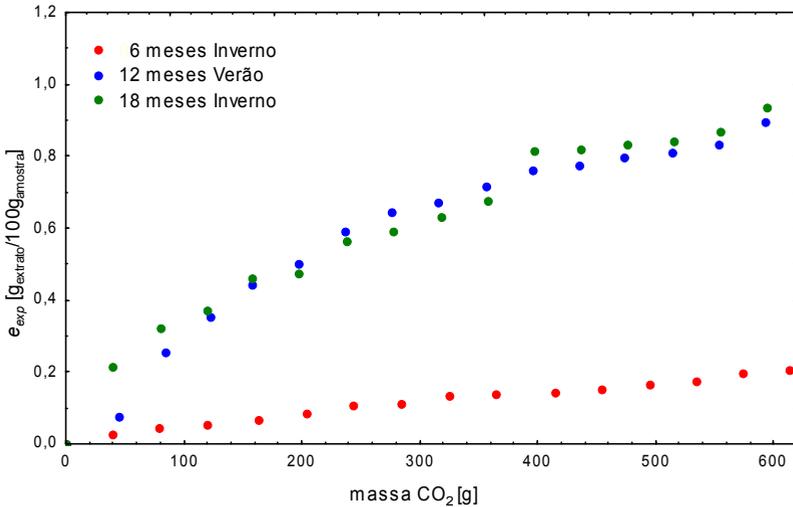


Figura 19. Curvas de extrações de amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno mantidas sob sombreamento.

Conforme pode ser visualizado nas Figuras 20 e 21, também foi avaliada a idade de poda das folhas nas condições de 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão, para plantas a pleno sol e sombreadas, respectivamente. O comportamento observado foi diferente do obtido na condição em que amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno foram avaliadas. Tal fato demonstra novamente a influência das estações do ano (inverno e verão) sobre o rendimento das extrações.

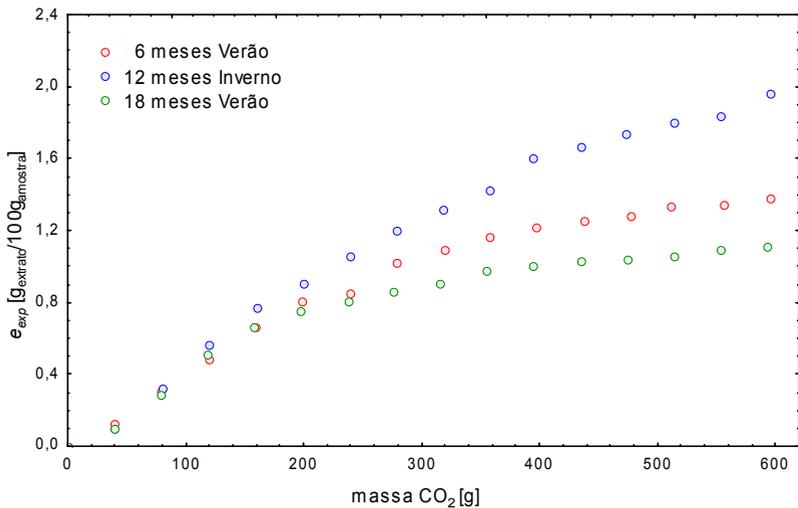


Figura 20. Curvas de extrações de amostras de 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão expostas a pleno sol.

A Figura 20 apresenta resultados oriundos de plantas expostas a pleno sol. Nesta, maiores rendimentos de extratos foram obtidos com amostras de 12 meses inverno, enquanto que o cultivo das plantas até a idade de 18 meses verão produziu rendimentos inferiores aos obtidos das amostras com 6 meses coletadas no verão. O mesmo comportamento foi observado quando as plantas foram mantidas sob sombreamento, conforme mostra a Figura 21.

Esmelindro *et al.* (2004) avaliaram o efeito da idade de folha de 6, 12, 18 e 24 meses sobre o rendimento da extração com CO₂ a 30 °C e 175 bar de plantas cultivadas sob sombreamento. Maiores quantidades de extrato foram obtidas em amostras com 18 meses, sendo que com 24 meses o rendimento é reduzido a valores similares aos apresentados por

amostras de 6 meses de idade da folha. Os resultados apresentados por Esmelindro *et al.* (2004) não podem ser comparados com os obtidos no presente trabalho, pois não levam em consideração a época de colheita das amostras, o qual exerce influência sobre o rendimento de extrato.

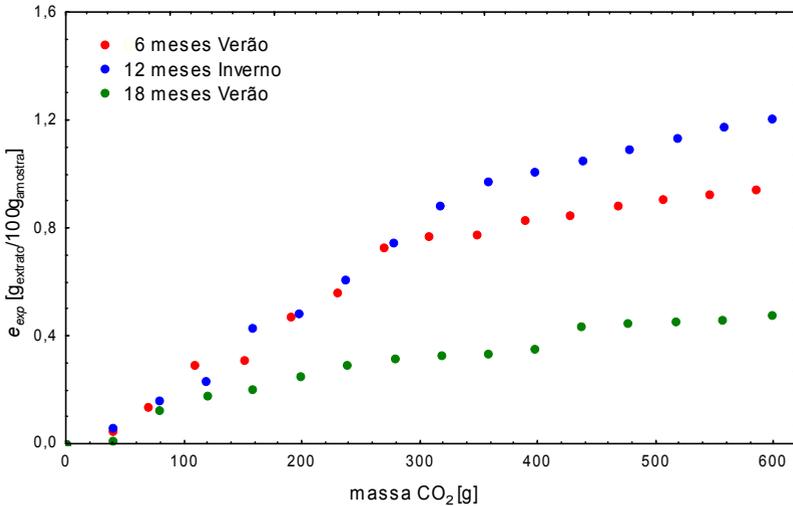


Figura 21. Curvas de extrações de amostras de 6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão meses mantidas sob sombreamento.

As condições experimentais apresentadas na Tabela 5 também permitiram avaliar a influência da idade de poda numa mesma época de colheita (inverno ou verão).

As Figuras 22 e 23 apresentam as curvas de rendimento de extrato obtido de amostras com 6, 12 e 18 meses sempre coletadas no verão e, expostas ao sol e sombreadas, respectivamente. Ao observar a Figura 23, percebe-se que quando as plantas são mantidas sob sombreamento, maior rendimento foi obtido em amostras com 6 meses, sendo que o aumento da idade de folha produz a redução progressiva no rendimento de extratos de erva-mate. Nas amostras coletadas no verão e expostas ao sol (Figura 22), maiores rendimentos foram obtidos em plantas com idade de folhas de 12 meses. Tanto em plantas sombreadas, quanto em plantas expostas ao sol, amostras de 18 meses apresentaram os menores rendimentos de extrato.

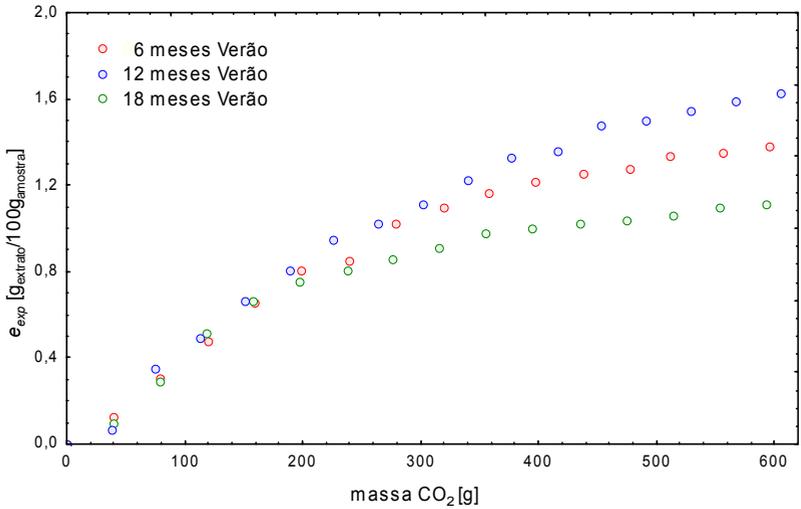


Figura 22. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no verão de plantas expostas a pleno sol.

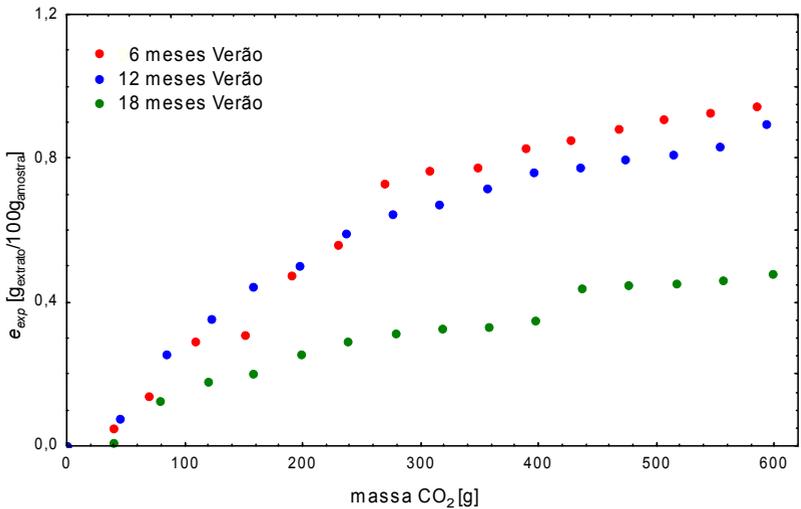


Figura 23. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no verão de plantas sob sombreamento.

A influência da idade de poda das folhas sobre o rendimento da extração de amostras coletadas no inverno é verificado na Figura 24, para plantas a pleno sol, e Figura 25, para plantas sombreadas. Quando são avaliadas apenas amostras coletadas durante o inverno, verifica-se que independente da condição de intensidade de luz a que são submetidas, plantas com 12 meses obtiveram maiores quantidade de extrato, enquanto que rendimentos muito inferiores foram obtidos de plantas com 6 meses de idade de folha.

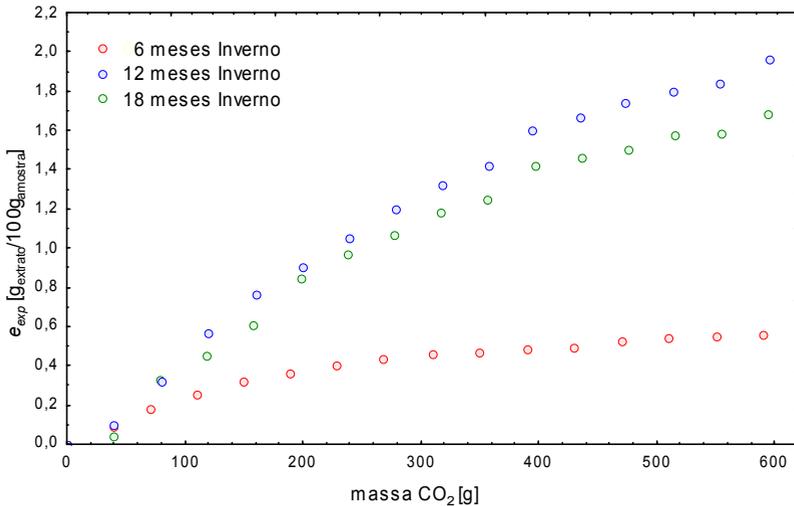


Figura 24. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletadas no inverno de plantas expostas a pleno sol.

Resultados distintos foram obtidos em relação à idade da folha das plantas coletadas no período de inverno e verão. No verão, plantas com 18 meses propiciaram os menores rendimentos de extratos, enquanto que plantas com 6 meses produziram elevados rendimentos. Entretanto, no inverno, plantas com 18 meses propiciaram rendimentos muito superiores as plantas com 6 meses de idade, sendo o máximo em rendimento obtido de plantas com 12 meses. Tal fato pode ser explicado devido a planta ter de enfrentar condições adversas impostas pelo clima do inverno logo nos seis primeiros meses de seu desenvolvimento.

Outro fato relevante que pode ser observado em relação à idade das folhas, é que em qualquer das avaliações realizadas, o rendimento de extrato de plantas com 18 meses se apresentou menor ou muito próximo

do obtido de plantas com 12 meses de idade da folha. Tal fato pode ser explicado pelo tempo de vida útil das folhas. Segundo Mosele (2002), em torno de 18 meses ocorre o processo de renovação das folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

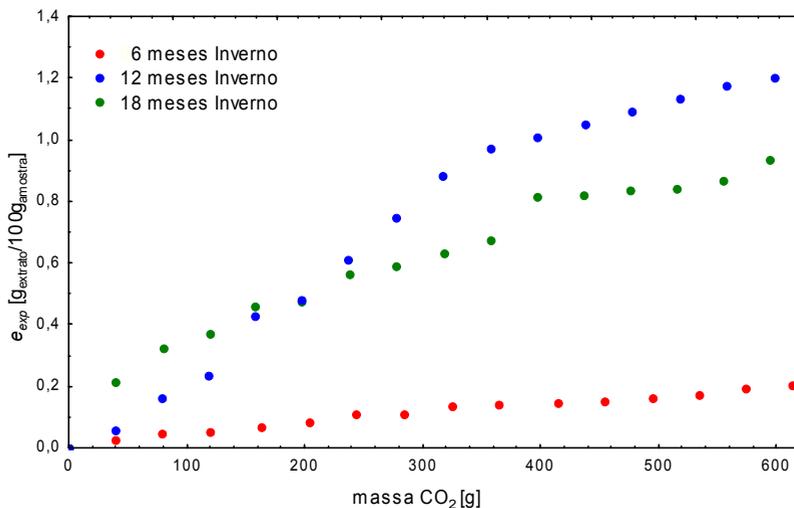


Figura 25. Curvas de extrações de amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas sob sombreamento.

4.4 Solubilidade experimental

Para determinar a solubilidade experimental foram realizadas regressões lineares, na fase inicial de extração, para as curvas de massa de extrato e massa de solvente em função do tempo. Desta forma, foi possível relacionar a quantidade de extrato de erva-mate obtido, com o consumo de CO₂ (Equação III). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos a partir da Equação III, os quais podem ser traduzidos como a eficiência do processo.

A solubilidade do solvente é determinada pela temperatura, pressão, composição e natureza do mesmo, sendo que quanto maior for a solubilidade do soluto no solvente extrator, maior será a quantidade de compostos extraídos em um tempo menor (RECASENS *et al.*, 1999).

Tabela 6. Solubilidade experimental do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões.

Corrida	T	P	Densidade	S _e	
	[°C]	[atm]	[g/cm ³]	[mg _{extrato} /g _{solvente}]	
1	20	100	0,854	0,210	Subcrítico
2	20	150	0,904	0,460	
3	20	200	0,937	0,490	
4	20	250	0,963	0,530	
5	30	175	0,870	0,630	
6	40	100	0,612	0,100	Supercrítico
7	40	150	0,780	0,360	
8	40	200	0,840	0,820	
9	40	250	0,880	0,770	

Conforme observado na Tabela 6, a menor (Corrida 06) e maior (Corrida 08) solubilidades foram observadas a 40 °C, onde foram obtidos 0,100 e 0,820 mg_{extrato}/g_{solvente}, respectivamente. Tal fato refletiu-se sobre o rendimento de extrato, sendo que na Corrida 6 obteve-se o menor rendimento entre todas, em torno 0,18 g_{extrato}/100g_{amostra}, enquanto na Corrida 8 o rendimento de extrato foi de 0,85 g_{extrato}/100g_{amostra}. Como o tempo de extração e o fluxo de CO₂ foram mantidos constantes, a massa de solvente consumida em cada experimento também não foi alterada. Por essa razão, a extração com maior rendimento é também a mais eficiente em relação ao consumo de CO₂.

Segundo Freitas *et al.* (2008) o aumento da temperatura proporciona alterações nas propriedades de transportes do solvente (coeficiente de difusão e viscosidade), as quais são favoráveis ao processo, facilitando a solubilização do extrato contido nos poros da matriz vegetal. O processo de extração também será facilitado devido ao aumento da pressão de vapor do extrato, entretanto, a pressão constante, este aumento promove a queda da densidade, o que pode desfavorecer o processo.

Observando os dados da Tabela 6, sempre que mantida a temperatura constante em 20 ou 40 °C, acréscimos na pressão de extração de 100 a 250 atm provocaram aumento nos valores de solubilidade obtidos (com exceção da Corrida 9). Segundo McHough e

Krukonis (1994) isso ocorre devido ao fato da capacidade de solubilização dos fluidos supercríticos estar diretamente relacionada com a sua densidade.

De acordo com Modey *et al.* (1996), a solubilidade é controlada por dois fatores: a volatilidade da substância, que é função da temperatura de extração, e o poder solvente do fluido, conferido pela densidade. Assim, a solubilidade do extrato no CO₂ varia com a pressão e a temperatura de extração. Devido à variação diferenciada da densidade observada em torno do ponto crítico e em altas pressões reduzidas, as isotermas representadas em um gráfico de pressão versus solubilidade podem cruzar em determinado ponto, como pode ser observado na Figura 26. Esse comportamento é conhecido como comportamento retrógrado, ou condensação retrógrada (DEL VALLE e AQUILERA, 1999).

A Figura 26 mostra as isotermas de solubilidade do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões. Percebe-se que independentemente da isoterma observada, a solubilidade do extrato tende a aumentar na medida em que a pressão aumenta. Entretanto, aproximadamente a 162 atm, ocorre a intersecção das isotermas, definindo o ponto de transformação retrógrado (GE *et al.* 2002).

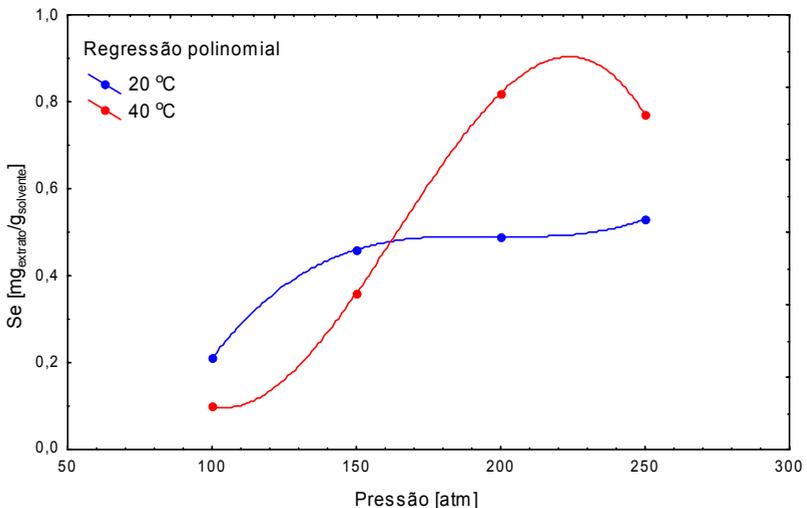


Figura 26. Isotermas de solubilidade do extrato de erva-mate em dióxido de carbono a altas pressões.

Abaixo de 162 atm, a solubilidade do extrato diminui na medida em que se aumenta a temperatura de 20 para 40 °C. Ao contrário, nas pressões maiores que 162 atm, acréscimos na temperatura contribuem para o aumento da solubilidade do extrato no CO₂. Isso ocorre porque a solubilidade do extrato no CO₂ é dependente da pressão de vapor do soluto e da densidade do solvente. Abaixo de 162 atm, a compressibilidade do CO₂ é elevada, desta forma, à medida que a temperatura aumenta, a densidade do CO₂ diminui consideravelmente, reduzindo rapidamente o seu poder solvente. Se por um lado ocorre o incremento na volatilidade e no coeficiente de difusão, com o aumento da temperatura, o efeito da redução da densidade é mais pronunciado, resultando na diminuição da solubilidade do extrato.

Por outro lado, a pressões acima de 162 atm, a densidade do fluido é alta, porém sua compressibilidade é pequena (DEL VALLE e AQUILERA, 1999). Mesmo que o aumento da temperatura de 20 a 40 °C diminua o poder solvente do CO₂ (pela redução da densidade), o seu efeito na pressão de vapor, no coeficiente de difusão e conseqüentemente na transferência de massa, é muito maior (GE *et al.* 2002), razão pela qual, acima do ponto de transformação, incrementos na temperatura produzem aumentos da solubilidade do extrato.

Perturbações na temperatura ou pressão de extração provocam efeitos concorrentes no poder de solubilização do fluido supercrítico. De acordo com McHough e Krukoni (1994), a densidade do solvente à pressão constante diminui com o aumento da temperatura. Como o poder de solvência é função direta da densidade, a solubilidade deveria diminuir. Por outro lado, como a pressão de vapor do soluto é aumentada, resulta num aumento da solubilidade no fluido supercrítico. Segundo citado por Azevedo (2001), Model & Reid e Fattori relataram que a medida que a pressão aumenta a amplitude do decréscimo da densidade do solvente é reduzida e a pressão de vapor passa a exercer o efeito predominante.

4.5 Análise química dos extratos de erva-mate obtidos sob diferentes condições de extração e cultivo da planta

Um cromatograma típico dos extratos de erva-mate obtidos por extração com dióxido de carbono a altas pressões é apresentado na Figura 27. Todas as análises foram duplicadas três vezes, possibilitando identificar cerca de 30 compostos.

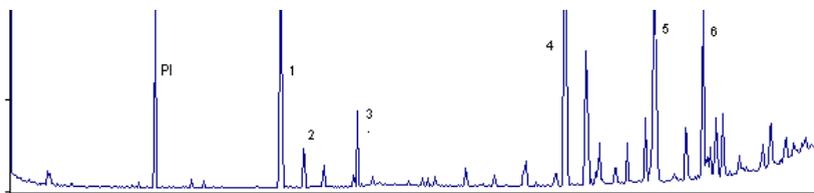


Figura 27. Cromatograma típico do extrato de erva-mate. Picos: PI – padrão interno (bifenila), 1- cafeína, 2 – teobromina, 3 - fitol, 4 - esqualeno, 5 - vitamina E e 6 – estigmasterol.

Com intuito de avaliar os efeitos das condições de operação e variáveis de manejo da planta sobre o rendimento da extração de erva-mate, somente os compostos de interesse (cafeína, teobromina, fitol, esqualeno, vitamina E e estigmasterol) foram quantificados. Tais compostos foram selecionados em função de suas características e aplicações comerciais. A cafeína e a teobromina, alcalóides pertencentes ao grupo das metilxantinas, são capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta de curta duração. Particularmente, a cafeína é a substância estimulante de maior consumo em todo o mundo. O fitol é um álcool diterpênico, muito utilizado como reagente básico na produção sintética de vitamina K e E. O esqualeno, bactericida natural, é amplamente empregado na indústria cosmética, na fabricação de cremes e emulsões. A vitamina E, essencial para a atividade do organismo, vem sendo amplamente estudada em função de sua poderosa atividade antioxidante. O estigmasterol é um esteróide que auxilia no correto funcionamento do sistema imunológico.

4.5.1 Influência das condições de extração sobre os teores dos compostos

A análise química dos extratos por CG-EM permitiu avaliar a influência da temperatura e da pressão sobre a concentração dos compostos selecionados. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo que a Tabela 7 apresenta os valores médios e desvios padrão obtidos para cada um dos compostos de interesse nas condições experimentais descritas anteriormente na Tabela 4.

Observando a Tabela 7 percebe-se que as quantidades dos compostos avaliados variaram consideravelmente em função das condições de operação empregadas. Com exceção do estigmasterol, menores quantidades dos compostos avaliados foram obtidas na

condição de 40 °C e 150 atm (Corrida 7), enquanto que as maiores concentrações de todos os compostos foram obtidas na condição de 40 °C e 100 atm (Corrida 6). Dentre os compostos avaliados, a cafeína é o majoritário, sendo que apenas na Corrida 7 maior quantidade de estigmasterol foi obtida.

As Figuras 28 e 29 permitem verificar a influência da pressão sobre a concentração dos compostos nas faixas de temperaturas de 20 e 40 °C, respectivamente. Observando os resultados obtidos para cada temperatura, nota-se que maiores concentrações dos compostos foram atingidas em condições de operação de menor densidade do solvente. Para cada faixa de temperatura investigada, extrações a 100atm propiciaram as menores densidades do CO₂ (em torno de 0,854 g/cm³ a 20 °C e 0,612 g/cm³ a 40 °C) e maiores quantidades dos compostos de interesse. Conforme a Figura 29, na temperatura de 40 °C, o efeito de queda da densidade em função da redução da pressão é mais pronunciado que a 20 °C (Figura 28), da mesma forma, é muito mais evidente o acréscimo na concentração dos compostos nessa condição. Ressalta-se que as condições de 20 °C e 100 atm e 40 °C e 100 atm propiciaram os menores rendimentos global de extrato, 0,37 e 0,18 g_{extrato}/100g_{amostra} respectivamente. Na operação em densidades menores o solvente não possui propriedades que favoreçam a extração de compostos de maior peso molecular, desta forma, menores rendimentos são obtidos, e a extração se torna seletiva, concentrando os compostos mais voláteis. Em contra partida, o aumento da pressão provoca um acréscimo da densidade, aumentando o poder de solvatação do solvente e, conseqüentemente o rendimento da extração. É importante destacar que os compostos de interesse apresentados na Tabela 7 podem ser considerados leves quando comparados a triterpenos e ceras presentes na composição da erva-mate. Desta forma, o aumento da densidade pode promover a extração de compostos mais pesados, aumentando o rendimento e reduzindo a concentração de compostos avaliados.

Conforme apresentado na Tabela 7, nas pressões de 100 e 250 atm, o aumento da temperatura de 20 para 40 °C produziu um acréscimo na concentração de todos os compostos avaliados. Nas extrações a 200 atm, observaram-se comportamentos distintos em relação aos compostos avaliados. Nesta condição, o aumento da temperatura provoca acréscimo na concentração da cafeína, fitol e estigmasterol, enquanto teobromina, vitamina E e esqualeno foram obtidos em menor quantidade. Na pressão

de 150 atm, o aumento da temperatura produziu uma queda na concentração de todos os compostos extraídos.

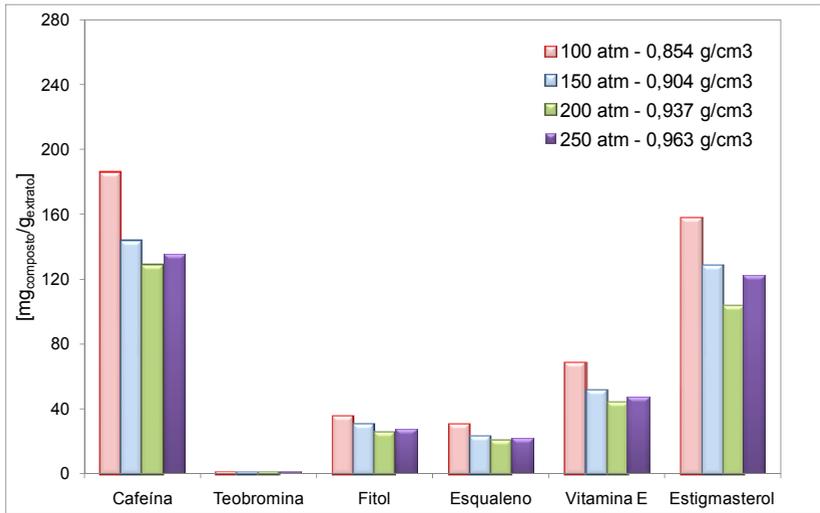


Figura 28. Influência da pressão sobre concentração dos compostos extraídos com CO₂ a 20 °C.

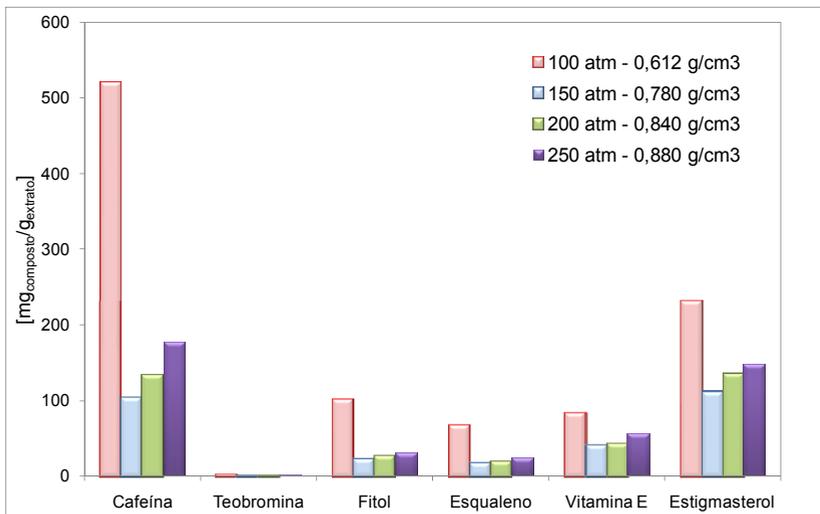


Figura 29. Influência da pressão sobre concentração dos compostos extraídos com CO₂ a 40 °C.

Tabela 7. Influência das condições de operação sobre a concentração dos compostos de interesse obtidos nas extrações de erva-mate com CO₂ a altas pressões (mg_{composto}/g_{extrato}).

Cor.	T [°C]	ρ [g/cm ³]	COMPOSTOS (mg _{composto} /g _{extrato})					
			Cafeína	Teobromina	Fitol	Esqualeno	Vitamina E	Estigmasterol
1	20	0,854	185,57 ±3,37	1,51 ±0,05	35,87 ±0,79	30,79 ±1,40	68,44 ±0,66	157,50 ±0,50
2	20	0,904	143,52 ±3,37	1,30 ±0,06	30,90 ±0,46	23,06 ±1,71	51,81 ±1,30	128,14 ±1,27
3	20	0,937	128,82 ±1,97	1,27 ±0,06	25,73 ±0,29	20,63 ±1,77	44,03 ±1,27	103,05 ±0,99
4	20	0,963	135,23 ±2,35	1,15 ±0,05	27,14 ±0,31	21,55 ±1,32	46,84 ±0,73	121,77 ±0,73
5	30	0,870	166,67 ±0,79	1,17 ±0,05	29,28 ±0,05	24,45 ±0,16	51,15 ±0,15	129,36 ±0,07
6	40	0,612	505,18 ±12,71	2,81 ±0,14	100,56 ±0,81	61,11 ±7,43	80,63 ±2,59	212,08 ±3,32
7	40	0,780	103,93 ±0,47	0,75 ±0,01	22,54 ±0,02	16,94 ±0,07	39,92 ±0,07	111,65 ±0,35
8	40	0,840	132,21 ±3,84	0,98 ±0,06	26,28 ±0,47	19,34 ±1,86	42,00 ±1,43	134,20 ±1,78
9	40	0,880	176,62 ±7,70	1,70 ±0,04	30,04 ±0,71	24,31 ±1,98	55,86 ±1,00	146,29 ±0,93

Mello *et al.* (2009) desenvolveram bebida gaseificada à base de extrato de erva-mate, determinando as condições para obtenção do extrato em função do rendimento em resíduo seco e das possibilidades mais viáveis de processamento. Os resultados de rendimento e teores dos compostos obtidos no presente trabalho demonstram que apesar do interesse industrial em se atingir o máximo rendimento possível, existe a necessidade de levar em conta a caracterização química do extrato, já que maiores rendimentos não significam necessariamente potencializar a presença dos compostos de interesse.

4.5.2 Influência das variáveis de cultivo nos teores dos compostos de interesse

A influência das variáveis de manejo sobre a concentração dos compostos estudados foi verificada em amostras com 6, 12 e 18 meses de idade de folhas, cultivadas sob controle da intensidade de luz e coletadas no inverno e verão. A Tabela 8 apresenta os valores médios e desvio padrão para a quantidade de cada um dos compostos de interesse. As condições experimentais as quais representam as respectivas corridas de extração foram descritas anteriormente na Tabela 5.

Conforme visualizado na Tabela 8, as variáveis de manejo exercem influência marcante sobre a concentração de cada um dos compostos. Com exceção do esqualeno, o qual teve sua concentração potencializada em amostras de 18 meses, todos os outros atingiram maiores concentrações em amostras de 6 meses de idade de folha. Interessante observar que independente da idade de folha, sempre que as plantas foram cultivadas a pleno sol e as amostras coletadas no inverno, as concentrações de estigmasterol superam as de cafeína.

4.5.2.1 Influência da intensidade de luz e época de colheita nos teores dos compostos

Em relação a influência da intensidade de luz a que as plantas eram submetidas, fítol, estigmasterol e vitamina E apresentaram comportamentos variáveis em função das condições de cultivo. Para cafeína e teobromina, sempre que avaliada uma mesma condição de idade de folha e época de colheita, maiores concentrações foram obtidas de plantas sombreadas, enquanto que o esqualeno é obtido em maiores quantidades de plantas expostas ao sol, conforme apresentado nas Figuras 30, 31 e 32.

Tabela 8. Influência das variáveis de manejo sobre a concentração dos compostos de interesse obtidos nas extrações de erva-mate a 30 °C e 175 atm ($\text{mg}_{\text{composto}}/\text{g}_{\text{extrato}}$).

Corrida	COMPOSTOS ($\text{mg}_{\text{composto}}/\text{g}_{\text{extrato}}$)					
	Cafeína	Teobromina	Fitol	Esqualeno	Vitamina E	Estigmasterol
AMOSTRAS 6 MESES						
10	535,20 ±25,87	7,11 ±0,85	21,70 ±0,63	9,45 ±0,65	32,20 ±0,40	191,74 ±2,86
11	151,41 ±5,01	1,88 ±0,03	76,30 ±1,25	33,72 ±5,25	39,54 ±2,32	93,97 ±1,79
12	147,75 ±1,13	1,26 ±0,07	27,51 ±0,08	29,55 ±0,22	60,11 ±0,22	149,39 ±0,11
13	48,89 ±3,51	0,58 ±0,07	3,78 ±0,19	33,81 ±5,07	30,27 ±1,62	48,49 ±1,53
AMOSTRAS 12 MESES						
14	152,05 ±6,52	1,16 ±0,12	10,06 ±0,27	29,22 ±2,78	33,30 ±0,81	81,41 ±0,83
15	92,84 ±4,87	traços*	14,25 ±0,51	21,26 ±3,06	27,23 ±2,80	49,33 ±0,94
16	45,84 ±1,53	0,37 ±0,03	1,29 ±0,04	74,10 ±8,66	49,75 ±1,60	58,42 ±0,72
17	24,84 ±1,97	0,27 ±0,03	5,59 ±0,20	35,97 ±6,57	52,63 ±3,93	51,83 ±1,10
AMOSTRAS 18 MESES						
18	189,22 ±18,37	1,45 ±0,22	8,58 ±0,52	52,96 ±14,54	61,16 ±5,77	109,50 ±4,01
19	na	na	na	na	na	na
20	47,83 ±2,34	0,12 ±0,01	4,10 ±0,13	78,23 ±10,65	47,60 ±2,28	49,48 ±0,93
21	na	na	na	na	na	na

* traços representa quantidade inferior a 0,05 $\text{mg}_{\text{composto}}/\text{g}_{\text{extrato}}$;

na – não foi realizada análise química do extrato.

Segundo Vieira *et al.* (2003), a diferenciação nos valores da matéria prima pagos aos produtores pela indústria do mate, tem sido observada consoante ao sistema de cultivo utilizado, com plantas a pleno sol ou em ambiente sombreado. Esta situação decorre da alegação de que a fitomassa oriunda de cultivos em ambientes sombreados apresenta “gosto mais suave” em relação a erva-mate cultivada a pleno sol e, por isto, alcança maior preço no mercado.

Machado *et al.* (2007) avaliaram o perfil de compostos voláteis sobre o sabor e aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) relatando que a concentração de terpenos e aldeídos pode estar correlacionado com a descrição de aroma "verde, mato" da bebida. Conforme apresentado nas Figuras 30, 31 e 32, em relação ao terpeno fitol, apenas na condição de 6 meses coletada no inverno maiores concentrações foram obtidas quando as plantas estavam expostas a pleno sol, sendo que para todas as outras condições, quantidades muito superiores foram obtidas quando cultivadas sob sombreamento, corroborando com os resultados obtidos por Machado *et al.* (2007).

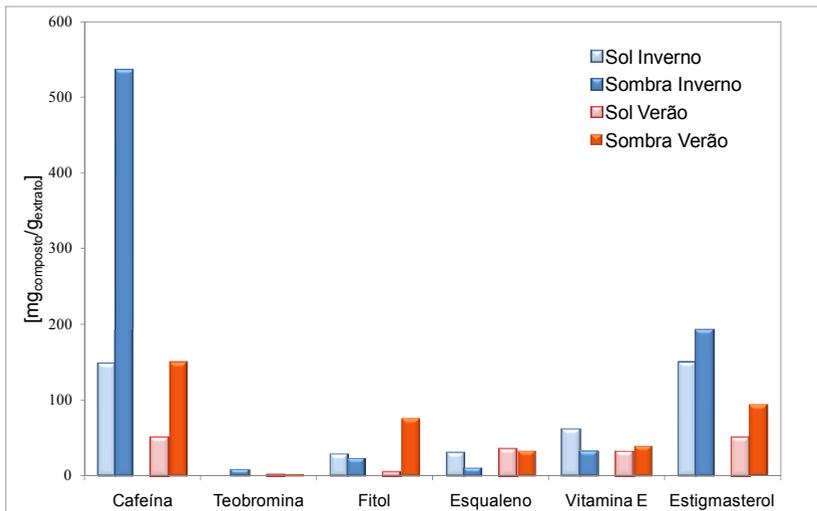


Figura 30. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 6 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.

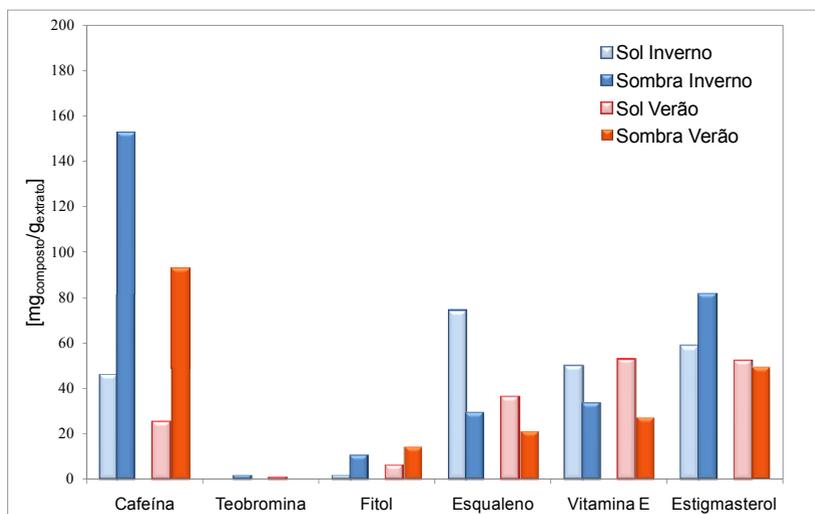


Figura 31. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 12 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.

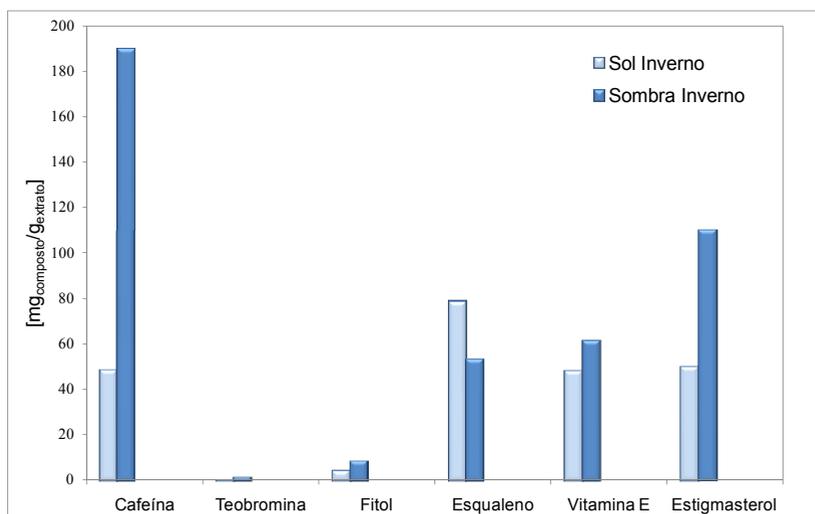


Figura 32. Concentrações dos compostos de interesse em amostras de 18 meses de idade de folha extraídas a 30 °C e 175 atm.

Jacques *et al.* (2007) também estudou o efeito da intensidade de luz sobre a composição da erva-mate cultivada sob diferentes condições de adubação. Os resultados demonstraram que maiores concentrações de cafeína, fitol, ácido palmítico e vitamina E foram obtidos de plantas sombreadas, enquanto esqualeno e ácido esteárico de plantas a pleno sol.

Observando a Tabela 8, auxiliado pelas Figuras 30 e 31, também é possível verificar a influência da época de colheita sobre a concentração dos compostos de amostras de 6 e 12 meses de idade. Concentrações de cafeína, teobromina e estigmasterol são potencializadas ao máximo em amostras coletadas no período do inverno, independentemente da intensidade de luz ou idade de folha. Por outro lado, o esqualeno apresenta comportamento distinto em função da idade de folha das plantas, sendo que em amostras de 6 meses maiores quantidades do composto são obtidas quando coletadas no verão, enquanto que com 12 meses, o máximo é atingido em amostras de inverno.

4.5.2.2 Influência da idade de folha nos teores dos compostos

Da mesma forma que a avaliação feita em relação ao rendimento das extrações, a influência da idade das folhas sobre a concentração dos compostos foi verificada sob condições distintas em relação a época de colheita: amostras com 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno e amostras com 6 meses verão e 12 meses inverno.

A Figura 33 apresenta os dados de concentração dos compostos obtidos de amostras com 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno, de plantas expostas ao sol. Verifica-se que as concentrações de cafeína, teobromina, fitol, vitamina E e estigmasterol foram potencializadas em amostras de 6 meses coletadas no inverno, enquanto o esqualeno foi obtido em maior quantidade em amostras com 18 meses inverno. Com exceção da vitamina E, conforme apresentado na Figura 34, o mesmo comportamento é verificado quando as plantas foram cultivadas sob sombreamento.

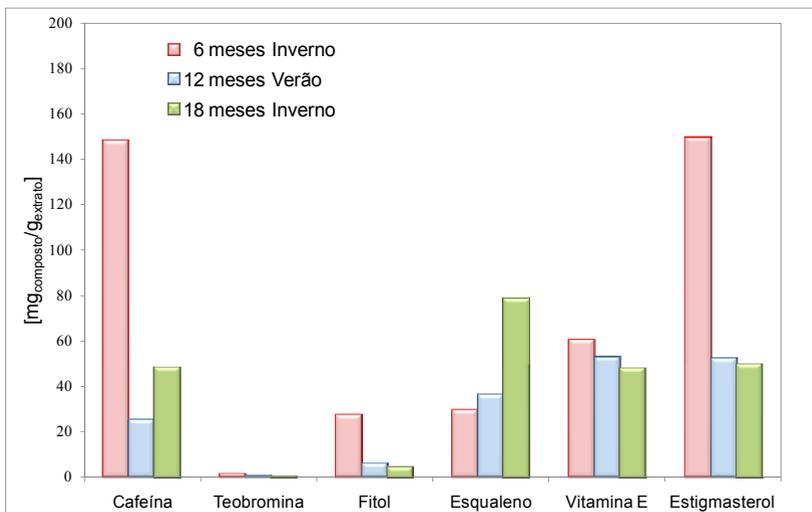


Figura 33. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno expostas a pleno sol.

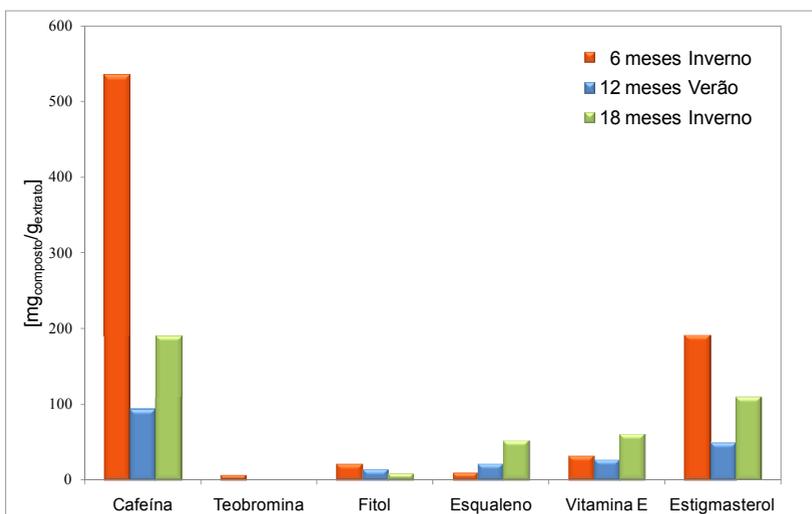


Figura 34. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno, sombreadas.

Interessante observar que em relação ao rendimento de extrato, quando avaliada a condição de 6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno (Figuras 18 e 19), amostras com 12 e 18 meses obtiveram comportamentos muito similares. Por outro lado, em termos de concentração dos compostos, resultados distintos foram obtidos. Em plantas sob sombreamento (Figura 34), amostras de 18 meses inverno apresentaram quantidades bem superiores de cafeína, esqualeno, vitamina E e estigmasterol, enquanto que em plantas expostas a pleno sol (Figura 33), apenas maiores teores de cafeína e esqualeno foram obtidos quando comparadas a amostras de 12 meses verão.

As Figuras 35 e 36, apresentam as quantidades de compostos obtidas em amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno, cultivadas a pleno sol e sob sombreamento, respectivamente. Em amostras coletadas de plantas a pleno sol, maiores quantidades de teobromina, esqualeno, vitamina E e estigmasterol foram obtidas em folhas com 12 meses inverno, enquanto que maiores concentrações de cafeína e fitol obtem-se em amostras de 6 meses coletadas no verão.

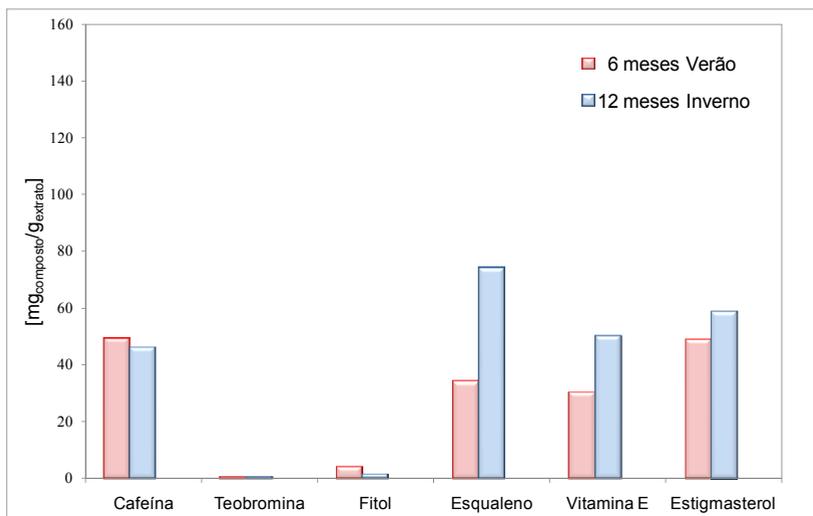


Figura 35. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno, expostas a pleno sol.

A Figura 36 demonstra que praticamente não ocorre variação do teor de cafeína entre amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno oriundas de plantas cultivadas sob sombreamento. Por outro lado, para

todos os outros compostos avaliados, maiores concentrações são obtidas de plantas com idade de folha de 6 meses coletadas no verão.

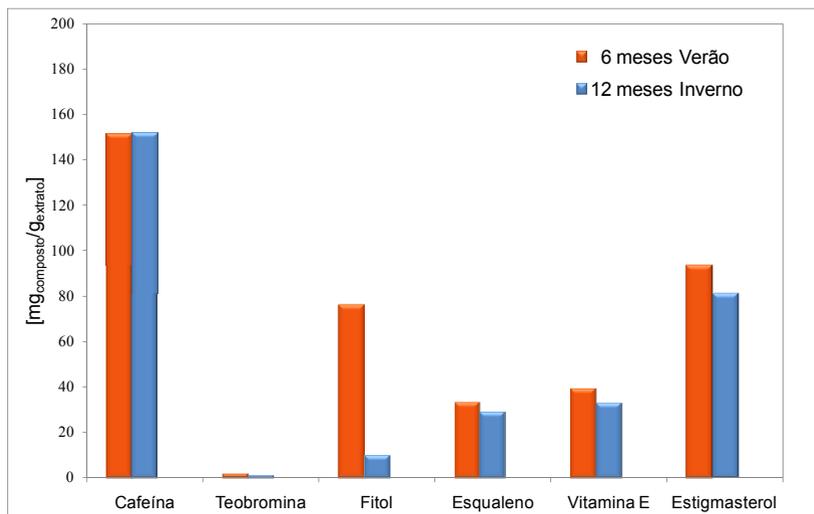


Figura 36. Concentração dos compostos em amostras de 6 meses verão e 12 meses inverno, mantidas sob sombreamento.

Os experimentos realizados também possibilitaram avaliar a influência da idade da folha de erva-mate sobre a quantidade dos compostos observados numa mesma condição da época de colheita, inverno ou verão.

As Figuras 37 e 38 apresentam a variação da concentração dos compostos em função da idade de 6 e 12 meses de amostras coletas no período do verão, cultivadas a pleno sol e sob sombreamento, respectivamente. Conforme demonstrado na Figura 37, plantas coletadas no verão com 12 meses de idade da folha e cultivadas sob sol, propiciam maiores teores de fitol, esqualeno, vitamina E e estigmasterol e menores quantidades de cafeína e teobromina, quando comparadas a amostras de 6 meses. Em relação a amostras coletadas no verão, porém cultivadas sob sombreamento, maiores concentrações de todos os compostos de interesse foram obtidas em folhas com 6 meses de idade, conforme é apresentado na Figura 38.

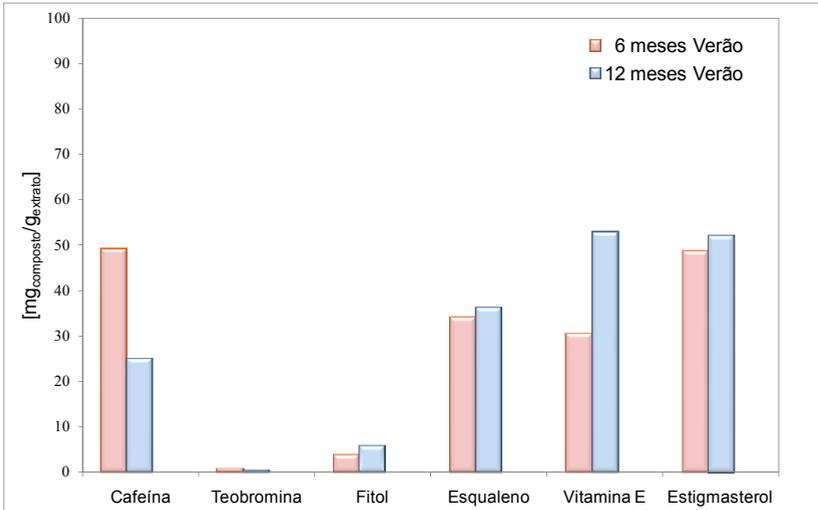


Figura 37. Concentração dos compostos em amostras de 6 e 12 meses coletas no verão de plantas exposta a pleno sol.

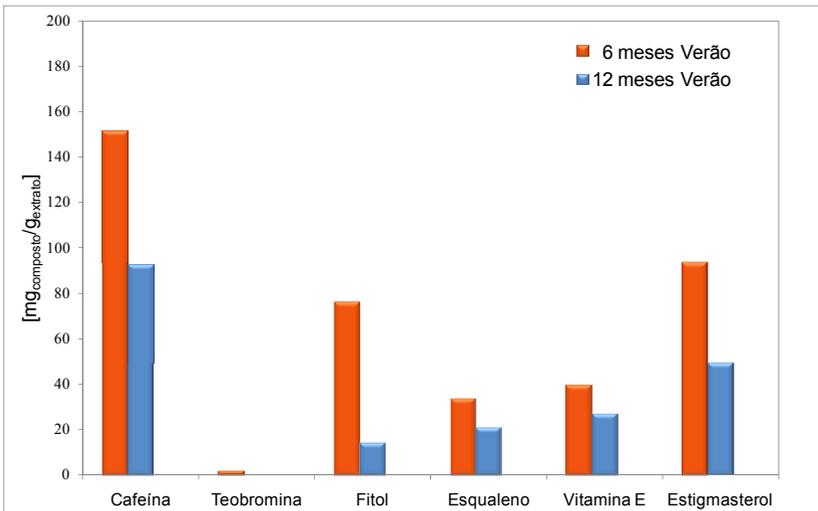


Figura 38. Concentração dos compostos em amostras de 6 e 12 meses coletas no verão de plantas sob sombreamento.

A variação dos teores dos compostos estudados com relação à idade da folha de 6, 12 e 18 meses coletadas no período do inverno é apresentada na Figura 39 para amostras de plantas cultivadas a pleno sol, e Figura 40, quando cultivadas sob sombreamento. Os resultados obtidos demonstram que independente da intensidade de luz, maiores concentrações de cafeína, teobromina, fitol e estigmasterol foram obtidos em plantas de 6 meses, enquanto que teores máximos de esqualeno foram observados em amostras de 18 meses. Em relação a vitamina E, comportamentos distintos foram observados. Quando obtida de plantas expostas ao sol maiores teores de vitamina E foram atingidos em amostras de 6 meses, diferentemente de quando as plantas são mantidas sob sombreamento, onde amostras de 18 meses propiciaram maior quantidade do composto.

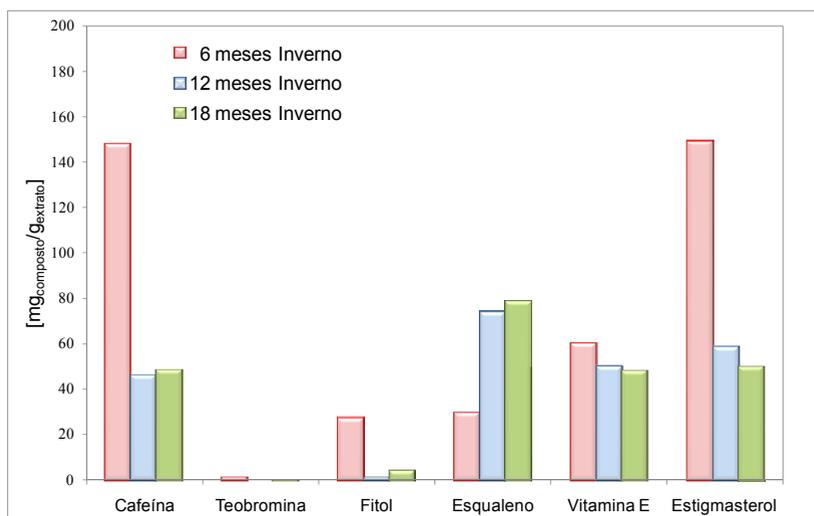


Figura 39. Concentração dos compostos em amostras de 6, 12 e 18 meses coletadas no inverno de plantas expostas ao sol.

Os resultados apresentados apontaram que para cafeína e teobromina, sempre que avaliada a idade de folha, maiores teores foram obtidos em plantas de 6 meses. Segundo Frischknecht *et al.* (1986), a formação de alcalóides como cafeína, teobromina e teofilina é potencializada pelas plantas com folhas emergentes como estratégia de defesa química. Neste período, as folhas ainda não são protegidas por resinas, correndo elevado risco de predação. Após a formação completa das folhas, o teor de alcalóides produzidos diminui consideravelmente.

Mazzafera (1994) também relatou a presença em maiores quantidades de cafeína, teobromina e teofilina em folhas jovens e frutos imaturos de erva-mate, quando comparado com o conteúdo presente em folhas velhas e frutos maduros. Lopes *et al.* (2007) avaliaram por HPLC o teor de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *I. paraguariensis*, posteriormente relatando que maiores quantidades dos compostos foram obtidas em folhas mais jovens.

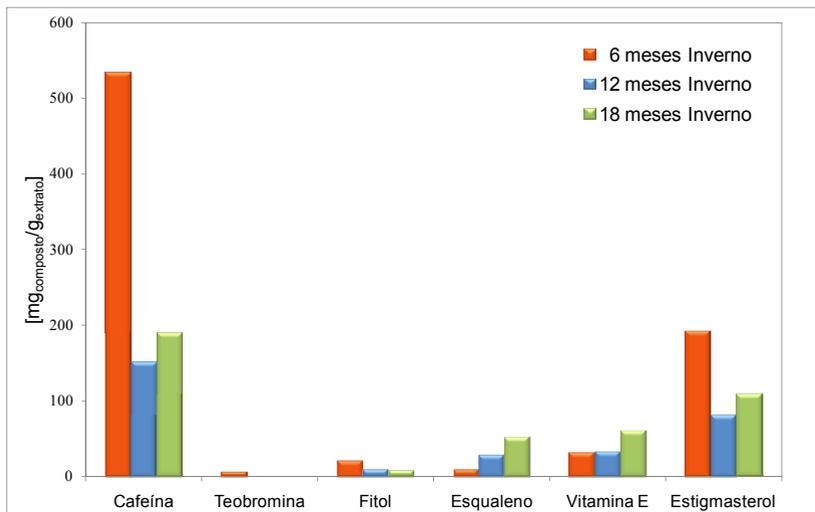


Figura 40. Concentração dos compostos em amostras de 6, 12 e 18 meses coletas no inverno de plantas sob sombreamento.

Gnoatto *et al.* (2007) estudaram a influência do método de extração nos teores de metilxantinas presentes na erva-mate, onde a água quente mostrou-se ser o melhor solvente para o material vegetal sem tratamento prévio por alcalinização ou acidificação das amostras. Tais resultados, associados aos dados apresentados na Tabela 8, os quais demonstraram que o teor de cafeína apresentou variação de cerca de 22 vezes em relação as condições a que a planta era cultivada, demonstram a relevância do trabalho, visto que atualmente grande parte da erva-mate é consumida na forma do chimarrão (infusão com água quente).

Como os dados de rendimento de extrato e concentração de cafeína nas diferentes condições de cultivo da planta, também foram determinados os teores de cafeína em relação a amostra, conforme apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Quantidade de cafeína presente nos extratos de erva-mate obtidos com CO₂ a altas pressões.

(g_{cafeína}/100g_{amostra})				
6 meses				
Corrida	10	11	12	13
Teor Cafeína	0,11	0,14	0,08	0,07
12 meses				
Corrida	14	15	16	17
Teor Cafeína	0,18	0,08	0,09	0,04
18 meses				
Corrida	18	19	20	21
Teor Cafeína	0,18	na	0,08	na

na – não foi realizada análise química do extrato.

Do ponto de vista industrial, quando se pensa no desenvolvimento de novos produtos, ou até mesmo estratégia de marketing, outro fator de suma relevância a legislação brasileira em vigor. No ano de 2002 a Anvisa aprovou o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Erva-Mate. Neste, estabeleceu que o produto Erva-Mate somente poderá ser considerado descafeinado quando a concentração máxima de cafeína presente for 0,10 g_{cafeína}/100g_{amostra}. Entretanto, no item 2.1.2 do regulamento, é definido que não pode ser considerado produto Erva-Mate, quando oriundo de matéria-prima que teve, parcial ou totalmente, retirados os princípios ativos por qualquer processo tecnológico (ANVISA, 2002).

Observando os dados da Tabela 9, nota-se que maiores quantidades de cafeína foram obtidas de plantas sombreadas (Corridas 10, 11, 14 e 18). O cultivo sob controle da intensidade de luz, época de colheita e idade da folha proporcionou variações de até 350 % nos teores de cafeína presentes na amostra, onde máximos de 0,18 g_{cafeína}/100g_{amostra} foram obtidos nas Corridas 14 e 18, enquanto apenas 0,04 g_{cafeína}/100g_{amostra} na Corrida 17. Os resultados obtidos evidenciam a importância do cultivo controlado da erva-mate, indicando ainda, a possibilidade de agregar valor a matéria-prima, permitindo obter um produto final diferenciado somente com o manejo adequado da planta.

4.6 Modelagem das extrações de erva-mate

Com os dados experimentais de extração da erva-mate, determinou-se x_u , q_c e γ_o , possibilitando estimar pelo modelo de Sovová (2005) os parâmetros de transferência de massa r (etapa linear) e $k_s a_s$ (etapa difusiva), conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros de transferência de massa obtidos com o modelo de Sovová (2005).

Cor.	y_o	q_c	C_1	C_2	r	$k_s a_s \times 10^{-5}$	R^2
1	0,00021	15,08	0,832	0,0145	0,25	0.314	99,6
2	0,00041	6,19	0,860	0,0229	0,20	0.618	99,4
3	0,00046	6,08	0,791	0,0157	0,25	0.435	99,7
4	0,00048	6,12	0,786	0,0181	0,26	0.450	99,5
5	0,00063	5,13	0,790	0,0305	0,27	0.697	99,4
6	0,00009	22,56	0,806	0,0002	0,20	0.007	96,0
7	0,00033	11,91	0,879	0,0309	0,27	1.005	99,7
8	0,00077	4,73	0,870	0,0655	0,26	2.183	99,5
9	0,00073	5,96	0,952	0,0872	0,27	2.104	99,3

Pode ser observado na Tabela 10 que na temperatura de 20 °C (Corridas 1, 2, 3 e 4), o aumento da pressão produziu um aumento da solubilidade do extrato no solvente (y_o), devido ao aumento da densidade do CO₂. Da mesma forma ocorre a 40 °C nas Corridas 6, 7 e 8, porém na pressão de 250 atm (Corrida 9), ocorreu uma pequena queda da solubilidade. Tal fato pode ter ocorrido, pois a variação de 200 para 250 atm provoca uma pequena variação na densidade (0,840 a 0,880 g/cm³). Com relação à quantidade de solvente consumida no ponto de transição (q_c), observa-se que em condições de menores solubilidades, foram necessárias maiores massas de CO₂ para se atingir o ponto de transição das curvas de extrações. Desta forma, maior solubilidade conduziu a um menor consumo de CO₂ e maior eficiência no processo. A fração de células quebradas (r) pouco variou em torno de 0,25, o que era de se esperar já que todas as amostras utilizadas foram moídas e classificadas em peneiras Tyler na faixa de 12-35 mesh (1,40 a 0,42 mm). Valores máximos para o coeficiente de transferência de massa na fase sólida ($k_s a_s$) foram obtidos nas corridas conduzidas na temperatura de 40 °C, sendo $2,183 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 200 atm (Corrida 8) e $2,104 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a 250 atm (Corrida 9). Na pressão de 100 atm os menores $k_s a_s$ foram

obtidos, tanto a 40 °C (Corrida 6) como a 20 °C, respectivamente $0,007 \times 10^{-5}$ e $0,314 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

As Figuras 41 e 42 mostram as curvas experimentais e simuladas para a extração de amostras de erva-mate com 6 meses de idade da folha, sob diferentes condições de pressão nas temperaturas de 20 e 40 °C, respectivamente. Observa-se que o modelo proposto por Sovová (2005) representou satisfatoriamente a cinética das extrações em todas as condições investigadas, sendo que apenas na condição de 40 °C e 100 atm (Corrida 6) obteve-se coeficiente de correlação menor 99,3 %. Nesta condição a solubilidade do extrato no CO₂ foi muito baixa, desta forma, seria necessário prolongar o tempo de extração para que fosse possível identificar o ponto de transição, para o processo difusivo.

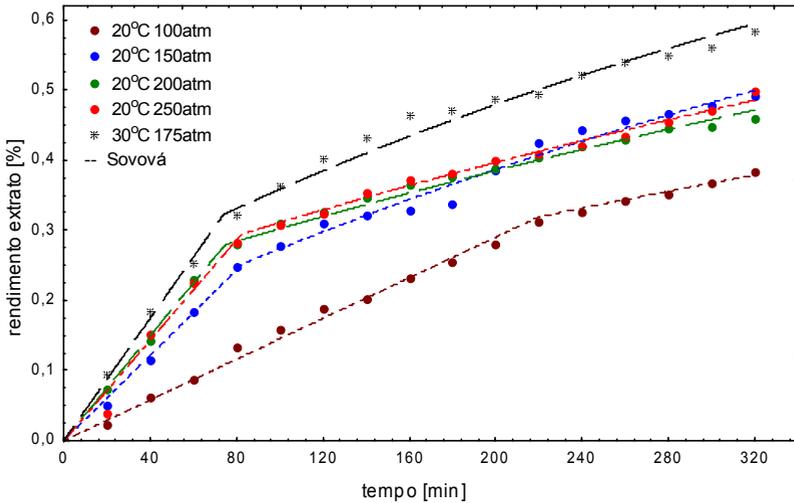


Figura 41. Curvas experimentais e simuladas de extrações com CO₂ a altas pressões na temperatura de 20 °C.

Resultados similares foram obtidos por Sovová (2005) de dados experimentais de extração supercrítica com CO₂ a 350 bar e 40 °C do óleo de sementes de amêndoas trituradas para otimizar os parâmetros r e k_{s,a_s} , obtendo os seguintes resultados em função do diâmetro (d) de partícula: $r = 0,71$ e $k_{s,a_s} = 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para $d = 0,3 \text{ mm}$, $r = 0,53$ e $k_{s,a_s} = 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para $d = 0,7 \text{ mm}$ e $r = 0,35$ e $k_{s,a_s} = 0,78 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para $d = 1,9 \text{ mm}$.

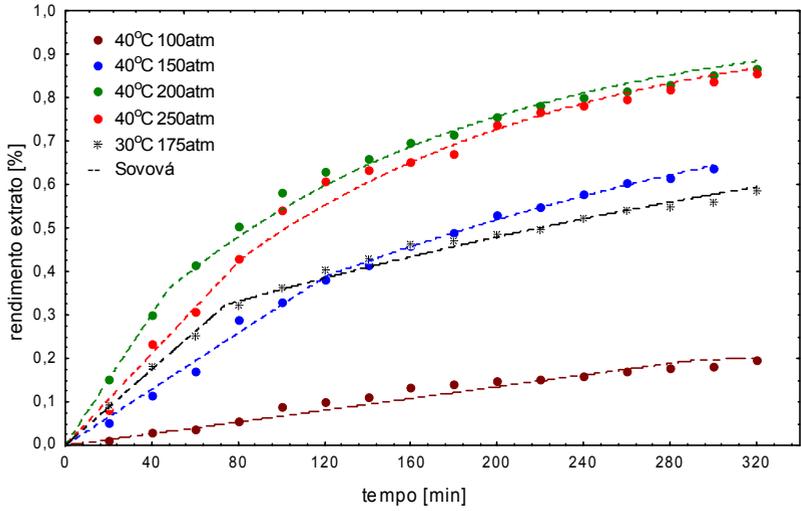


Figura 42. Curvas experimentais e simuladas de extrações com CO₂ a altas pressões na temperatura de 40 °C.

CAPÍTULO V

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo serão apresentadas as considerações finais, conclusões e algumas sugestões para desenvolvimentos de trabalhos futuros que venham a contribuir para uma maior valorização da erva-mate como matéria-prima.

5.1 Rendimento de extrato

5.1.1 Maiores rendimentos de extratos obtidos das folhas de erva-mate com 6 meses de idade foram obtidos nas condições de 40 °C e 200 atm e 40 °C e 250 atm;

5.1.2 As variáveis de extração exercem efeito marcante sobre o rendimento de extrato de erva-mate, sendo que para uma mesma temperatura, pressões maiores (250 atm) conduzem a elevada quantidade de extrato, enquanto que, em baixas pressões (100 atm) foram obtidos os menores rendimentos;

5.1.3 Em relação à intensidade de luz, maiores rendimentos foram obtidos quando as plantas estavam expostas a pleno sol;

5.1.4 Plantas com 12 e 18 meses de idade da folha produziram maiores rendimentos quanto coletadas no período do inverno, enquanto que em plantas com 6 meses maiores rendimentos de extrato foram obtidos quando coletadas no verão;

5.1.5 A idade das folhas de erva-mate exerceu influência sobre o rendimento de extrato obtido com CO₂ pressurizado nas quatro condições de coleta avaliadas: 6, 12 e 18 meses verão, 6, 12 e 18 meses inverno, predominou verão (6 meses verão, 12 meses inverno e 18 meses verão) e predominou inverno (6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno). Amostras de 12 meses de idade disponibilizaram os maiores rendimentos de extratos.

5.2 Solubilidade experimental

5.2.1 A temperatura e a pressão exercem efeito marcante na solubilidade do extrato de erva-mate no dióxido de carbono, sendo que o aumento da

pressão provoca aumento da densidade e, conseqüentemente, da solubilidade do extrato no solvente;

5.2.2 Maiores variações da solubilidade foram observadas na temperatura de 40 °C, onde alterações da pressão provocaram variações de 0,100 a 0,820 mg_{extrato}/g_{solvente};

5.2.3 Aproximadamente a 162 atm ocorre a intersecção das isotermas de solubilidade, possibilitando definir que para as condições avaliadas, operando abaixo desta pressão maiores solubilidades são obtidas à temperatura de 20 °C, enquanto acima em temperaturas de 40 °C. Tal fato é relevante industrialmente, pois determina a eficiência do processo, já que quanto maior for a solubilidade, maior será a quantidade de compostos extraídos em um tempo menor.

5.3 Análise química dos extratos

5.3.1 As condições de operação exerceram efeito marcante sobre a concentração dos compostos avaliados, sendo que maiores teores de todos os compostos foram obtidos na condição de 40 °C e 100 atm;

5.3.2 Teores de cafeína e teobromina foram potencializados em plantas cultivadas sob sombreamento, enquanto que maiores teores de esqualeno foram obtidos de plantas expostas a pleno sol. Fitol, estigmasterol e vitamina E apresentaram comportamentos distintos em função das condições de cultivos associadas;

5.3.3 A época de coleta também influenciou a concentração dos compostos, sendo que teores de cafeína, teobromina e estigmasterol são potencializados ao máximo em amostras coletadas no período do inverno. Para o esqualeno, em plantas com 6 meses maiores quantidades foram obtidas no verão, enquanto que em amostras de 12 meses no inverno. Fitol e vitamina E apresentam comportamentos distintos em função das condições de cultivos associadas;

5.3.4 A idade das folhas de erva-mate exerceu influência marcante sobre a concentração de todos os compostos de interesse nas quatro condições de coleta avaliadas: 6, 12 e 18 meses verão, 6, 12 e 18 meses inverno, 6 meses verão e 12 meses inverno e predominando inverno (6 meses inverno, 12 meses verão e 18 meses inverno).

5.4 Modelagem - Sovová (2005)

5.4.1 O modelo proposto por Sovová (2005) se mostrou capaz de representar a cinética das extrações em todas as condições investigadas;

5.5 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, sugerem-se para novos estudos as seguintes abordagens:

5.5.1 Realizar estudo de viabilidade econômica para obtenção comercial dos compostos avaliados;

5.5.2 Avaliar o efeito antioxidante do extrato da erva-mate obtido com dióxido de carbono supercrítico;

5.5.3 Avaliar a influência da utilização de um co-solvente no processo de extração com fluido supercrítico;

5.5.4 Realizar extrações em condições mais brandas de pressão (abaixo de 100 atm) com o intuito de concentrar o óleo essencial presente no extrato;

REFERÊNCIAS

- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20(2), 121-144. 1987.
- ALKER, J. S. E. In *Terpenoids in Plants*; Pridham, J. B., Ed.; Academic Press; London, 31p, 1967.
- ALVES, A. B. & BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 38, 237-243, 2002.
- ANGUS, S., ARMSTRONG, B., & REUCK, K. M. de. *International Thermodynamic Tables of the Fluid State*, 1976.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DE ERVA-MATE. *Gazeta Grupo de Comunicações*. Gráfica e Editora Palotti, Santa Cruz do Sul, RS, 1999.
- ANVISA. Resolução - RDC nº 302, de 07 de novembro de 2002. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade Da Erva-Mate. D.O.U de 08/11/2002.
- ARNAUD, M. J. Caffeine. Benjamin, Caballero. *Encyclopedia of Human Nutrition*. 247-253, 2005.
- ARONSON, J. K. Caffeine. *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. 588-594, 2006.
- ATHAYDE, M. L. Saponinas e triterpenos em algumas espécies do gênero *Ilex*. *Dissertação de Mestrado*. UFRGS, Porto Alegre, RS, 1993.
- ATHAYDE, M. L., COELHO, G. C. & SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry*. 55(7), 853-857, 2000.
- AZEVEDO, A. B. A. Extração e fracionamento de gordura de cupuaçu das sementes com fluidos supercríticos. *Dissertação de Mestrado*. UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
- BALCEWICZ, L. C. A viabilidade sócio-econômica da cultura de erva-mate no Estado do Paraná frente a concorrência do Mercosul. *Dissertação de Mestrado*. UFPR, Curitiba, PR, 1997.

BARBOSA, L. M. V. Desenvolvimento de bebida a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) adicionada de fibra alimentar. Tese de Doutorado. UFPR, Curitiba, PR, 2006.

BASTOS, D. H. M., DE OLIVEIRA D. M., MATSUMOTO R. L. T., CARVALHO P. O. & RIBERO M. L. Yerba mate: pharmacological properties, research, and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. v. 1(1), 37–46, 2007.

BERKAI, D. & BRAGA, C. A. 500 anos de história da erva-mate. Editora Cone Sul, 2 ed., 97p, 2000.

BERTONI, M. H., PRATKRICUM, S. D., KANZIG, R. G. & CATTANEO, P. Fresh leaves of *Ilex paraguariensis* Saint Hil. III. Effect of different stages of the traditional process for yerba mate production on the composition of fresh leaves. *An. Asoc. Quim. Argentina*. 80, 493–501, 1992.

BLUMBERG, J. & CAPPELLANO, K. Phytochemical research at tufts nutrition. *Food Technology*. v. 56(3), 23p, 2002.

BRITO, H. R. Caracterização química de óleos essenciais de *Spondias mombin* L., *Spondias purpurea* L. e *Spondias* sp (cajarana do sertão). Dissertação de Mestrado. UFCG, Patos, PB, 2010.

BRUNETTI, L., DAGUETTA, A., FEDELI, E., KIKIC, I. & ZANDERIGHI, L. Deacidification of olive oils supercritical carbon dioxide. *JAOCS*. v. 66(2), 1989.

CAMPOS, A. M., ESCOBAR, J. & LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 7(1), 43-49, 1996.

CANSIAN, R. Variabilidade genética e de compostos voláteis e semi-voláteis em populações nativas de *Ilex paraguariensis* (St Hil.) do Brasil, visando a conservação da espécie. Tese de Doutorado. São Carlos, SP, 2003.

CARAMAO, E. B., RODRIGUES, M. R. A., SANTOS, J. G., DARIVA, C. & OLIVEIRA, J. V. Chemical composition and extraction yield of labiatae species from high pressure CO₂ extraction. *Chemical Engineering Transactions*. v. 2, 471-476, 2002.

- CENI, G. C. Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas. Dissertação de Mestrado. URI, Erechim, RS, 2005.
- CHANG, C. C., CHANG, T. C., KAO, S. C. S., KUO, Y. F. & CHIEN, L. F. Pentoxifylline inhibits the proliferation and glycosaminoglycan synthesis of cultured fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial myxoedema. *Acta Endocrinologica*. 129(4), 322-327, 1993.
- CLAUMANN, C. A. Modelagem dinâmica e controle de processos não lineares: uma aplicação de algoritmos genéticos para treinamento de redes neurais recorrentes. Dissertação de Mestrado. UFSC, Florianópolis, SC, 1999.
- COSTA, S. G. A erva-mate. Coleção Farol do Saber. Curitiba, PR, 132p. 1995.
- DA CROCE, D. M. & FLOSS, P. A. Cultura da erva-mate no estado de Santa Catarina. *Boletim Técnico*, Florianópolis, SC, v.100, 15-19, 1999.
- DE MEJIA, E. G., SONG, Y. S., RAMIREZ-MARES, M. V., & KOBAYASHI, H. Effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Tea on Topoisomerase Inhibition and Oral Carcinoma Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(6), 1966-1973, 2005.
- DEL VALLE, J. M. & AGUILERA, J. M. Effects of Substrate Densification and CO₂ Conditions on Supercritical Extraction of Mushroom Oleoresins. *Journal of Food Science*. 54(1), 135-141, 1989.
- DEL VALLE, J. M. & AGUILERA, J. M. Revision: Extracción con CO₂ a alta presión. *Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimento*. *Food Science and Technology International* 5(1), 1-24, 1999.
- EMBRAPA FLORESTAS. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/-FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate/02distrib_geografica.htm acessado 10 Nov. 2010.
- ESMELINDRO, A. A., GIRARDI, J. S., MOSSI, A., JACQUES, R. A., & DARIVA, C. Influence of Agronomic Variables on the Composition of Mate Tea Leaves (*Ilex paraguariensis*) Extracts Obtained from CO₂ Extraction at 30°C and 175bar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(7), 1990-1995, 2004.

- ETENG, M., EYONG, E., AKPANYUNG, E., AGIANG, M. & AREMU, C. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 51(3), 231-243, 1997.
- FAGUNDES, G. C. P. *Cevando Mate*. Habitasul. Porto Alegre, RS, 135 p, 1980.
- FAN, K. A., TSUNEHIRO, C. F. & JIANG, Y. Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(7), 1303-1309, 2010.
- FERGUSON, N. M. *A Textbook of Pharmacognosy*. New York, The Macmillan Company, 374p, 1956.
- FIESER, L. F. & FIESER, M. *Steroids*. Reinhold Publishing Corporation, New York, 196p, 1959.
- FILIP, R., LÓPEZ, P., GIBERTI, G., COUSSIO, J. & FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*. v. 72(7), 774-778, 2001.
- FILIP, R., LOTITO, S. B., FERRARO, G. & FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*. 20(10), 1437-1446, 2000.
- FREDHOLM, B. B., BATTIG, K., HOLMÉN, J., NEHLIG, A. & ZVARTAU, E. E. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews*. 51(1), 83-133, 1999.
- FREITAS L. S., OLIVEIRA J.V., DARIVA C., JACQUES R. A. & CARAMÃO, E. B. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. v. 56, 2558-2564, 2008.
- FRISCHKNECHT, P. M., ULMER-DUFEK, J. & BAUMANN, T. W. Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry*. 25(3), 613-616, 1986.
- GARCIA, R. V., BASUALDO, I., PERALTA, I., DE HEREBIA, M. & CABALLERO, S. Minerals content of Paraguayan yerba mate (*Ilex paraguariensis*, S. H.). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 47(1), 77-80, 1997.

- GE, Y., YAN, H., HUI, B., NI, Y., WANG, S. & CAI, T. Extraction of natural vitamin E from wheat germ by supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, 685-689, 2002.
- GIL, M., SKOPINSKA-ROZEWSKA, E., RADOMSKA, D., DEMKOW, U., SKURZAK, H., ROCHOWSKA, M., BEUTH, J. & ROSZKOWSKI, K. Effect of purinergic receptor antagonists suramin and theobromine on tumor-induced angiogenesis in BALB/c mice. *Folia Biol.* 39(2), 63-68, 1993.
- GNOATTO, S. C. B., BASSANI, V. L., COELHO, G. C. & SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* a. St.-Hil., aquifoliaceae). *Química Nova*. 30, 304-307, 2007.
- GOSMANN, G., SCHENKEL, E. P. & SELIGNMANN, O. A New Saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*. *Journal of Natural Products*. 52(6), 1367-1370, 1989.
- GUINAZ, M., MILAGRES, R. C. R. M., PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. & CHAVES, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*. 32, 2098-2103, 2009.
- HELLGREN, L. I. & SANDELIUS, A. S. The impact of different phytosterols on the molecular dynamics in the hydrophobic/hydrophilic interface phosphatidylcholine-liposomes. *Physiologia Plantarum*. 113(1), 23-32, 2001.
- ILLÉS, V., DAOOD, H. G., PERNECZKI, S., SZOKONYA, L. & Then, M. Extraction of coriander seed oil by CO₂ and propane at super and subcritical conditions. *Journal of Supercritical Fluids*. v. 17, 177-186, 2000.
- JACQUES, R. A., SANTOS, J. G., DARIVA, C., OLIVEIRA, J. V., & CARAMÃO, E. B. GC/MS characterization of mate tea leaves extracts obtained from high-pressure CO₂ extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. 40(3), 354-359, 2007.
- JAMES, J. E. Acute and Chronic Effects of Caffeine on Performance, Mood, Headache, and Sleep. *Neuropsychobiology*. 38(1), 32-41, 1998.
- JAMES, J. E. Caffeine and health. Academic Press, London, San Diego, New York. 22-32 e 63-85, 1991.
- KARAS, A. C. Auto ecologia da erva-mate. UFPR, Curitiba, PR, 120p, 1982.

KAYA, A. The use of natural squalene and squalane and the latest situation of the raw materials. Journal Jpn. Oil Chem. Soc. 39(8), 525-529.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H. Química farmacêutica. Editora Guanabara Koogan. 1 ed. Tradução de Andrejus Korolkovas. 1988.

KRAEMER, K. H. *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate): distribuição de saponinas em estudos iniciais em culturas de células em suspensão. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, RS, 1997.

KRAEMER, K. H., TAKETA, A. T. C., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G. & GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. Phytochemistry. 42(4), 1119-1122, 1996.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 39, 227-242, 2003

LI, Q., CHEN, G. Q., FAN, K. W., LU, F. P., AKI, T. & JIANG, Y. Screening and Characterization of Squalene-Producing Thraustochytrids from Hong Kong Mangroves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57(10), 4267-4272, 2009.

LIM, J. C., PARK, J. H., BUDESINSKY, M., KASAL, A., HAN, Y. H., KOO, B. S., LEE, S. I. & LEE, D. U. Antimutagenic Constituents from the Thorns of *Gleditsia sinensis*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 53(5), 561-564, 2005.

LINHARES, T. História econômica do mate. Livraria José Olympio Editora S. A., 1 ed., 1970.

LOPES, M. R. S., MARTINEZ, S. T., CHAVES, V. C., ROCHA, A. S. R. & AMARANTE, L. Determinação por HPLC de cafeína e teobromina em folhas jovens e velhas de *Ilex paraguariensis*. Revista Brasileira de Biociências. v. 5(2), 954-956, 2007.

MACCARI, A. J. & SANTOS, A. P. R. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, 2000.

MACHADO, C. C. B., BASTOS, D. H. M., JANZANTTI, N. S., FACANALI, R., MARQUES, M. O. & FRANCO, M. R. B. Determinação do perfil de compostos voláteis e avaliação do sabor e

- aroma de bebidas produzidas a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Química Nova. 30, 513-518, 2007.
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. Ed. Agronômica Ceres. 251p, 1980.
- MANDEL, H. G. Update on caffeine consumption, disposition and action. Food and Chemical Toxicology. 40(9), 1231-1234, 2002.
- MARTÍNEZ, J., MONTEIRO, A. R., ROSA, P. T. V., MARQUES, M. O. M. & MEIRELES, M. A. A. Multicomponent model to describe extraction of ginger oleoresin with supercritical carbon dioxide. Industrial and Engineering Chemical Research. v. 42(5), 1057-1063, 2003.
- MAUL, A. A., WASICKY, R. & BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 5, 185-200, 1998.
- MAZUCHOWSKI, J. Z. A cultura da erva-mate. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural, Curitiba, PR, 36p, 1989.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, Theobromine and Theophylline distribution in *Ilex paraguariensis* St Hil. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. v. 6(2), 149-151, 1994.
- MCGINTY, D., LETIZIA, C. S. & API, A. M. Fragrance material review on phytol. Food and Chemical Toxicology. 48(3), S59-S63, 2010.
- McHUGH, M. A. & KRUKONIS, V. J. Supercritical fluid extraction: Principles and Practice. Butterworth Stoncham, 2 ed, 1994.
- MELLO, A. C. B., FREITAS, R. J. S., WASZCZYNSKYJ, N., KOEHLER, H. S., WILLE, G. M. F. C. & BERTO, K. A. S. Bebida Gaseificada de Erva-Mate Verde. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. v. 27(1), 19-26, 2009.
- MODEY, W. K., MULHOLLAND, D. A. & RAYNOR, M. W. Analytical supercritical fluid extraction of natural products. Phytochemical Analysis. v. 7, 1-15, 1996.
- MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 14(17), 344-353, 1997.
- MOSELE, S. H. A Governança na Cadeia Agro-Industrial da Erva-Mate na Região Alto Uruguai Rio-Grandense sob a Ótica da Cadeia de

Suprimentos. Dissertação de Mestrado. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

NATHANSON, J. A. Caffeine and related methylxanthines: possible naturally occurring pesticides. *Science*. 226(4671), 184-187, 1984.

OHEM, N. & HOLZL, J. Some new Investigations on *Ilex paraguariensis*: Flavonoides and Triterpenes. *Planta Med.* v. 54(6), 576, 1988.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-mate. Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba. Ed. Do autor, Série PADCT III, v. 1. 160p, 2000.

PENNA, E. W. Desarrollo de alimentos para regimenes especiales. In: JORNADAS IBEROAMERICANAS SOBRE EL DESAROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS, 1.,1999, Santa Cruz de la Sierra. Anais ... Bolívia: [s. n.] 1999, p. 26.

PEREIRA, C. & MEIRELES, M. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*. 3(3), 340-372, 2010.

PORTZ, C. R. I. S., ALMEIDA, F. Q., MASSARD, CARLOS L. & BOTTEON, P. Avaligao da Vitamina E como imunomodulador e infecgao intrauterina por *Theileria equi* empotro. *Parasitologia latinoamericana*. 62, 16-22, 2007.

RAMIREZ-MARES, M. V., CHANDRA, S., & DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutation Research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 554(1-2), 53-65, 2004.

RECASENS, F., ABAROUDI, K., TRABELSI, F. & CALLOUD-GABRIEL, B. Mass transport enhancement in modified supercritical fluid. *Industrial Engineering Chemistry Research*. v. 38, 3505-3518, 1999.

REGINATTO, F. H., ATHAYDE, M. L., GOSMANN, G. & SCHENKEL, E. P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 10(6), 443-446, 1999.

- REGO, R. A. & RÉ, R. Necessidade de novos produtos: crise crescente na indústria alimentícia. *Revista Engenharia de Alimentos*, v.12, 29-31, 1997.
- REISSMANN, C. B., RADOMSKI, M. I. & QUADROS, R. M. B. Relação entre os teores totais e a fração hidrossolúvel dos elementos K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn e Al em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 37(4), 959-971, 1994.
- REITZ, P. R. Flora ilustrada catarinense. Conselho Nacional de Pesquisas/CNPq, Itajaí, SC, 27-34, 1967.
- REVERCHON, E. Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Essential Oils and Related Products. *The Journal of Supercritical Fluids*. v. 10(1), 1-37, 1997.
- REVERCHON, E. & OSSÉO, L. S. Comparison of Processes for the Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil from Soybean Seeds. *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 71(9), 1007-1012, 1994.
- RIBEIRO, E. T. S. Emprego de Técnicas de Extração a Alta e Baixa Pressão para Obtenção de Polifenóis Antioxidantes do Subproduto Agroindustrial da Maça. Dissertação de Mestrado. UFSC, Florianópolis, SC, 2007.
- RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A. & DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food Technology*. v. 40(6), 55-65, 1986a.
- RIZVI, S. S. H., DANIELS, J. A., BENADO, A. L. & ZOLLWEG, J. A. Supercritical fluid extraction: operating principles and food applications. *Food Technology*. 40(7), 57-64, 1986b.
- SANTOS, A. R. S., NIERO, R., FILHO, V. C., YUNES, R. A., PIZZOLATTI, M. G., DELLE MONACHE, F. & CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. *Planta Medica*. 61(4), 329-332, 1995.
- SANTOS, M. G. M. Modelagem dinâmica e análise do processo de extração supercrítica de oleaginosas. Dissertação de Mestrado. USP, Campinas, SP, 2000.
- SIHVONEN, M., JARVENPAA, E., HIETANIEMI, V. & HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide

technologies. *Trends in Food Science & Technology*. 10(6-7), 217-222, 1999.

SIMÕES, C. M. A., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. D., MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Editora UFRGS/UFSC. 1 ed. Porto Alegre-Florianópolis, 655p, 1999.

SOFFIETTI, M. G., NEBBIA, C., VALENZA, F., AMEDEO, S. & RE, G. Effects of theobromine in mature and immature rabbits. *Journal Comp Pathol*. 100, 47–58, 1989.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids* 33(1), 35-52. 2005.

STUART, G. R., *Extração de Óleo Essencial de Ocimum basilicum* L. Utilizando Dióxido de Carbono à Altas Pressões. Dissertação de Mestrado. UFSC, Florianópolis, SC, 1995.

THAKUR, M. L. & SRIVASTAVA. Uma Shankar Vitamin-E metabolism and its application. *Nutrition Research*. 16(10), 1767-1809, 1996.

VALDUGA, E. Caracterização química e anatômica da folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) e de espécies utilizadas na adulteração do mate. Dissertação de Mestrado. UFPR, Curitiba, PR, 1994.

VIEIRA, A. R. R., SUERTEGARAY, C. E. O., HELDWEIN, A. B., MARASCHIN, M. & SILVA, A. L. Influência do microclima de um sistema agroflorestral na cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) *Revista Brasileira de Agrometeorologia*. v. 11(1), 91-97, 2003.

WATSON, J. Caffeine. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 745-750, 2003.

WINDHOLZ, M., BUDAVARI, S., BLUMETTI, R. F. & OTTERBEIN, E. S. *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 10 ed. Merck & CO. Inc.: Rahway, N. J., United States of America, 1260p, 1983.

ZAMPIER, A. C. Avaliação de níveis de nutrientes, cafeína, e taninos em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Dissertação de Mestrado. UFPR, Curitiba, PR, 2001.

ODINOKOV, V. N., SPIVAK, A. Y., EMELYANOVA, G. A., MALLYABAEVA, M. I., NAZAROVA, O. V. & DZHEMILEV, U. M. Synthesis of α -tocopherol (vitamin E), vitamin K1-chromanol, and their analogs in the presence of aluminosilicate catalysts Tseokar-10 and Pentasil. ARKIVOC, (xiii), 101-118, 2003.

ANEXOS

Anexo I - Equações do Modelo Sovová (2005)

Após as hipóteses consideradas por Sovová (2005), o balanço diferencial de massa é representado pela equação descrita abaixo:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u \cdot \partial C}{\varepsilon \cdot \partial h} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \cdot \frac{\rho_s}{\rho_f} \cdot \frac{\partial x}{\partial t} = 0 \quad (1)$$

O rendimento da extração é dado por:

$$e = \frac{\dot{Q}}{t} \cdot \int_0^t C(h = H) \cdot dt \quad (2)$$

Onde:

\dot{Q} - taxa de solvente na alimentação ($g_{\text{solvente}}/g_{\text{amostra}}$);

ε - porosidade do leito;

x - concentração mássica de soluto na fase sólida ($g_{\text{solute}}/g_{\text{sólido}}$);

C - concentração mássica de soluto na fase fluida ($g_{\text{solute}}/g_{\text{solvente}}$);

u - velocidade superficial do solvente (cm/s);

h - distância axial ao longo do leito (cm);

H - altura do leito de extração (cm);

ρ_f - densidade do fluido (g/cm^3);

ρ_s - densidade do sólido (g/cm^3);

t - tempo (s);

A condição inicial é dada por (considerando a concentração homogênea em ambas as fases):

$$C(h, t = 0) = C_0 \quad (3)$$

A condição de contorno é dada por:

$$C(h = 0, t) = 0 \quad (4)$$

O modelo Sovová assume parte do soluto como disponível, enquanto que outra parte se encontra menos acessível (no interior das células) durante o processo de extração. Desta forma, assume-se uma relação linear de equilíbrio entre a fase sólida e fluida:

$$x^* = KC \quad (5)$$

A primeira etapa da extração ($x > x_k$) é governada pelo equilíbrio, sendo x_k a quantidade inicial de soluto de difícil acesso. Após substituir $x = x^*$ na equação 1, teremos:

$$\frac{u \cdot \partial C}{\varepsilon \cdot \partial h} + \left(1 + \frac{(1 - \varepsilon) \rho_s}{\varepsilon \rho_f} K \right) \frac{\partial C}{\partial t} = 0 \quad (6)$$

Para a segunda etapa da extração ($x < x_k$), onde a extração é controlada pela difusão, o balanço de massa para a fase sólida será:

$$\frac{\partial x}{\partial t} = -k_s a_s \cdot (x - x^*) \quad (7)$$

O sistema de Equações 1, 5 e 7 é então integrado a partir das concentrações locais obtidas ao final do período controlado pelo equilíbrio, juntamente com as condições iniciais e condições de contorno:

$$x(h, t = 0) = x_u \quad (8)$$

A fim de habilitar a aplicação de diferentes tipos de equilíbrio de fases e diferentes modos de escoamento, Sovová (2005) propõem que a fração inicial de soluto nas células rompidas seja introduzida como um parâmetro do modelo (r):

$$r = 1 - \left(\frac{x_k}{x_u} \right) \quad (9)$$

Por fim, para o fluxo *plug flow*, Sovová (2005) considera que a extração supercrítica pode ser dividida em duas etapas distintas. Na primeira, predomina o soluto de fácil acesso, em que a resistência a transferência de massa encontra-se na fase fluida, enquanto na segunda etapa, o extrato de fácil acesso esgota-se, predominado o processo difusivo. Neste modelo de equilíbrio, a primeira e a segunda fase da curva de extração são representadas pelas Equações 10 e 11, respectivamente.

$$e_{cal} = q \cdot \frac{K \cdot x_u}{1 + K \cdot (\gamma / r)} = q \cdot y_o \quad \text{para } 0 \leq q \leq q_c \quad (10)$$

$$e_{cal} = x_u \cdot [1 - C_1 \cdot \exp(-C_2 \cdot q)] \quad \text{para } q > q_c \quad (11)$$