



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA  
DESCAFEINIZAÇÃO DA ERVA-MATE POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO  
SUPERCRÍTICO**

**GUSTAVO DO NASCIMENTO FRANCESCHINI**

**ENGENHEIRO QUÍMICO**

ORIENTADOR: PROF. Dr. Eduardo Cassel

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. Rubem M.F Vargas

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Março, 2017**

## DEDICATÓRIA

À minha família.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA DESCAFEINIZAÇÃO DA ERVA MATE POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO**

**CANDIDATO: GUSTAVO DO NASCIMENTO FRANCESCHINI**

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR**

### **BANCA EXAMINADORA**

**DRA. LÍGIA DAMASCENO FERREIRA MARCZAK - DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA  
QUÍMICA - UFRGS**

**DRA. GERTI WEBER BRUN - DA FACULDADE DE ENGENHARIA - PUCRS**

**DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

**PUCRS**

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a orientação dos Professores Eduardo Cassel, Rubem Mário Figueiró Vargas e Aline Machado Lucas.

Agradeço a equipe do LOPE pela ajuda e companheirismo, em especial aos meus companheiros matinais: Alexandre, Manuel e Guilherme.

Agradeço também aos meus grandes amigos Paulo Henrique Konat Gandolfi e Juliano Boese pela ajuda na elaboração deste trabalho.

Por fim, agradeço a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>6</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Erva-mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill) .....	18
3.2 Cafeína .....	21
3.3 Extração Supercrítica .....	23
3.3.1 Processos de Extração Supercrítica .....	24
3.3.2 Influência das Propriedades da Matéria-Prima e das Variáveis de Processo na Extração de Cafeína .....	26
3.3.2.1 Propriedades da Matéria-Prima .....	26
3.3.2.2 Propriedades do Processo de Extração .....	27
3.4 Modelagem Matemática .....	28
3.5 Propriedades Medicinais da Erva-mate .....	30
<b>4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
4.1 Artigo 1: Evaluation of an Infusion obtained from Decaffeinated Yerba Mate Processed by Supercritical Fluid Extraction on the Cell Viability of Human Esophageal Cancer .....	32
4.2 Artigo 2: Otimização do Processo de Remoção de Cafeína das Folhas de Erva-mate por Extração Supercrítica em Diferentes Etapas do Processamento: Experimentos e Modelagem Matemática .....	51
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>66</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 Estrutura molecular: 1 – cafeína, 2 – teofilina, 3 – teobromina. ....21
- Figura 3.2 Diagrama de uma unidade industrial de extração supercrítica.....25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Solubilidade da cafeína em CO <sub>2</sub> a 313 K e a 333 K.....	22
--	----

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\rho_a$	Massa aparente	g/cm <sup>3</sup>
$\rho_e$	Massa Específica	g/cm <sup>3</sup>
$\varepsilon$	Porosidade	%
$V_s$	Volume real	cm <sup>3</sup>
$V_c$	Volume da célula	cm <sup>3</sup>
$V_r$	Volume de referência	cm <sup>3</sup>
$P_1$	Pressão da câmara de expansão	psig
$P_2$	Pressão do reservatório de gás	psig
$m$	Massa	g
$T_c$	Temperatura crítica	K
$P_c$	Pressão crítica	bar
$m_p$	Diâmetro médio de partícula	m
$A_{cs}$	Área da sessão do vaso extrator	m <sup>2</sup>
$C(z,t)$	Concentração de extrato na fase supercrítica	g/ml
$u$	Velocidade intersticial	m/s
$K_{mt}$	Coeficiente de transferência de massa	s <sup>-1</sup>
$K_{eq}$	Constante de equilíbrio	m <sup>3</sup> /kg



## RESUMO

DO NASCIMENTO FRANCESCHINI, Gustavo. **AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO E OPERAÇÃO NA DESCAFEINIZAÇÃO DA ERVA-MATE POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO.** *Porto Alegre, Brasil. 2017.* Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O processo de extração de cafeína da erva-mate apresenta-se como uma atividade economicamente atrativa, capaz de gerar dois produtos com alto valor de mercado, a erva-mate descafeinada, um produto diferenciado e a cafeína natural, composto com uma crescente demanda no mercado atual. A proposta deste trabalho foi avaliar o efeito das propriedades do material vegetal e das condições operacionais de processo de extração na remoção da cafeína da erva-mate. Para isto, utilizou-se a tecnologia de extração supercrítica. As propriedades do material vegetal estudadas foram granulometria, densidade e teor de umidade. Após definirem-se os parâmetros ótimos, avaliou-se o efeito do processamento da erva-mate em três diferentes etapas na melhor condição: fresca, sapecada e cancheada. Quanto às condições de operação, avaliou-se a influência da porosidade e do teor de cossolvente (etanol) durante o processo de extração, com a pressão e a temperatura de operação sendo fixadas em valores ótimos para a remoção de cafeína. Ainda, verificou-se o efeito da razão massa de planta/massa de solvente utilizado. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Como resultado deste estudo observou-se que o aumento do teor de umidade presente na planta favoreceu a remoção de cafeína, atingindo uma concentração final de 0,30% de cafeína (g/100g), enquanto que a utilização de etanol como cossolvente durante o processo de extração resultou em uma concentração final de 0,03% (g/100g) de cafeína. Para o processamento, a amostra sapecada apresentou os melhores resultados, tanto em relação ao rendimento de extrato obtido como em relação à remoção de cafeína. Quanto à atividade biológica do produto descafeinado, verificou-se que as infusões de erva-mate diminuem a viabilidade celular de diferentes linhagens celulares de câncer de esôfago e que este efeito é independente da concentração de cafeína na planta. Por fim, procedeu-se a

modelagem matemática da curva de extração a fim de correlacionar as variáveis de processo com os dados experimentais.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*; cafeína; descafeinização; CO<sub>2</sub> supercrítico; extração; câncer esofágico.

## ABSTRACT

DO NASCIMENTO FRANCESCHINI, Gustavo. **EVALUATION OF THE EFFECT OF PROCESS VARIABLES IN DECAFFEINATION OF YERBA MATE BY EXTRACTION WITH SUPERCRITICAL FLUID.** Porto Alegre, Brazil. 2017. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

The caffeine extraction process of yerba mate presents itself as an economically attractive activity, capable of generating two products with high market value, decaffeinated yerba mate, a differentiated product and natural caffeine, a compound with a growing demand in the current market. The purpose of this study was to evaluate the effect of the properties of plant material and the effect of process operating conditions in the caffeine removal from mate through supercritical extraction. To this objective, supercritical carbon dioxide extraction technology was used. The studied characteristics of the plant material were particle size, density and moisture content. After the optimum parameters were defined, the effect of the processing to which yerba mate is submitted was also evaluated, in three different stages: harvesting, zapecado and cancheamento. As for the operating conditions, it was assessed the influence of the porosity and the cosolvent content (ethanol) during the extraction process, with the pressure and operating temperature were set at optimum values for the removal of caffeine. Still, the effect of the mass ratio plant / solvent weight used was also studied. The extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography. It was observed that increasing water content present in plant favored removal of caffeine, reaching a final concentration of 0.30% of caffeine (g / 100g), while the use of ethanol as cosolvent during the extraction process yielded in a final concentration of 0.03% (g / 100g) caffeine. For the processing, the zapecada sample presented the best results overall, both in yield of extract obtained and caffeine removal. Regarding the biological activity of the decaffeinated product, it was verified that the infusions of yerba mate decreased the cell viability of different cell lines of esophageal cancer and that this effect was independent of the concentration of caffeine present in the plant. Finally, the

mathematical modeling of the extraction curve was performed in order to correlate the variables of the process with the experimental data.

Key words: *Ilex paraguariensis*; caffeine; decaffeination; CO<sub>2</sub> supercritical; esophageal cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

A erva-mate, ou *yerba mate*, como é chamada nos países de língua espanhola, é um importante símbolo cultural de países do continente sul-americano, entre eles Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Da infusão desta planta com água quente tem-se o chimarrão, bebida característica desta região. A erva-mate pode ser uma fonte natural de cafeína, um composto em crescente demanda no mercado (Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior, 2015) e comumente encontrado em diferentes produtos, como bebidas energéticas, refrigerantes e café, medicamentos e em produtos que contenham cacau ou café (Clark and Landolt, 2017; van Hilten, 2011). Neste cenário, o processo de descafeinização de suas folhas surge como uma alternativa tecnológica a ser desenvolvida, gerando não só a cafeína como um produto de interesse econômico, como também produtos descafeinados, ambos com alto valor de mercado.

Dados do balanço comercial de cafeína brasileira em 2015 apontam que a importação desta foi amplamente superior à exportação, com um déficit aproximado de R\$ 9,5 milhões de reais (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2015). Além disso, produtos descafeinados visam atender uma determinada parte da população suscetível a problemas de saúde causados pela ingestão de produtos que contenham cafeína, como crianças, gestantes e pessoas com problemas cardíacos (Clark and Landolt, 2017; Filip et al., 1998; Lisowski and Tochowski, 2011). Sabe-se que a cafeína age no sistema nervoso central, muscular e circular (Cardozo et al., 2007), aumentando a capacidade de concentração e agindo contra o cansaço (Tello et al., 2011). Ao mesmo tempo, alguns sintomas adversos são relatados, entre eles, insônia, ansiedade e nervosismo, (Tello et al., 2011), além de alterações no batimento cardíaco (Clark and Landolt, 2017; Nawrot et al., 2003). Ainda, estudos relacionam o consumo de produtos que contenham cafeína a alguns tipos de câncer, sendo a principal causa a alta temperatura em que

estes produtos são consumidos. Dentre eles, destaca-se o câncer esofágico, o sexto tipo de câncer que mais causa mortes em todo o mundo (Arnal et al., 2015).

Para um produto ser desconsiderado descafeinado, este deve possuir uma quantidade máxima de cafeína de 0,1% (g/100g) de acordo com a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Mello, 2005). Assim, deve-se encontrar não só a tecnologia correta, mas também otimizar as variáveis de processo de modo que a extração de cafeína seja maximizada, a fim de atender a legislação e se obter um produto que possa ser de fato considerado descafeinado.

Dentre as tecnologias existentes para a extração de cafeína, destaca-se o processo de extração com dióxido de carbono supercrítico (Bermejo et al., 2016; Park et al., 2012; Sharif et al., 2014). Desenvolvida no início de 1980, esta tecnologia rapidamente tornou-se objeto de grande interesse, visto que substituía os processos extrativos que usavam solventes orgânicos que apresentam a alta toxicidade como os solventes clorados (Cassel et al., 2010, 2008; Sovová, 1994).

A extração supercrítica baseia-se nas propriedades de solvatação de um fluido em condição supercrítica, que, por sua vez, pode ser obtida quando sua temperatura e pressão são elevadas acima dos valores críticos em uma única fase. Basicamente, a extração supercrítica é um método de separação e purificação que possui algumas vantagens quando comparada aos métodos mais tradicionais, como o alto rendimento de extrato obtido, a facilidade de separação soluto-solvente, a não produção de resíduos e a possibilidade de se trabalhar em baixas temperaturas (Nascimento et al., 2016). Reverchon (1997) já considerava este processo como uma alternativa viável para substituir os métodos tradicionais como a extração por arraste a vapor e a extração por solvente a baixa pressão. De fato, entre os anos 2000 e 2013 extratos de mais de 300 plantas foram obtidos através da extração supercrítica (de Melo et al., 2014).

Estudos sobre extração de cafeína por extração supercrítica mostram que diversos fatores devem ser levados em conta a fim de se remover uma quantidade significativa desta do material vegetal. Estes vão desde as condições de operação do processo (temperatura, pressão e solvente) até as condições físicas da matéria-

prima (granulometria e teor de umidade (Bermejo et al., 2016; Içen and Gürü, 2010; Park et al., 2012; Tello et al., 2011).

Entre as atividades associadas ao estudo do processo de extração, faz-se necessário também o uso de modelos matemáticos que relacionam o rendimento de extrato com o tempo como forma de correlacionar os dados experimentais e interpolar ou extrapolar estes a fim de aplicá-los a futuros estudos de extração supercrítica. A partir da modelagem matemática é possível generalizar os resultados experimentais, podendo aplicá-los para novas condições de um novo processo e/ou para outros materiais ainda não estudados. Além disso, a modelagem se torna muito útil para levar estes estudos da escala de laboratório para a escala piloto e/ou industrial (Cabeza et al., 2016; Reverchon, 1997; Scopel et al., 2013).

Além da erva-mate, outros materiais vegetais que contêm cafeína em sua estrutura também são estudados quanto a sua relação com o câncer esofágico, como o chá e o café (Arnal et al., 2015). Visto que as infusões destes materiais possuem cafeína naturalmente, mas atuam de maneira diferente no organismo, considera-se neste estudo a necessidade de avaliar se o efeito da presença ou não cafeína influi no desenvolvimento do câncer esofágico. Ciente que o principal motivo para o desenvolvimento desta doença é a alta temperatura em que o chimarrão é consumido, é fundamental avaliar se a ausência de cafeína na infusão também influi no desenvolvimento do câncer esofágico.

O objetivo deste trabalho é a extração de cafeína das folhas de erva-mate por extração supercrítica de modo que se tenha um produto considerado descafeinado perante a legislação brasileira a partir do estudo de diferentes variáveis de processo. As propriedades do material vegetal avaliadas foram a granulometria, a densidade e o teor de umidade. Após definirem-se os parâmetros ótimos de extração, avaliou-se o efeito do processamento da erva-mate em três diferentes etapas do processamento industrial: colheita, branqueamento e cancheamento. Quanto às condições de operação, avaliou-se a influência da porosidade e do teor de cossolvente (etanol) durante o processo de extração, com a pressão e a temperatura de operação sendo fixadas em valores ótimos para a remoção de cafeína. Ainda, analisou-se o efeito da razão massa de planta/massa de solvente utilizado no teor

de cafeína removido, assim como a viabilidade celular de extratos com cafeína e sem cafeína em diferentes linhagens de câncer esofágico. A concentração final de cafeína presente na erva-mate foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Por fim, foi realizada a modelagem matemática da curva de extração rendimento *versus* tempo, gerando uma ferramenta importante para o *scale-up* do processo.



## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é a obtenção de erva-mate descafeinada de acordo com as normas da ANVISA, ou seja, com concentração máxima de cafeína de 0,1% m/m, a partir da tecnologia de extração por dióxido de carbono supercrítico e misturas deste com etanol. Para isso, será avaliado o efeito de diferentes variáveis de processo na remoção de cafeína.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Avaliação dos efeitos das propriedades da matéria prima (granulometria, densidade, teor de umidade do material vegetal e etapa de processamento) no rendimento de extrato e concentração final de cafeína na erva-mate.

- Avaliação dos efeitos das variáveis do processo de extração no rendimento de extrato e concentração final de cafeína na erva-mate, incluindo a temperatura e a pressão de operação.

- Avaliação da influência da relação solvente ( $\text{CO}_2$  + cossolvente) e massa de matéria prima utilizada no vaso extrator no rendimento de extrato e concentração final de cafeína na erva-mate.

- Definição da condição ótima de extração para a obtenção da erva-mate descafeinada levando em consideração as propriedades da matéria prima e as propriedades do processo.

- Modelagem matemática da curva de extração supercrítica do rendimento de extrato *versus* tempo;

- Avaliação do efeito da concentração de cafeína em infusões oriundas de erva-mate tradicional e erva-mate descafeinada na viabilidade celular de diferentes linhagens de câncer esofágico.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)

Conhecida popularmente como erva-mate, a *Ilex paraguariensis* St. Hill var. *paraguariensis* é uma espécie vegetal pertencente à família Aquifoliaceae. É encontrada naturalmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, nas províncias argentinas de Misiones e Corrientes e no leste do Paraguai. A partir da trituração de suas folhas e ramos secos é preparada a bebida chamada de chimarrão, quando misturada com água quente, ou tereré, quando utilizada água fria. O conhecimento e o consumo da erva-mate vêm desde o período em que o continente ainda era habitado quase que exclusivamente por povos indígenas (Colpo et al., 2016; Gerhardt, 2011; Thea et al., 2016).

Morfologicamente, duas variações de *Ilex paraguariensis* podem ser encontradas: *Ilex paraguariensis* St. Hill var. *paraguariensis* e a *Ilex paraguariensis* var. *vestita* Loes; esta última não é utilizada industrialmente devido à sua extrema pubescência, isto é, coberta com pelos finos (Bracesco et al., 2011).

O relatório de janeiro de 2014 do DERAL - Departamento de Economia Rural, aponta o Brasil com 860 mil toneladas de erva-mate produzidas, a Argentina com 690 mil toneladas e o Paraguai com 85 mil toneladas, O relatório ainda aponta que, segundo os dados do PAM – Pesquisa Agrícola Municipal, o Estado do Rio Grande do Sul lidera a produção de ervais cultivados no país, com 52% do total produzido, seguido pelo Estado do Paraná, com 38%. Em relação a ervais nativos, o Estado do Paraná possui 74% dos campos.

Mesmo sendo o maior produtor de erva-mate, o consumo per capita do Brasil é o mais baixo dentre os três países citados. O Uruguai é o primeiro desta lista, com

um consumo per capita de 8-10 kg/pessoa/ano, seguido pela Argentina, com 6,5 kg/pessoa/ano. No Brasil, visto que a grande concentração de consumidores de erva-mate encontra-se ao sul do país, estima-se que o consumo per capita seja de 3-5 kg/pessoa/ano. Ao mesmo tempo, aproximadamente 70% da população destes Estados consomem a infusão de erva-mate. Atualmente, a erva-mate já deixou de ser um produto utilizado somente na América do Sul, sendo exportado para os Estados Unidos, Europa e Ásia (Cardozo et al., 2007; Cardozo Junior and Morand, 2016).

O processamento da erva-mate abrange diversas etapas até estar pronta para o consumo. Algumas etapas do processo podem sofrer alterações de acordo com a indústria em que é realizado, mas o procedimento geralmente segue o seguinte roteiro apresentado a seguir (Butiuk et al., 2016; Daniel, 2009; Isolabella et al., 2010):

- a) Colheita – folhas verdes e pequenos talos são cortados manualmente ou com auxílio de máquinas e transportados até a unidade de processamento.
- b) Branqueamento – também chamado de sapeco, esta etapa é realizada para evitar a oxidação e, conseqüentemente, o enegrecimento das folhas após a secagem. Durante o sapeco, a folha perde até 25 % de umidade, sendo exposta a temperaturas que podem variar de 250 a 500° C. Recomenda-se que este procedimento seja realizado imediatamente após o corte, para evitar-se perda de qualidade do produto.
- c) Secagem – etapa complementar ao sapeco. A planta é seca até atingir um teor de umidade baixo - aproximadamente 3 a 4 %. Dependendo da forma que a secagem for feita, esta pode durar até 18 horas.
- d) Fragmentação ou moagem – após secas, as folhas são trituradas para facilitar o manuseio e o transporte. Como nos primórdios do processamento de erva-mate se trabalhava com o material em grandes canchas com animais movimentando um rolo de madeira para realizar a moagem, este processo de fragmentação também é chamado de cancheamento. Hoje, a fragmentação mecânica é mais utilizada.

e) Envelhecimento – esta etapa somente ocorre se for de interesse do mercado a qual a erva-mate será distribuída. Para o chimarrão habitual do Brasil, o material é armazenado o menor tempo possível, para estar novo e manter a coloração verde. Já para o mercado internacional, principalmente Argentina e Uruguai, a erva-mate deve permanecer um determinado tempo envelhecendo. Este processo altera tanto o aroma como o gosto do produto final, deixando-o com um tom mais amarelado, características desejadas neste mercado. Este período pode levar até 6 meses para o processo natural e de 30 a 60 dias para o processo forçado, em que o produto é armazenado em galpões com temperatura, umidade e circulação de ar controlados. Após este processo, recebe o nome de erva-mate estacionada.

f) Preparações finais – etapa final de processamento consiste no ajuste da granulometria da erva-mate através de um novo processo de moagem seguido de peneiramento. À erva-mate cancheada, alguns talos são adicionados antes do empacotamento, enquanto que para a erva-mate estacionada o produto final consiste de folha pura.

A erva-mate pode ser utilizada em diversas aplicações industriais, dentre elas: insumo de alimentos, matéria prima de medicamentos e produtos de higiene geral e de uso pessoal. A aplicação de maior destaque, porém, é a produção de bebidas (Butiuk et al., 2016; EMBRAPA, 2014).

A fim de verificar os efeitos que o consumo da erva-mate tem no organismo, faz-se necessário analisar a composição química da folha de maneira aprofundada. Conforme Simões et al. (2010) a folha da erva-mate apresenta os seguintes compostos: metilxantinas (cafeína – 0,6 a 2,0%, teobromina – 0,3% e traços de teofilina), taninos (ácidos fólico e cafeico), vitaminas (A, B e C), polifenóis (principalmente ácido clorogênico e ácido cafeico), saponinas, sais minerais (sódio, alumínio, cálcio, fósforo, ferro, magnésio, zinco, manganês e potássio), açúcares (frutose, glucose, rafinose e sacarose), flavonoides (quercetina, kaempferol) e lipídeos (óleos essenciais e substâncias ceráceas).

### 3.2 Cafeína

A cafeína é uma metilxantina pertencente à família dos alcaloides, de fórmula 1,3,7 – trimetilxantina e com massa molar de 194,19 g/mol (Mazzafera, 1997). Por ter propriedades estimulantes, é utilizada principalmente na produção de bebidas, como chás, cafés e refrigerantes, além de produtos cosméticos e farmacêuticos (Rodrigues et al., 2016). Foi descoberta pela primeira vez em 1820, no chá (*Camellia sinensis*) e no café (*Coffea arabica*). A cafeína na erva-mate somente foi encontrada 20 anos depois (Ashihara and Crozier, 2001). Hoje se sabe que a cafeína é encontrada naturalmente em diversas espécies vegetais, como sementes de café (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*), folhas utilizadas na produção de chás (*Camellia sinensis*), sementes de guaraná (*Paullinia cupana*), folhas de erva-mate, sementes de castanha (*Cola nitida*, *Cola acuminata*) e sementes de cacau (*Theobroma cacao*) (Demissie et al., 2016; Jin et al., 2016; Tello et al., 2011).

Além disso, a cafeína difere-se de outras metilxantinas importantes por possuir três grupos metil ao invés de somente dois, como é o caso da teobromina e da teofilina, também presentes em algumas matérias-primas citadas. Na Figura 3.1 são apresentadas as estruturas moleculares dos três compostos citados.

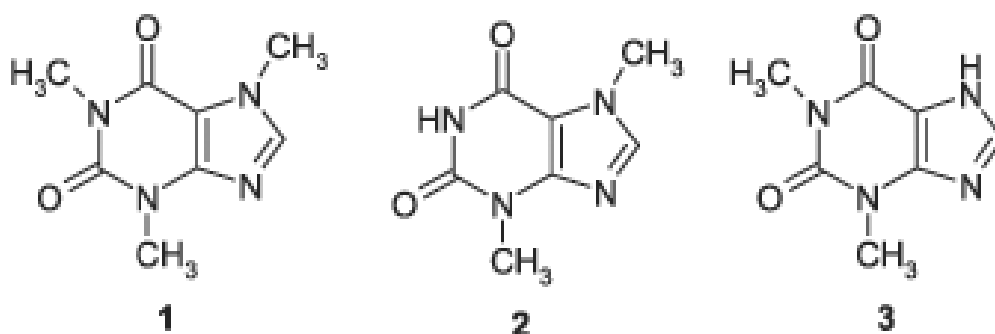


Figura 3.1 Estrutura molecular: 1 – cafeína, 2 – teofilina, 3 – teobromina.

Adaptado de BRUN, (2012)

Dentre as substâncias consideradas estimulantes, a cafeína é a mais consumida no mundo, sendo parte do cotidiano de diversos países (Clark and

Landolt, 2017). Em sua forma natural, a cafeína é um pó branco, cristalino e inodoro, com partículas em forma de agulhas (Mazzafera e Carvalho, 1991). A cafeína é pouco solúvel em água a baixas temperaturas, porém sua solubilidade aumenta com aumento de temperatura, variando de 0,60 a 19,23 g/100 g de água de 0 a 80 °C (Sfredo, 2002). A solubilidade da cafeína em gás carbônico é apresentada na Tabela 3.1 a 313 K e a 333 K e em diferentes pressões (B Gupta and Shim, 2007). Para efeito de comparação, a solubilidade da cafeína na água a 353 K em fração molar pode chegar a até 21739.

Tabela 3.1 Solubilidade da cafeína em CO<sub>2</sub> a 313 K e a 333 K.

Temperatura (K)	Pressão (bar)	Solubilidade (fração molar) x 10 <sup>6</sup>
313	279	428
	299	458
	319	485
	349	544
333	279	587
	299	607
	319	625
	349	722

Para a descafeinização de grãos e folhas de materiais vegetais, três processos são conhecidos: a extração com água quente (Brenelli, 2003; Gnoatto et al., 2007; Liang et al., 2007), a extração com solventes orgânicos a baixas pressões (Gnoatto et al., 2007; Anesini et al., 2012) e a extração por fluido supercrítico (Bermejo et al., 2016; Park et al., 2007, 2012; Tello et al., 2011). Neste contexto, destaca-se que a extração supercrítica é a opção mais utilizada na indústria alimentícia, por ser considerada mais segura e sustentável para a preparação de extratos de materiais orgânicos (de Melo et al., 2014).

Para um produto ser considerado descafeinado este deve ter um teor máximo de cafeína de 0,1% (g/100g) para produtos descafeinados e de 0,3% (g/100g) para produtos solúveis descafeinados (ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005).

### 3.3 Extração Supercrítica

A extração de compostos voláteis e não voláteis de plantas pode ser feita através de diferentes procedimentos, os quais geralmente são separados em dois grupos: os métodos clássicos - hidroddestilação, extração por arraste a vapor e a extração com solventes orgânicos (Asbahani et al., 2015) e os métodos considerados avançados ou inovadores - extração por ação de enzimas, extração com ultrassom, extração com auxílio de micro-ondas e extração supercrítica (Aguiar et al., 2016; Azmir et al., 2013; Nascimento et al., 2016).

A extração supercrítica baseia-se nas propriedades de solvatação de um fluido em condição supercrítica. Basicamente, a extração supercrítica é um método de separação e purificação que vem sendo utilizado nos últimos anos, principalmente por apresentar algumas vantagens quando comparada aos métodos clássicos de extração, como o alto rendimento de extrato obtido, a facilidade de separação soluto-solvente, a não produção de resíduos e a possibilidade de se trabalhar em baixas temperaturas quando se utiliza CO<sub>2</sub> como solvente (Nascimento et al., 2016; Park et al., 2012; Taylor, 1996; Tello et al., 2011).

O início do uso desta tecnologia se deu na Alemanha, no final dos anos 70, com a descafeinização do café. A partir daquele momento, rapidamente novas aplicações surgiram, como a remoção de colesterol da manteiga, produção de lúpulo para cervejarias, obtenção de aromas e fragrâncias a partir de plantas aromáticas (Reverchon, 1997) e a obtenção de princípios ativos para a indústria farmacêutica. Atualmente, fluidos supercríticos estão sendo aplicados também na produção de nano e micropartículas para a produção de fármacos (Aguiar et al., 2016; Montes et al., 2016).

O solvente mais utilizado é o dióxido de carbono, por ser um gás inerte, não inflamável e não tóxico. Além disso, possui um custo baixo em relação a outros solventes utilizados para a mesma finalidade e existe em alto grau de pureza, podendo ser facilmente reciclado e eliminado para o ambiente (Nascimento et al., 2016).



Juntamente com o dióxido de carbono, destacam-se outros solventes que podem participar da extração, ainda que em menor quantidade, recebendo a denominação de cossolventes. Como exemplo, têm-se a água, o etanol e o metanol. Estes são adicionados ao dióxido de carbono com a finalidade de alterar a polaridade do solvente e tornar o processo seletivo a uma determinada classe de compostos (Bermejo et al., 2016; Cassel et al., 2008). Para o caso específico da extração de cafeína, o uso de etanol é mais indicado por dois fatores principais: ter uma polaridade menor que a da água, mais próxima à polaridade da cafeína (à temperatura ambiente e pH neutro, a cafeína é pouco solúvel em água), além de possuir uma maior solubilidade no dióxido de carbono, facilitando assim a remoção deste composto (B Gupta and Shim, 2007; Park et al., 2007).

### 3.3.1 Processos de Extração Supercrítica

Os processos de extração supercrítica podem ocorrer em três diferentes escalas: laboratorial, piloto e industrial (Figura 3.2). Em menor escala, a laboratorial é empregada na preparação de amostras para a química analítica. Já no segundo caso, o desenvolvimento do processo é o foco principal, visando o *scale-up* para o processo industrial. Neste, são realizados experimentos que não necessitam de quantidades muito grandes de matérias primas e/ou extratos e, com o auxílio da modelagem matemática do processo, torna-se possível empregar estes dados na definição do projeto de um processo em escala industrial. Por fim, tem-se o processo em escala industrial, destacando-se como principais aplicações a extração de nicotina do cigarro, a descafeinização do café e chá e a produção de lúpulo para a produção de cervejas. Neste processo, ocorre a recirculação do solvente, ao contrário dos anteriores (de Melo et al., 2014).

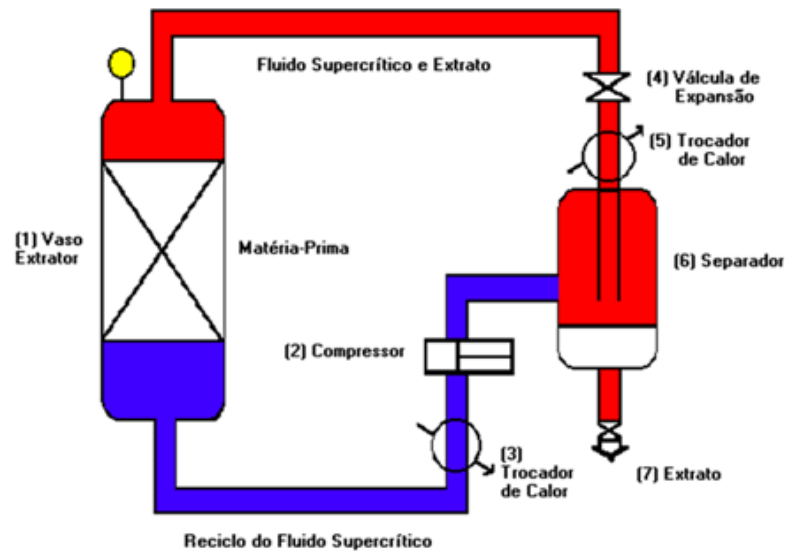


Figura 3.2 Diagrama de uma unidade industrial de extração supercrítica.

FONTE: (Cassel et al., 2008)

Independente da escala a ser utilizada, a aparelhagem para o processo de extração supercrítica conta com os seguintes equipamentos: trocadores de calor, bomba de alta pressão ou compressor, vaso de extração, vaso de expansão e válvula de expansão, além dos controladores e alarmes de temperatura, pressão e vazão, necessários para o controle, otimização e segurança do processo (Cassel et al., 2011).

Quando se trabalha com cossolvente, este é alimentado ao processo por uma bomba de cossolvente, fluindo pela tubulação e misturando-se com o solvente antes do pré-aquecedor. Assim, há a homogeneização entre ambos previamente à entrada no vaso extrator. Ao fim da extração, os solventes e o extrato são direcionados a uma válvula de expansão, acarretando em uma queda de pressão e, conseqüentemente, uma diminuição da solubilidade do extrato no solvente. O extrato precipita no vaso separador, enquanto que o CO<sub>2</sub> é liberado para a atmosfera ou reaproveitado, no caso de ser um processo industrial (Scopel et al., 2013). Caso haja a utilização de cossolvente, este é recolhido junto ao extrato no vaso separador e posteriormente evaporado.

### 3.3.2 Influência das Propriedades da Matéria-Prima e das Variáveis de Processo na Extração de Cafeína

Estudos foram realizados por diferentes autores com o objetivo de extrair cafeína de diferentes materiais vegetais utilizando fluidos supercríticos como solventes. Porém, há poucos trabalhos empregando a erva-mate como matéria-prima (Cassel et al., 2010; Saldaña et al., 1999), sendo mais comuns estudos de descafeinização de chás ou cafés (Bermejo et al., 2016; Içen and Gürü, 2010; Kim et al., 2008; Park et al., 2007, 2012; Tello et al., 2011), ambos os produtos já existentes no mercado na condição de descafeinados. Assim, esta seção apresentará alguns dados destes trabalhos citados, demonstrando o efeito das propriedades das matérias-primas e das variáveis de processo na extração de cafeína. Em relação às propriedades das matérias-primas, as variáveis teor de umidade, granulometria e origem do material vegetal se mostraram mais importantes. Quanto às variáveis de processo se destacam a temperatura e pressão de operação e seleção e concentração de co-solvente adicionada ao CO<sub>2</sub> supercrítico.

#### 3.3.2.1 Propriedades da Matéria-Prima

Vieira et al., (2008) moeram folhas de erva-mate até a obtenção de um pó fino e identificaram que este contém altos níveis de polifenóis totais e continuando esta pesquisa, Vieira et al., (2010) caracterizaram mais a fundo este mesmo pó, encontrando não só polifenóis, mas também metilxantinas e taninos e ainda observando uma forte atividade antioxidante. Alguns destes compostos, inclusive, fizeram-se presentes em maior concentração do que nas amostras comerciais de erva-mate.

Cardozo et al., (2007) caracterizaram 16 amostras de erva-mate de diferentes partes do Brasil e encontraram diferenças de até 25% em relação ao teor de metilxantinas. Ainda, observaram que o teor de teobromina foi inversamente proporcional ao teor de cafeína. Por fim, estudos no mesmo tipo de material realizados por Pagliosa et al., (2010) constataram que o teor de metilxantinas, como cafeína e teobromina, foi maior nas folhas puras do que nos galhos residuais.

Tello; Vigueira; Calvo, (2011), realizaram extrações com dióxido de carbono supercrítico variando a umidade de sementes de café Robusta (*Coffea canephora* var. Robusta). Aumentando em duas vezes a umidade inicial das sementes, a quantidade de cafeína extraída aumentou em praticamente 5 vezes, porém qualquer aumento acima disso diminuiu este resultado, mostrando que para este caso há um valor máximo de umidificação ótimo.

Peker et al., (1992) umidificaram sementes de café por meio de um agitador mecânico em tempos variando de 0.5 a 24 horas. Os resultados obtidos mostraram que há um aumento considerável de cafeína obtida nos extratos de planta úmida em relação aos de planta seca, sendo o maior destes valores no ponto de maior tempo de umidificação.

Butiuk et al., (2016) avaliaram a quantidade de ácido clorogênico em folhas frescas de erva mate e em folhas processadas e notaram diminuição do conteúdo inicial nas folhas após processamento. Em um estudo semelhante, Isolabella et al., (2010), avaliaram o efeito de processamento industrial na variação da quantidade dos principais compostos presentes nas folhas de erva mate, como metilxantinas e flavonoides, também encontrando diferenças de quantidade destes compostos entre as folhas frescas e as folhas processadas.

### 3.3.2.2 *Propriedades do Processo de Extração*

Dentre as condições de operação do processo de extração supercrítica, a temperatura e a pressão são muito importantes, pois mudanças nestas variáveis alteram as propriedades do solvente utilizado, alterando assim os compostos extraídos. Kim et al. (2008) estudaram a extração de cafeína de chá verde com a utilização de água como cossolvente em diferentes condições de pressão e temperatura. Quando a pressão foi fixada em 400 bar, o aumento da temperatura de 40° a 80° C favoreceu a extração de cafeína em até 18%. Já quando a temperatura foi fixada em 50°C, notou-se que a 100 bar o conteúdo de cafeína extraído foi praticamente inexistente. Na condição de 400 bar, o rendimento encontrado nesta temperatura foi de 59%. Seguindo a mesma linha, Içen; Gürü (2010) analisaram a extração de cafeína em talos de chá preto em diferentes pressões e temperaturas,

desta vez com o uso de etanol como cossolvente e obtiveram resultados semelhantes. Com uma pressão fixa de 250 bar, o aumento da temperatura de 50° a 70° C favoreceu a extração de cafeína. Para o caso em que a temperatura foi fixada a 65° C, o aumento da pressão de 150 a 250 bar aumentou consideravelmente o rendimento de cafeína extraída. Por fim, Cassel et al. (2010) realizaram a extração supercrítica de erva-mate em diferentes condições de operação, variando a pressão de 120 a 200 bar e a temperatura de 313 a 343 K. Neste caso, obteve-se a maior remoção de cafeína nas condições de 150 bar/323 K.

Park et al., (2007) compararam o efeito do uso de etanol e água como cossolventes na extração supercrítica aplicada a folhas de chá verde, nas mesmas condições de pressão e temperatura (300 bar e 70°C) e com um tamanho de partícula variando de 425 a 710 µm. Observou-se que o uso de etanol favoreceu a extração, tanto em relação ao rendimento total como ao teor de cafeína presente no extrato, atingindo um aumento de 30% em ambos os casos na melhor condição para cada extração. Estudo semelhante foi realizado por Park; Im e Kim (2012), com a mesma matéria prima, e o resultado foi que, a partir da utilização do etanol como cossolvente, em concentrações de 1, 2 e 3 g/100 g de CO<sub>2</sub>, foi observado que, mantendo-se constante as condições de temperatura e pressão, o teor de cafeína extraído aumenta consideravelmente quanto maior for o teor de etanol. Neste estudo, a melhor condição de extração foi de 200 bar e 70°C, com um diâmetro de partícula menor que o estudo anterior (125 a 425 µm).

### **3.4 Modelagem Matemática**

A modelagem matemática do processo de extração supercrítica serve como ferramenta para se interpolar ou extrapolar as condições experimentais e para aplicar as informações experimentais a futuros estudos de extração supercrítica. Vários fatores devem ser levados em conta para um bom entendimento do processo de extração, entre eles a granulometria do material utilizado, tempo de extração e vazão do solvente; estes parâmetros possuem influência direta no rendimento da extração. A partir destes dados e da modelagem matemática, é possível generalizar os resultados experimentais, podendo aplicá-los para novas condições de um novo processo e/ou para outros materiais ainda não estudados. Além disso, a modelagem

se torna muito útil para escalonar estudos em escala laboratorial para piloto e industrial (Cassel et al., 2010; Reverchon, 1997; Scopel et al., 2013; Silva et al., 2015).

De acordo com Reverchon, (1997), a escolha do modelo depende da distribuição do soluto internamente no substrato sólido. As substâncias a serem extraídas podem estar livres na superfície sólida do material, adsorvidas na superfície exterior, localizadas entre os poros ou distribuídas entre as células das plantas; cada uma destas situações requer um modelo matemático adequado. Assim, três modelagens diferentes são propostas para utilização na extração supercrítica: modelos empíricos, modelos baseados em transferência de calor analogamente com o fenômeno de extração e modelos baseados no balanço de massa diferencial no leito do extrator (Reverchon and De Marco, 2006; Sovová, 2012, 1994). Há diferenças em cada processo de extração, como por exemplo, o tipo de matéria prima e/ou solvente utilizado, o tipo de produto final obtido, a geometria do vaso extrator e as condições de operação; logo, cada modelo se adequa melhor a uma determinada situação (Cassel et al., 2008).

Modelos empíricos, por exemplo, são considerados nada mais que uma simples técnica de interpolação de dados experimentais e seu uso é recomendado quando a informação sobre os mecanismos de transferência de massa e relações de equilíbrio não estão disponíveis (Reverchon, 1997).

Reverchon, (1996) apresenta outra classe de modelos matemáticos, que diz respeito ao uso de equações diferenciais deduzidas a partir da transferência de massa para as fases que constituem o leito extrator, solvente e material vegetal. Neste modelo, o óleo essencial extraível é considerado um único elemento, também desconsiderando a transferência de massa na direção axial ao longo do leito. Ainda, considera-se que a massa específica e a taxa de escoamento do solvente são constantes durante toda a extração. Assim, obtêm-se duas equações diferenciais parciais capazes de descrever a transferência de massa em ambas as fases, sólida e fluida (Sartor et al., 2011).

Por fim, tem-se o balanço de massa realizado no vaso extrator, proposto por Sovová, (1994). O solvente flui livremente com uma velocidade superficial  $U$ , através de um leito cilíndrico composto por material vegetal moído, com partículas de tamanho homogêneo entre si. Considera-se que o soluto de interesse se encontra tanto na superfície do material como no interior da parede celular, e este só é liberado pelo processo de moagem. Logo, a massa inicial de soluto contida na fase sólida é a soma destas duas massas, da superfície e da estrutura interna. (Silva et al., 2015).

Independente do modelo escolhido, o objetivo é sempre o mesmo: representar o fenômeno ocorrido através de hipóteses construídas com a finalidade de se aproximar o máximo possível do fenômeno real associado ao processo de extração. Isto é mais facilmente alcançado quanto maior for o número de parâmetros do modelo, porém a utilização de muitos parâmetros torna mais complexa a modelagem matemática, o que nem sempre é atraente do ponto de vista industrial, onde geralmente necessita-se de respostas rápidas e de fácil obtenção, mesmo que com menor grau de precisão. Apesar disto, o conhecimento necessário para melhor compreender e controlar os processos de extração supercrítica continua sendo buscado em meio ao campo científico, com o objetivo de tornar cada vez mais eficientes os processos em que esta tecnologia é empregada (Scopel, 2013).

### **3.5 Propriedades Medicinais da Erva-mate**

Entre os efeitos positivos das infusões de erva-mate citam-se as atividades estimulante, diurética, antioxidante e hipocolesterolêmica, além de ser benéfico ao sistema cardiovascular e atuar contra a obesidade (Cardozo Junior and Morand, 2016; Colpo et al., 2016; Heck and de Mejia, 2007; Thea et al., 2016). Porém, Heck; de Mejia, (2007) também relatam estudos que relacionam o consumo da infusão da erva-mate a diferentes tipos de câncer, incluindo oral, na laringe, faringe, esôfago e bexiga.

O câncer esofágico (EC) é o oitavo tipo de câncer mais comum e o sexto tipo que mais causa mortes em todo o mundo. O índice de sobrevivência de pacientes é extremamente baixo, e a descoberta precoce da doença é essencial para obtenção

de melhores resultados (Arnal et al., 2015). Há duas principais formas de ocorrência de EC: adenocarcinoma (AC) e carcinoma espino-celular (CEC). Estudos indicam que somente 15 a 25% dos pacientes sobrevivem os primeiros 5 anos após o diagnóstico, sendo que em média o tempo de sobrevivência não passa de 1 ano (Rubenstein and Shaheen, 2015).

Os principais fatores de risco para o EC vão desde gênero e raça até a alguns hábitos adquiridos, como o hábito de fumar e a ingestão de bebidas alcoólicas. Além disso, alguns nutrientes também vêm sendo extensivamente estudados quanto ao seu relacionamento à ocorrência de EC, como o chá, café e o mate. Destes, apenas o mate possui resultados concretos relacionando-o ao EC, diretamente ligado a alta temperatura em que o chimarrão é consumido (Arnal et al., 2015). Um estudo de revisão publicado por Islami et al., (2009) analisou 59 estudos publicados na literatura e constatou que a maior parte das publicações relacionava um risco maior ao EC com a alta temperatura em que o chá de mate é consumido.

Somente no ano de 2012, 52 mil casos de AC foram registrados no mundo, comparado com aproximadamente 400 mil casos de CEC. A maior incidência de casos de EC se concentra em países industrializados onde a população é predominantemente europeia (Arnold et al., 2015). No Brasil, aproximadamente 11 mil casos de EC foram detectados, a maioria deles na região sul. Este fato deve-se principalmente ao alto consumo de chimarrão nesta região (Ajani et al., 2011; INCA, 2016).



## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

### 4.1 Artigo 1: Evaluation of an Infusion obtained from Decaffeinated Yerba Mate Processed by Supercritical Fluid Extraction on the Cell Viability of Human Esophageal Cancer

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de folhas de erva-mate descafeinadas por extração com fluido supercrítico e avaliar os efeitos das infusões de erva-mate tradicional e de erva-mate descafeinada na viabilidade celular de diferentes linhagens de câncer esofágico. Para maximizar a extração de cafeína, propriedades físicas do material, como teor de umidade, granulometria e densidade foram analisadas, assim como as condições de operação da extração, como pressão e temperatura. Ainda, etanol foi utilizado como cossolvente em alguns experimentos devido a sua capacidade de alterar a polaridade do solvente CO<sub>2</sub>. Dezesesseis experimentos foram conduzidos e uma concentração final de cafeína de 0,0355% (97% de remoção) foi obtida nas condições operacionais de 300 bar, 60°C, vazão de solvente de 1200 g/h, diâmetro de partícula de 0,428 e concentração de etanol de 5,5% m/v. Observou-se que a cafeína foi mais facilmente extraída em condições de alta temperatura e pressão, pequeno diâmetro de partícula e com o uso de etanol como cossolvente. O efeito da infusão tradicional e descafeinada foi avaliado quanto a sua viabilidade celular nas linhagens OE33, OE21 e KYSE450. Concluiu-se que os extratos de erva-mate diminuíram a viabilidade celular no câncer esofágico e este efeito foi independente da concentração de cafeína na infusão.

Palavras chave: cafeína, extração com fluido supercrítico, *Ilex paraguariensis*, infusão, câncer esofágico.

Artigo enviado para a Food and Bioproducts Processing.

# Evaluation of an Infusion obtained from Decaffeinated Yerba Mate Processed by Supercritical Fluid Extraction on the Cell Viability of Human Esophageal Cancer

## ABSTRACT

*This work aimed to obtain decaffeinated yerba mate leaves by extracting them with supercritical CO<sub>2</sub> and evaluate the effects of decaffeinated and traditional mate infusions on the cell viability of human esophageal cancer. To maximize caffeine extraction, the physical properties of the plant material, moisture content, granulometry and density were analyzed and optimized, as well as the supercritical process operating conditions, such as pressure and temperature. In addition, ethanol was used as a co-solvent for some experiments due to its capability to alter the polarity of the initial solvent. Sixteen experiments were conducted, and a final caffeine concentration of 0.0355% (97% removal) was obtained for working conditions of 300 bar, 60° C, flow rate of 1200 g/h, particle size of 0.428 and ethanol concentration of 5.5% m/v. It was observed that caffeine was more easily extracted under conditions of high pressure and temperature, low particles size and with the use of ethanol along with carbon dioxide. Furthermore, the effect of traditional and decaffeinated extracts was evaluated on cell viability in different cell lines of human esophageal cancer, OE33, OE21 and KYSE450. It was concluded that the extracts of yerba mate decreased cellular viability in esophageal cancer and that this effect was independent of the caffeine infusion concentration.*

**Key words:** caffeine, supercritical fluid extraction, *Ilex paraguariensis*, infusion, esophageal cancer.

## 1. Introduction

Discovered in 1820, caffeine is one of the most consumed stimulating substances worldwide (Rivera-Oliver and Díaz-Ríos, 2014) and is part of the everyday lives of most people in different countries (Ashihara and Crozier, 2001). Caffeine is capable of stimulating the nervous, muscular and circulatory systems (Içen and Gürü, 2010); increasing mental focus; and acting against fatigue (Tello et al., 2011). Several drinks contain caffeine, including coffee, tea, infusions (such as ‘chimarrão’ and ‘tereré’), guarana and cola sodas (Mazzafera, 2012). The consumption of these caffeine-containing products is not always recommended for everyone, since they can have undesirable health effects. The most affected groups are children, pregnant women and individuals with a higher sensibility to the effects of caffeine on the nervous system. These side effects range from insomnia, anxiety, jitters and mood swings (Tello et al., 2011) to increases in blood pressure and changes in the heartbeat rate (Nawrot et al., 2003). Therefore, decaffeination of these products is extremely important from a health perspective, while it is also economically attractive since it promotes obtaining decaffeinated products as well as natural caffeine, which is frequently used in pharmaceutical industries and in the production of energy drinks (Nawrot et al., 2003; van Hilten, 2011). In addition, recent epidemiological studies

have suggested that caffeine consumption lowers the risk of some cancers (Yu et al., 2011) and has been related to the improvement of anti-tumor responses through inhibition of angiogenesis (Ohta et al., 2006).

In this study, we highlight the effects of caffeine on esophageal cancer (EC). This malignancy is the eighth most common cancer in the world (Arnal et al., 2015; Berry, 2014). There are two main subtypes of CE: adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC) (Rubenstein and Shaheen, 2015). Among the innumerable factors that were related to the development of this malignancy were some habits, such as smoking and the use of caffeine-rich coffee, teas and mate, which are among the most consumed substances in the world (Arnal et al., 2015). In 2016, Brazil was expected to have approximately 10,810 new cases of esophageal cancer, with the highest incidence in the southern region. This estimate was associated with the habit of drinking “chimarrão”. (Ajani et al., 2011; INCA, 2016).

Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) has a mass concentration of 0.5 to 2.0% caffeine (Filip et al., 1998) and ingestion of this alkaloid usually occurs in the form of an infusion of crushed leaves and branches in hot or cold water, which are beverages called chimarrão or tereré, respectively (Gerhardt, 2011). Belonging to the Aquifoliaceae family, this species grows naturally in the subtropical regions of South America and is mainly found in Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. Brazil is its largest producer (DERAL - Departamento de Economia Rural, 2014). Currently, yerba mate is no longer a product that is exclusive to South America because it is exported to the United States as well as the European and Asian continents (Cardozo Junior and Morand, 2016).

Several studies of yerba mate can be found in the literature. Most of them evaluate the chemical composition of the extracts, especially groups of compounds, such as flavonoids, saponins phenolic compounds and methylxanthines, including caffeine (Cardozo et al., 2007; Pagliosa et al., 2010; Schubert et al., 2006). However, a number of factors can alter the extract chemical composition, including the planting and harvesting season, growing site and even industrial processing that the vegetable material is subjected to before being sold (Cardozo et al., 2007; Isolabella et al., 2010; Pagliosa et al., 2010; Schubert et al., 2006). In addition to those factors, the properties of the raw material, such as the granulometry and moisture content of the plants, can also alter its chemical composition (Bastos et al., 2006; Tello et al., 2011; Vieira et al., 2010, 2008).

To decaffeinate leaves and seeds of different plant materials, three processes can be used: extraction with hot water (Brenelli, 2003; Gnoatto et al., 2007; Liang et al., 2007), extraction with organic solvents (Anesini et al., 2012; Gnoatto et al., 2007; Liang et al., 2007) and extraction with supercritical solvents (Park et al., 2007, 2012; Tello et al., 2011). In a comparison of these approaches, extraction

with supercritical solvents has the advantage of being more selective than the other approaches and avoids the loss of important compounds to the final product (Mazzafera, 2012). Supercritical extraction is based on the solvating properties of a fluid in a supercritical condition, whereas this condition can be obtained when the solvent temperature and pressure are elevated beyond its critical values, which promotes the formation of a single phase (Sharif et al., 2014). Supercritical extraction is a separation and purification method that has advantages compared to more traditional methods, such as a higher extract yield, easy separation of solute and solvent and the lack of residue production (Nascimento et al., 2016; Park et al., 2012; Taylor, 1996; Tello et al., 2011).

Along with the factors mentioned in this section, the operating conditions in which the experiment was conducted were also very important for extracting the maximum quantity of caffeine possible, including pressure, temperature and the flow rate of the solvent. Likewise, the use of cosolvents, such as water and ethanol, had a positive effect on the yield of the caffeine that was extracted. It is important to highlight that the great majority of studies about decaffeination usually have different types of teas and coffees as its main object of study (Bermejo et al., 2016; İçen and Gürü, 2010; Kim et al., 2008; Park et al., 2007, 2012; Tello et al., 2011). Extraction of caffeine from yerba mate has been discussed in the works of (Saldaña et al., 1999) and Cassel et al., (2010).

Decaffeinated yerba mate was only obtained by Saldaña et al. (1999); however the extraction process to achieve this condition took more than 7 hours. Therefore, the present study had the goal of optimizing the decaffeination process of yerba mate leaves by studying and analyzing several of the decaffeination process variables as pressure, temperature and co-solvent concentration. It is important to note that the results obtained in this study can be extending to other tea decaffeination processes. Physical properties, such as moisture content, granulometry and density, as well as the operating conditions for supercritical extraction with CO<sub>2</sub>, were all analyzed. In addition, ethanol was used as a cosolvent for some experiments. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to evaluate the caffeine content on the plant before and after the extraction process to assess how these variables affected yerba mate decaffeination. Furthermore, the effects of caffeinated and decaffeinated extract were evaluated on cell viability in different cell lines of human esophageal cancer.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Sample preparation**

Yerba mate leaves were provided by Baldo S.A and were ground and sieved for the experiments. The mean particle size of each sample was determined using 5 sieves from the Tyler mesh scale ranging from size 16/46 plus the pan, which led to 6 samples with known granulometry. A sample that was not

sieved, that is, with unknown granulometry, was also subjected to extraction, totalizing 7 samples. As for processing, the plant material used in this study did not undergo the aging process. It was passed only through the *zapecado*, drying and milling stages (Daniel, 2009; Isolabella et al., 2010).

## 2.2 Mean particle size determination

The mean particle size determination of the heterogeneous sample was conducted based on the calculation method proposed by Gomide (1983), utilizing approximately 100 g of previously ground yerba mate leaves. The granulometry was evaluated using the Tyler series sieves with mesh sizes ranging from 16/46 with 15 minutes of agitation. The mass retained on each sieve ( $\pm 0.01$  g) was measured and used in the calculation of the mean particle size according to Equations 1 and 2.

$$m_p = \frac{1}{\sum_i \frac{x_i}{m_{p_i}}} \quad (1)$$

$$x_i = \frac{f_m - m_s}{\sum(f_m - m_s)} \quad (2)$$

where  $m_p$  is the mean particle size,  $f_m$  is the final mass retained on each set (sieve + mass of yerba mate retained),  $m_s$  is the mass of each sieve,  $m_{p_i}$  is the mean particle size of each sieve and  $x_i$  is the fraction of yerba mate retained in each sieve.

## 2.3 Moisture content determination

The moisture content of each sample was determined by the principle of thermogravimetry (Borges et al., 2005) and the apparatus that was used was the Moisture Analyzer HB43 (Mettler Toledo) with approximately 0.65 g of each of the seven samples of yerba mate that were used. The moisture was determined by measuring the variation of the initial and final masses of plant material put in the equipment after all of the water present in the vegetable material was evaporated by heat, which is provided by a halogen lamp. The experiments were performed in duplicate.

## 2.4 Experimental density determination

The volume of each sample was determined with the gas-pycnometry technique (Oppenheimer et al., 1997; Ruggieri et al., 2009), on the Quantachrome Multipycnometer. The gas that was used was nitrogen (Air Products, 99%). Equation 3 was used to calculate the volume of each sample:

$$V_s = V_c - V_r \left( \frac{P_1}{P_2} - 1 \right) \quad (3)$$

where  $V_s$  is the solid volume,  $V_c$  is the calibrated cell volume,  $V_r$  is the reference volume of the expansion chamber,  $P_1$  is the pressure on the initial expansion chamber ( $1.2 \pm 0.001$  bar) and  $P_2$  ( $\pm 0.001$  bar) is the pressure on the final pressure on the expansion chamber.

To determine the experimental density of each sample,  $V_s$  was introduced in Equation 4.

$$\rho_s = \frac{m}{V_s} \quad (4)$$

where  $m$  is the mass of yerba mate and  $\rho_s$  is the experimental density. These experiments were performed in quadruplicate.

## 2.5 Supercritical extraction

All experiments for extraction of nonvolatile compounds of yerba mate were conducted on a supercritical extraction pilot unit (Scopel et al., 2013; Vargas et al., 2013). Initially, the operating conditions were 170 bar and 40° C. These lower conditions were set in order to evaluate only the effect of particle size in the caffeine removal and to determine the best size. The flow rate of CO<sub>2</sub> was 850 g/h and 50 g of plant material were used for each extraction with different particle sizes of yerba mate for each extraction. The extraction mass was weighed every 10 minutes, and the process continued until the mass of extract ( $\pm 0.001$  g) remained constant, which indicated the end of the extraction. This method was based on the study performed by Cassel et al., (2010), which had the conditions that led to the highest yield of yerba mate extracts. After analyzing the yield of extract that was obtained and caffeine removal, new plant material was once again ground and sieved and 9 more extractions were performed. These experiments were conducted under conditions that led to both the highest particle size and caffeine removal. The new working conditions were 300 bar and 60° C with a flow rate of 1200 g/h. These conditions were the maximum settings possible on the equipment that was used, and the equipment was set to maximize caffeine extraction (Içen and Gürü, 2010; Kim et al., 2008; Park et al., 2007, 2012). Eight grams of plant material were used on all but the last extraction ( $m = 36$ g) with a fixed time of two hours. The difference in the mass of the last extraction was to analyze the effects of the mass of plant/mass on the CO<sub>2</sub> ratio under the best working conditions. Three of the experiments were conducted with ethanol as a cosolvent, while in another three experiments the plant was soaked with water prior to the extraction to evaluate the moisture content effect. Best conditions were repeated to confirm the results that were obtained. The experiments are outlined in the Table presented below (Table 1).

Bed porosity ( $\epsilon$ ) was determined by the relationship between the apparent density of the bed ( $\rho_{ap}$ ) and the experimental density of the plant, which is shown in Equations 5 and 6.

$$\rho_{ap} = \frac{m}{A_{cs}H} \quad (5)$$

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_s} \quad (6)$$

where  $A_{cs}$  is the cross section area of the extractor vessel and  $H$  is the height of the bed.

## 2.6 Caffeine analysis

The caffeine concentration in the yerba mate leaves before and after the extraction process was determined by HPLC (Filip et al., 1998). Chromatographic analyses were conducted on an Agilent system, model 1200 with a UV detector. Compound separation was performed using a gradient mixture method with A containing MiliQ water/Acetic Acid (98:2 v/v) and B containing Methanol/Acetic Acid (98:2 v/v). The gradient went from 17% B to 20% B in 10 minutes with 20% isocratic in 5 minutes, 20% B to 23% B in 10 minutes and 23% B to 100% B in 5 minutes. The flow was 1 mL/min. The column was a C18 (4.6 x 250 mm x 5  $\mu$ m) and the wave-length,  $\lambda$ , was 273 nm (Filip et al., 1998).

To validate the quantitative analysis, 10 mg of caffeine (99%, Sigma-Aldrich) were diluted in a 100 mL of MiliQ water. Different dilutions of this solution, with concentrations ranging from 0.002 to 0.2 mg/mL, were made and analyzed on the chromatograph to construct a calibration curve for the caffeine, which formed the relationship between caffeine concentration and the area of each peak on the chromatogram (Equation 7). This curve was adjusted by linear regression and its determination coefficient ( $R^2$ ) was 0.9998.

$$y = 6.10^{-5}x + 0.0003 \quad (7)$$

where  $y$  is the caffeine concentration and  $x$  the area of each peak.

Table 1 – Experiment planning for the supercritical extraction process.

Sample	Pressure (bar)	Temperature (°C)	Mass (g)	Particle size	Ethanol concentration (m/v)	Water added (ml)
1	170	40	50	1.500	-	-
2	170	40	50	0.855	-	-
3	170	40	50	0.605	-	-
4	170	40	50	0.428	-	-
5	170	40	50	0.302	-	-
6	170	40	50	0.125	-	-
7*	170	40	50	0.404	-	-
8	300	60	8	0.428	-	-
9	300	60	8	0.428	-	1.5
10	300	60	8	0.428	-	3.5
11	300	60	8	0.428	-	5.5
12	300	60	8	0.428	2.5	-
13	300	60	8	0.428	4.0	-
14	300	60	8	0.428	5.5	-
15	300	60	8	0.428	5.5	-
16	300	60	36	0.428	5.5	-

\*Heterogeneous sample.

## 2.7 Determination of caffeine concentration in the yerba mate leaves

The procedure for determining the concentration of caffeine in the yerba mate leaves started with an aqueous decoction (Filip et al., 1998) of the plant material. Yerba mate leaves were ground until they became a very fine powder with a particle size smaller than 0.3025 mm. Then, 100 mL of MiliQ water were added to 5 g of this powder and the mixture was boiled for 20 minutes. After it cooled down, the mixture was filtered and analyzed by chromatography, which followed the previously presented method. This procedure was performed both for the yerba mate before and after the extraction process.

## 2.8 Cell viability

The cell lines OE33, which represented adenocarcinoma, OE21 (both donated by Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto - INCA) and KYSE450 (obtained commercially from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), which represented squamous cell carcinoma, were cultured in



10% RPMI medium and maintained under optimum culture conditions. The cells were treated for 24 h with caffeine (5, 10, 25, 50, 75, 100 and 150  $\mu\text{M}$ ) or with caffeinated (ECaf) or decaffeinated extracts (EDCaf), at the following concentrations, 0.01, 0.25, 0.5, 0.75, 1 and 2 mg / ml. To evaluate the cell viability, the experiments were performed as described previously by Gehring et al., (2012). OE33, OE21 and KYSE450 cells were seeded at a density of  $6.5 \times 10^3$  per well on a 96-well plate with 100  $\mu\text{l}$  of culture medium. After the treatment, the cells were washed with PBS, and 100  $\mu\text{l}$  of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide solution (MTT) (MTT 5 mg/ml in PBS in 90% DMEM supplemented with FBS 10%) were added to the cells and incubated for 3 h. The formazan crystals were dissolved with 100  $\mu\text{l}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was quantified in 96-well plates (Spectra Max M2e, Molecular Devices) at 540 nm. This absorbance was linearly proportional to the number of live cells with active mitochondria. The cell viability was calculated using the equation  $\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs} \times 100) / \text{Abs}_{\text{control}}$ , where Abs is the absorbance of cells treated with different formulations and  $\text{Abs}_{\text{control}}$  is the absorbance of control cells (incubated with cell culture medium only).

## 2.9 Statistical analysis

The statistical test that was used was One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey post-hoc test. The results are presented as the standard error of the mean. The GraphPad Prism 5.0® program was used to generate graphs.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Properties of yerba mate leaves

The data obtained for all the studied properties of yerba mate leaves, mean particle size, moisture content and experimental density, are shown in Table 2 for samples 1-7. Samples 1-6 have homogeneous granulometry and sample 7 is the heterogeneous sample. In order to minimize experimental errors, as soon as the moisture content was determined the plant was immediately submitted to the supercritical extraction process.

By analyzing the results for Samples 1-6, it is noticeable how the alterations in the mean particle diameter (MPD) caused changes in both the values for moisture content as well as the values for experimental density. Moisture content for Sample 6, the sample with the lowest MPD, was almost 20% higher than Sample 1. This result indicated that the grinding process was able to sever the internal membrane that protects the water in the plant interior, which facilitated water removal. As for the experimental density values, this increase was likely prompted by the rupture of the plant's internal structures, which reduced the size of its pores and promoted better insertion of  $\text{N}_2$  in empty spaces. These results agree with the results of Cardoso, Oliveira, Santana Junior, and Ataíde, (2013) as well as

Lisowski and Tochowski, (2011). As for the heterogeneous sample, despite having a similar MPD to Sample 4, this sample had the lowest values for both moisture content and experimental density. This result was attributed to the non-homogeneity of the sample particles.

Table 2. Yerba mate leaf properties: mean particle diameter, density and moisture content.

Sample	MPD (mm)	Density (g cm <sup>-3</sup> )	Moisture content (%)
1	1.500	1.278 ± 0.0028	4.260 ± 0.0018
2	0.855	1.290 ± 0.0025	4.410 ± 0.0017
3	0.605	1.301 ± 0.0022	4.800 ± 0.0016
4	0.428	1.314 ± 0.0015	4.600 ± 0.0004
5	0.302	1.319 ± 0.0022	4.610 ± 0.0006
6	0.125	1.365 ± 0.0025	4.830 ± 0.0021
Heterogeneous	0.404	1.264 ± 0.0040	4.160 ± 0.0023

MPD – Mean Particle diameter.

### 3.2 Supercritical Extraction

The results for bed porosity, extract yield and caffeine removal on yerba mate leaves post-supercritical extraction are presented in Table 3 for the first 7 experiments. These experiments were conducted at 170 bar and 40° C. Before extraction, the leaves had a caffeine concentration of 1.260% g<sub>caffeine</sub>/g<sub>plant</sub> (Figure 1).

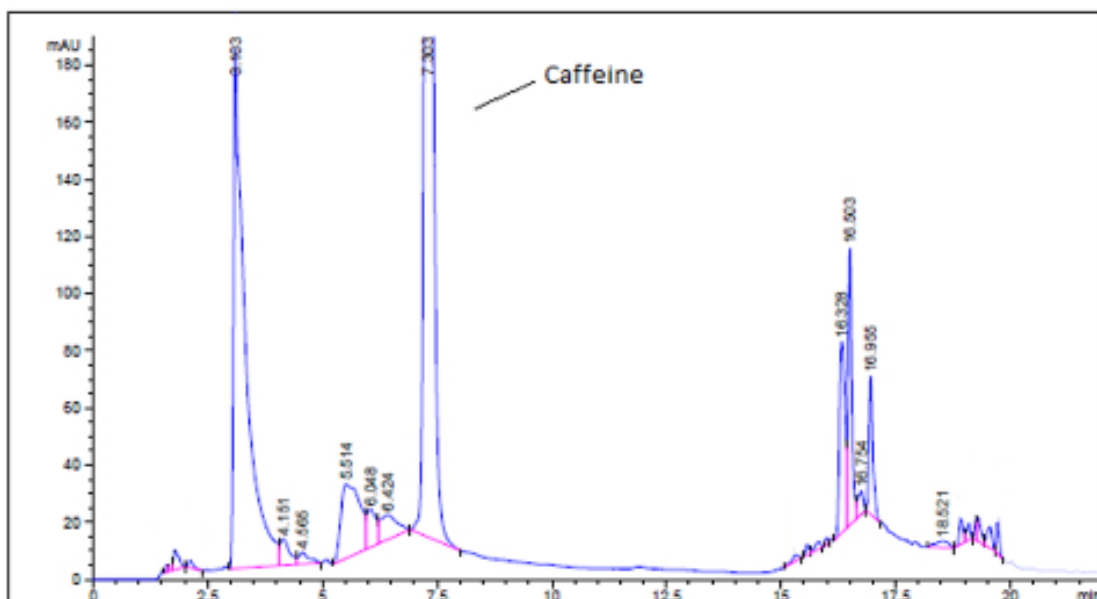


Figure 1. Caffeine analysis by HPLC for the plant before the supercritical extraction process.

Table 3. Results of the extraction process with supercritical CO<sub>2</sub> for the samples of yerba mate. P = 170 bar, T = 40° C.

Sample	Porosity (%)	Yield % $g_{\text{extract}}/g_{\text{plant}}$	Caffeine removal (%)	Final caffeine concentration (%)
1	0.810	1.210	0.32	1.256
2	0.790	1.290	0.23	1.257
3	0.770	1.200	15.79	1.061
4	0.730	1.430	25.06	0.944
5	0.690	1.650	24.35	0.953
6	0.600	2.550	25.11	0.943
Heterogeneous	0.780	1.290	0.27	1.256

Table 3 shows the extract yield behavior. The values are similar to the samples with MPD  $\geq 0.6$  mm, i.e., samples 1-3. For the samples with MPD  $\leq 0.4$  mm, extract yield behavior was inversely proportional to MPD, i.e., the smaller the plant diameter, the greater the extract yield. The highest value that was obtained was 2.55%  $g_{\text{extract}}/g_{\text{plant}}$  for the lowest MPD (MPD = 0.125 mm). This behavior can be explained by two factors: first, the rupture of the plant internal structures, which facilitated solvent access to the extract, and second, the reduction of preferential flow paths for the solvent due to a higher bed compaction (i.e., lesser porosity). The extraction results obtained for the heterogeneous sample behaved similarly to samples 1-3 and had similar moisture content and experimental density (Table 1). This behavior was related to bed porosity.

The effects of particle diameter were also observed in relation to caffeine selectivity on the extract that was obtained. Caffeine removal was practically null for Samples 1 and 2 (MPD  $\geq 0.8$  mm), while samples with a MPD  $\leq 0.6$  mm showed a sudden change in this behavior. Maximum caffeine removal was obtained for Sample 4. This removal was directly related to the rupture of internal structures in the leaves that protected the caffeine from being removed. However, with the reduction of particle size, there was an increase in access by supercritical solvents to the other compounds, which decreased the caffeine selectivity of the extracts (sample 6). Again, the heterogeneous sample had a similar behavior to samples 1-3.

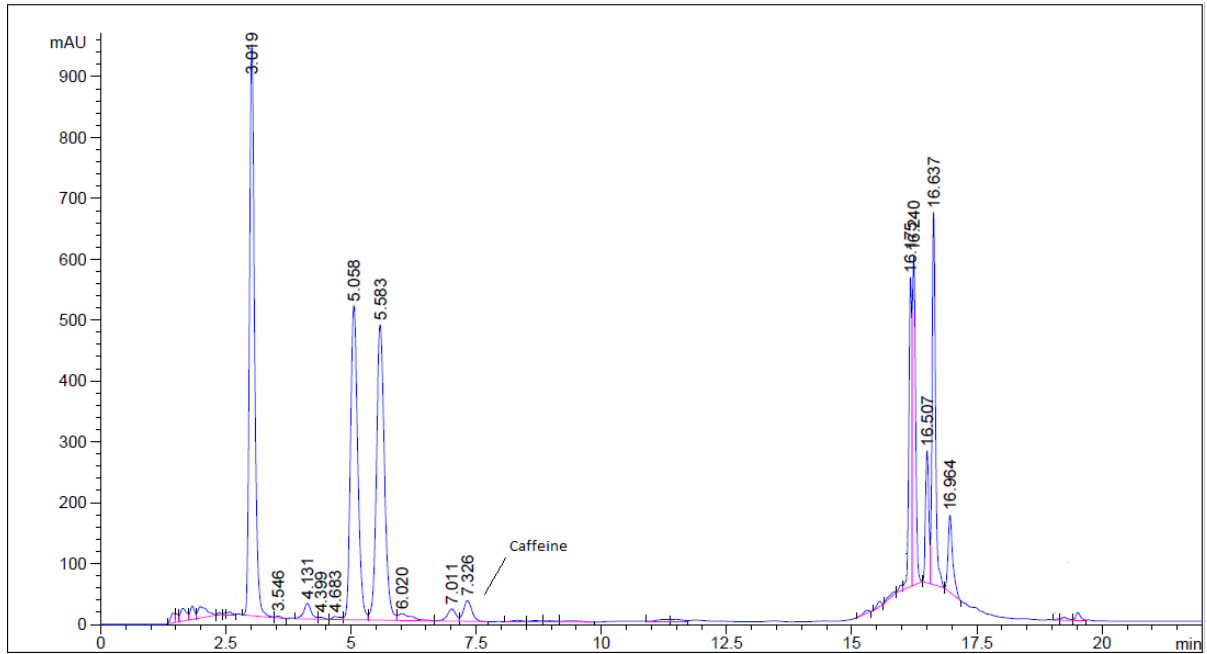
Compared to samples 5 and 6, sample 4 had a similar value for caffeine removal and a higher particle size, which was why this sample was selected for the second stage of extractions. At this stage, the working conditions were 300 bar and 60° C with a flow rate of 1200 g/h. All experiments had a fixed

time of 2 hours and use 8 g of plant material, with the exception of sample 16, which had a mass of 36 g. These results are presented in Table 4.

Table 4 – Results of the extraction process with supercritical CO<sub>2</sub> of the samples of yerba. P = 300 bar, T = 60° C.

Sample	Ethanol concentration (m/v)	Water added (ml)	Yield % $g_{\text{extract}}/g_{\text{plant}}$	Caffeine removal (%)	Final caffeine concentration (%)
8	-	-	2.20	37.50	0.788
9	-	1.5	2.15	53.46	0.587
10	-	3.5	3.48	68.40	0.398
11	-	5.5	3.08	70.21	0.375
12	2.5	-	3.26	72.28	0.349
13	4.0	-	6.48	93.51	0.081
14	5.5	-	5.72	97.18	0.035
15	5.5	-	5.71	95.14	0.061
16	5.5	-	4.76	95.61	0.058

By comparing Tables 3 and 4, it is clearly noticeable that all of the studied parameters were important for caffeine extraction using a supercritical solvent. By increasing only temperature and pressure, caffeine removal was approximately 1.2 higher in Sample 8 than Sample 4. Soaking the plant before extraction led to a maximum caffeine removal of 70.21%, while adding ethanol as a cosolvent had a maximum removal of 97.18%. These results meant that Samples 13-16 could all be considered decaffeinated samples because they all had caffeine content lower than 0.10%. Two main effects caused these improvements: caffeine has an increased solubility in water at higher temperatures (Sfredo, 2002), which favored the extraction of caffeine, and by using ethanol as a cosolvent, the polarity of the supercritical solvent was altered, which favored caffeine removal. Ethanol also has a higher solubility in CO<sub>2</sub> compared to water (B Gupta and Shim, 2007; Park et al., 2007), which explains why ethanol was used as a cosolvent and water was added to the plant before extraction and not used as a cosolvent. Samples 14-16 show the experiment was reproducible even if the mass of plant material was 4.5 times higher than the original mass (sample 16). In addition, it was noticeable how the yield of Samples 11 and 14-15 were slightly lower than previous samples but had a higher caffeine content removal. This result shows that selectivity of both water and ethanol towards caffeine remained high for all of the experiments. Figure 2 shows the chromatogram for Sample 14 after the extraction process.



**Figure 2.** Caffeine analysis by HPLC for the plant after the supercritical extraction process.

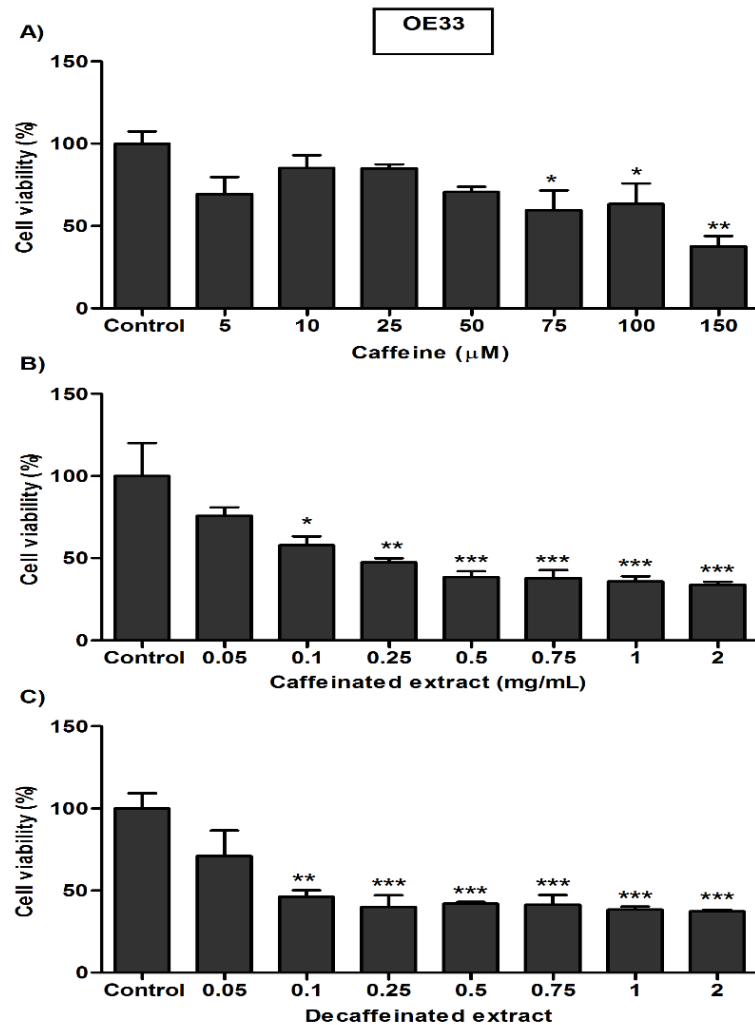
### 3.3 Effects of the extracts on cell viability

To investigate the action of caffeine and the effects of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) extracts, the esophageal cell lines OE33, OE21 and KYSE450 were treated with caffeine, caffeinated extracts (ECaf) or decaffeinated extracts (EDCaf), and cell viability was evaluated. We observed that 75  $\mu\text{M}$  caffeine exerted a significant decrease in the viability of the OE33 cells compared with the control, and the same occurred after treatment with ECaf at 0.05 mg / mL and with EDCaf at 0.1 mg / mL (Figure 3).

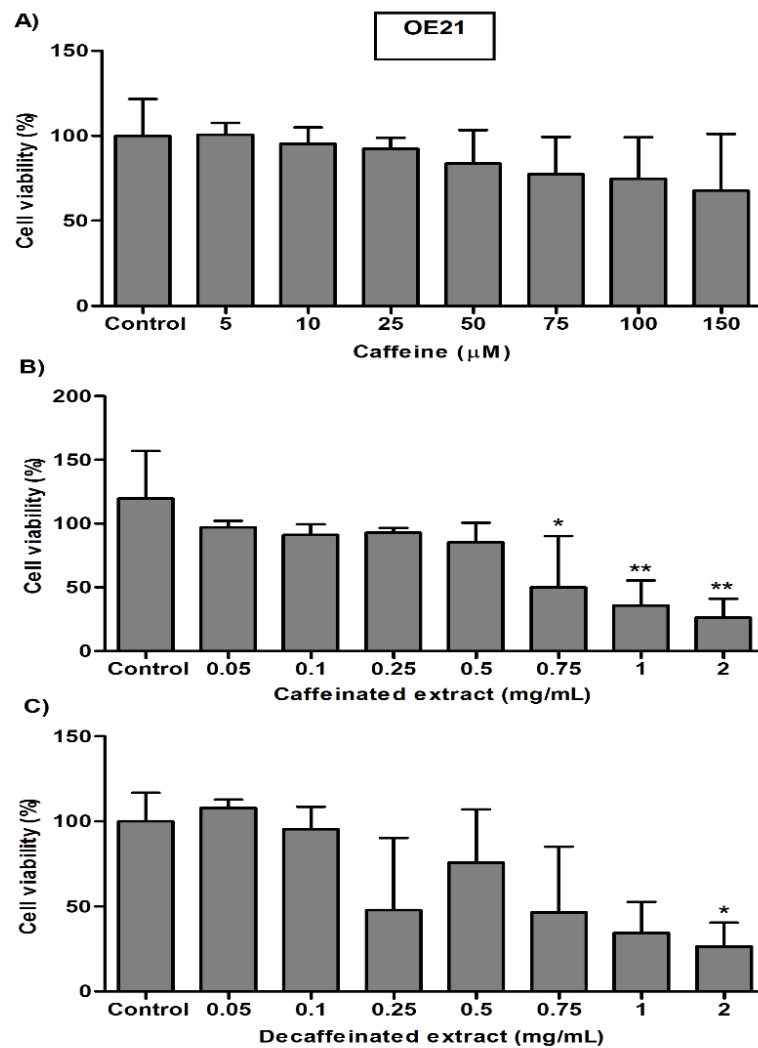
For the OE21 strain, the results showed that as the caffeine increased, the cell viability had a tendency to decrease. In addition, both mate extracts led to a reduction in cell viability at the highest concentrations (0.75, 1 and 2 mg / mL) (Figure 4). However, for the KYSE450 lineage, treatment with caffeine had no effects on cell viability, whereas ECaf led to a significant decrease at a concentration of 0.25 mg / mL, and similar results were obtained with EDCaf at 0.1 mg / mL (Figure 5).

The set of results presented for these experiments showed that the cell death observed in both types of esophageal cancer cell lines was not related to caffeine. Yerba mate contains high concentrations of flavonoids and chlorogenic acids among other substances, such as alkaloids, phenolic compounds, and mineral, as well as glycerides and lipids (Heck and de Mejia, 2007). Other studies have demonstrated that dietary intake of total flavonoids, anthocyanidins, flavanones, and flavones was associated with a decreased of esophageal cancer risk, which correlates with our data (Cui et al., 2016). Additionally,

diets high in flavonoids may improve survival for esophageal and gastric cancer (Petrick et al., 2015). Furthermore, a study in a Swedish population showed that a dietary pattern characterized by the intake of lignans, quercetin and resveratrol may have a protective role in the development of esophageal cancer (Lin et al., 2014).



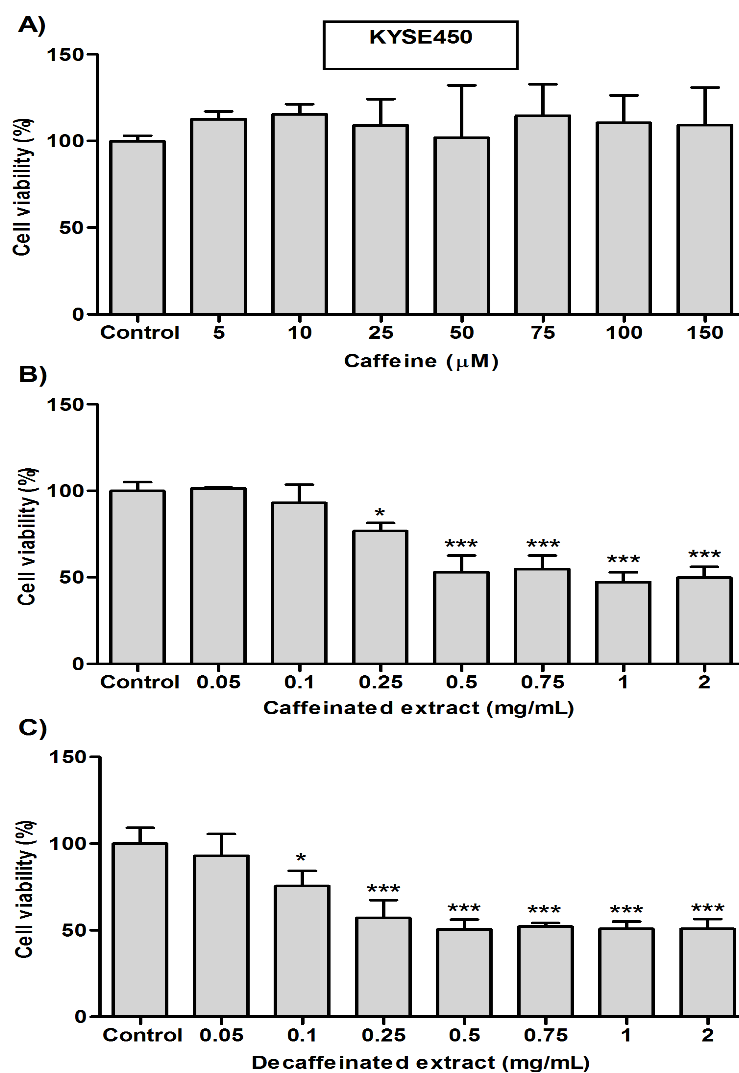
**Figure 3.** OE33 esophageal cancer cell line – OE33 is a cell line that represents esophageal adenocarcinoma. The cell viability was evaluated by an MTT assay as described in the Material and Methods section using different treatments: A) Effects of caffeine B) Effects of caffeinated extract and C) effects of decaffeinated extract. The data are shown as percentages relative to the control. The values represent the mean  $\pm$  SE from three independent experiments conducted in quadruplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences compared to the control group.



**Figure 4.** OE21 esophageal cancer cell line – OE21 is a cell line that represents esophageal squamous cell carcinoma. The cell viability was evaluated by an MTT assay, as described in the Material and Methods section using different treatments: A) Effects of caffeine B) Effects of caffeinated extract and C) effects of decaffeinated extract. The data are shown as percentages relative to the control. The values represent the mean  $\pm$  SE from three independent experiments conducted in quadruplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  indicate there were significant differences compared to the control group.

#### 4. Conclusion

The physical properties of yerba mate, density, moisture content and granulometry as well as the operating conditions for supercritical extraction, including temperature, pressure, and flow rate of the solvent and use of ethanol as a cosolvent, all had a great impact on the yield of extract that was obtained and on the quantity of caffeine removed from the plant material. The occurrence of smaller particle sizes increased the solvent accessibility to the extract, which consequently increased the extraction yield and caffeine removal. At the same time, however, the selectivity towards caffeine



**Figure 5.** KYSE450 esophageal cancer cell line – KYSE450 is a cell line that represents esophageal squamous cell carcinoma. The cell viability was evaluated by an MTT assay as described in Material and Methods section using different treatments: A) Effects of caffeine B) Effects of caffeinated extract and C) effects of decaffeinated extract. The data are shown as percentages relative to the control. The values represent mean  $\pm$  SE from three independent experiments conducted in quadruplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  indicate significant differences compared to the control group.

reached its peak and then was reduced, as seen in the extraction results for samples 5 and 6. The opposite behavior was observed for samples 10-11 and samples 13-15 for moisture content and the use of ethanol as a cosolvent, respectively. For these samples, the selectivity towards caffeine remained higher than other compounds present in the leaves. The effects of temperature and pressure were also noticeable, and increases in those conditions increased caffeine removal by 1.4 times.



The use of ethanol as a cosolvent presented the best results, followed by the use of water to alter the moisture content of the plant material. All of the results demonstrate how important it is to optimize the working conditions as well as how important it is to verify the properties of the material prior to the supercritical extraction process. By studying and selecting the best properties, caffeine removal went from 0.2% to 97%, a result that could have great impact on the natural caffeine market, not only with yerba mate but also with all other plants that possess caffeine in its internal structure.

As for the results observed in the cell viability of esophageal cancer, we suggest that the yerba mate extracts decreased cellular viability in EC and this effect was independent of the caffeine composition.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### References

- Ajani, J.A., Barthel, J.S., Bentrem, D.J., D'Amico, T.A., Das, P., Denlinger, C.S., Fuchs, C.S., Gerdes, H., Glasgow, R.E., Hayman, J.A., Hofstetter, W.L., Ilson, D.H., Keswani, R.N., Kleinberg, L.R., Korn, W.M., Lockhart, A.C., Mulcahy, M.F., Orringer, M.B., Osarogiagbon, R.U., Posey, J.A., Sasson, A.R., Scott, W.J., Shibata, S., Strong, V.E.M., Varghese, T.K., Warren, G., Washington, M.K., Willett, C., Wright, C.D., National Comprehensive Cancer Network, 2011. Esophageal and esophagogastric junction cancers. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 9, 830–87.
- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., Filip, R., 2012. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 299–304. doi:10.1016/j.lwt.2011.06.015
- Arnal, M.J.D., Arenas, Á.F., Arbeloa, Á.L., 2015. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J. Gastroenterol.* 21, 7933–43. doi:10.3748/wjg.v21.i26.7933
- Ashihara, H., Crozier, A., 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* 6, 407–413. doi:10.1016/S1360-1385(01)02055-6
- B Gupta, R., Shim, J.-J., 2007. *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Bastos, D.H.M., Fornari, A.C., Queiroz, Y.S., Torres, E.A.F.S., 2006. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 49, 399–404. doi:10.1590/S1516-89132006000400007
- Bermejo, D.V., Ibáñez, E., Reglero, G., Fornari, T., 2016. Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from green tea. *J. Supercrit. Fluids* 107, 507–512. doi:10.1016/j.supflu.2015.07.008
- Berry, M.F., 2014. Esophageal cancer: staging system and guidelines for staging and treatment. *J. Thorac. Dis.* 6 Suppl 3, S289-97. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.11
- Borges, D.B., Farias, M.R., Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., 2005. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. e *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 229–236. doi:10.1590/S0102-695X2005000300013
- Brenelli, E., 2003. A extração de cafeína em bebidas estimulantes-uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Quim. Nova* 26, 136–138. doi:10.1590/S0100-40422003000100023
- Cardoso, C.R., Oliveira, T.J.P., Santana Junior, J.A., Ataíde, C.H., 2013. Physical characterization of sweet sorghum bagasse, tobacco residue, soy hull and fiber sorghum bagasse particles: Density, particle size and shape distributions. *Powder Technol.* 245, 105–114. doi:10.1016/j.powtec.2013.04.029
- Cardozo, E.L., Ferrarese-Filho, O., Filho, L.C., Ferrarese, M.D.L.L., Donaduzzi, C.M., Sturion, J.A., 2007. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *J. Food Compos. Anal.* 20, 553–558. doi:10.1016/j.jfca.2007.04.007

- Cardozo Junior, E.L., Morand, C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *J. Funct. Foods* 21, 440–454. doi:10.1016/j.jff.2015.12.010
- Cassel, E., Vargas, R.M.F., Brun, G.W., Almeida, D.E., Cogoi, L., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *J. Food Eng.* 100, 656–661. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015
- Cui, L., Liu, X., Tian, Y., Xie, C., Li, Q., Cui, H., Sun, C., 2016. Flavonoids, Flavonoid Subclasses, and Esophageal Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *Nutrients* 8, 350. doi:10.3390/nu8060350
- Daniel, O., 2009. Erva-mate: Sistema de produção e processamento industrial. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- DERAL - Departamento de Economia Rural, 2014. Produtos Florestais - Erva-mate 9.
- Filip, R., Lopez, P., Coussio, J., Ferraro, G., 1998. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. *Phyther. Res.* 12, 129–131. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<129::AID-PTR191>3.0.CO;2-1
- Gehring, M.P., Pereira, T.C.B., Zanin, R.F., Borges, M.C., Filho, A.B., Battastini, A.M.O., Bogo, M.R., Lenz, G., Campos, M.M., Morrone, F.B., 2012. P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line. *Purinergic Signal.* 8, 729–739. doi:10.1007/s11302-012-9319-2
- Gerhardt, M., 2011. Colonos ervateiros: história ambiental e imigração no Rio Grande do Sul. *Esboços - Rev. do Programa Pós-Graduação em História da UFSC* 18, 73–95. doi:10.5007/2175-7976.2011v18n25p73
- Gnoatto, S.C.B., Bassani, V.L., Coelho, G.C., Schenkel, E.P., 2007. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Quim. Nova* 30, 304–307. doi:10.1590/S0100-40422007000200012
- Gomide, R., 1983. Operações Unitárias. Edição do Autor, São Paulo.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, 138–151. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
- Içen, H., Gürü, M., 2010. Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. *J. Supercrit. Fluids* 55, 156–160. doi:10.1016/j.supflu.2010.07.009
- INCA, 2016. estimativa-2016-v11 [WWW Document]. URL <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
- Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem.* 122, 695–699. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.039
- Kim, W.-J., Kim, J.-D., Kim, J., Oh, S.-G., Lee, Y.-W., 2008. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J. Food Eng.* 89, 303–309. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.05.018
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., Lu, J., Xu, H., Wang, H., 2007. Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment. *Food Chem.* 101, 1451–1456. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.054
- Lin, Y., Yngve, A., Lagergren, J., Lu, Y., 2014. A dietary pattern rich in lignans, quercetin and resveratrol decreases the risk of oesophageal cancer. *Br. J. Nutr.* 112, 2002–2009. doi:10.1017/S0007114514003055
- Lisowski, A., Tochowski, A.S.W.I.E., 2011. Density and porosity of the cut and ground material of energy plants. *Agric. For. Eng.* 58, 21–28.
- Mazzafera, P., 2012. Which is the by-product: caffeine or decaf coffee? *Food Energy Secur.* 1, 70–75. doi:10.1002/fes3.4
- Nascimento, A.D.P. do, Soares, L.A.L., Stragevitch, L., Danielski, L., 2016. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. *J. Supercrit. Fluids* 111, 1–7. doi:10.1016/j.supflu.2016.01.013
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Addit. Contam.* 20, 1–30. doi:10.1080/0265203021000007840
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S.J., Ronchese, F., Lukashov, D., Wong, M.K.K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., Chen, J.-F., Jackson, E.K., Apasov, S., Abrams, S., Sitkovsky, M., 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13132–7. doi:10.1073/pnas.0605251103
- Oppenheimer, J.R., Martin, A.G., Walker, L.P., 1997. Measurements of air-filled porosity in unsaturated organic matrices using a pycnometer. *Bioresour. Technol.* 59, 241–247.
- Pagliosa, C.M., de Simas, K.N., Amboni, R.D.M.C., Murakami, A.N.N., Petkowicz, C.L.O., Medeiros, J. de D., Rodrigues, A.C., Amante, E.R., 2010. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ind. Crops Prod.* 32, 428–433. doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.010
- Park, H., Lee, H., Shin, M., Lee, K., Lee, H., Kim, Y., Kim, K., Kim, K., 2007. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 105, 1011–1017. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.064

- Park, H.S., Im, N.G., Kim, K.H., 2012. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 73–78. doi:10.1016/j.lwt.2011.07.023
- Petrick, J.L., Steck, S.E., Bradshaw, P.T., Trivers, K.F., Abrahamson, P.E., Engel, L.S., He, K., Chow, W.-H., Mayne, S.T., Risch, H.A., Vaughan, T.L., Gammon, M.D., 2015. Dietary intake of flavonoids and oesophageal and gastric cancer: incidence and survival in the United States of America (USA). *Br. J. Cancer* 112, 1291–300. doi:10.1038/bjc.2015.25
- Rivera-Oliver, M., Díaz-Ríos, M., 2014. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. *Life Sci.* 101, 1–9. doi:10.1016/j.lfs.2014.01.083
- Rubenstein, J.H., Shaheen, N.J., 2015. Epidemiology, Diagnosis, and Management of Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 149, 302–317.e1. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.053
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Bioresource Technology Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: A review and a correlation analysis. *Bioresour. Technol.* 100, 2655–2666. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.049
- Saldaña, M.D., Mohamed, R.S., Baer, M.G., Mazzafera, P., 1999. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3804–8. doi:10.1021/jf981369z
- Schubert, A., Zanin, F., Pereira, D., Athayde, M., 2006. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.(erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova* 29, 1233–1236.
- Scopel, R.S., Neto, R.G., Falcão, M.A., Cassel, E., Vargas, R.M.F., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of *Schinus molle* L with Co-Solvents: Mathematical Modeling and Antimicrobial Applications. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56, 513–519. doi:10.1590/S1516-89132013000300020
- Sfredo, M., 2002. Secagem de café para obtenção de bebidas finas. Universidade Federal de Uberlândia.
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, a., Jahurul, M.H. a, Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *J. Food Eng.* 124, 105–116. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003
- Taylor, L.T., 1996. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons, New York.
- Tello, J., Viguera, M., Calvo, L., 2011. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 59, 53–60. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.018
- van Hilten, H.J., 2011. *The Coffee Exporter's Guide*, Terceira. ed. Geneva.
- Vargas, R.M.F., Barroso, M.S.T., Neto, R.G., Scopel, R., Falcão, M.A., Silva, C.F. da, Cassel, E., 2013. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO<sub>2</sub>. *Ind. Crops Prod.* 50, 430–435. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.021
- Vieira, M.A., Maraschin, M., Pagliosa, C.M., Podestá, R., de Simas, K.N., Rockenbach, I.I., Amboni, R.D.D.M.C., Amante, E.R., 2010. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *J. Food Sci.* 75, 280–285. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x
- Vieira, M.A., Rovaris, A.A., Maraschin, M., Simas, K.N., Pagliosa, C.M., Podestá, R., Amboni, R.D.M.C., Barreto, P.L.M., Aamante, E.R., 2008. Chemical Characterization of Candy Made of Erva (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *J. Agric. Food Chem* 56, 4637–4642.
- Yu, X., Bao, Z., Zou, J., Dong, J., 2011. Coffee consumption and risk of cancers: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Cancer* 11, 96. doi:10.1186/1471-2407-11-96

#### **4.2 Artigo 2: Otimização do Processo de Remoção de Cafeína das Folhas de Erva-mate por Extração Supercrítica em Diferentes Etapas do Processamento: Experimentos e Modelagem Matemática**

A fim de aprofundar os estudos realizados e apresentados no primeiro artigo, neste artigo são apresentados os resultados da otimização do processo de remoção de cafeína por extração com fluido supercrítico. Para isso, partiu-se da condição ótima de extração definida e se procedeu a extração da cafeína de amostras coletadas em três diferentes etapas do processamento: folha verde (antes de qualquer processamento), folha branqueada (sapecada) e folha seca e moída (cancheada), visando definir qual a etapa do processo de produção de erva-mate para chimarrão é ótima para introduzir a operação unitária de extração supercrítica. Associada à definição da etapa, também se estudou a influência da relação massa de erva-mate/massa de solvente, tendo-se como objetivo minimizar a vazão de solvente necessária para obter erva-mate descafeinada ( $< 0,1\%$ ). Em função da erva-mate para chimarrão conter em média 40% de galhos finos (palitos) no produto final, procedeu-se a extração supercrítica de cafeína de galhos (palitos), pois a exigência da ANVISA está relacionada ao produto final e não somente às folhas. De posse dos resultados obtidos nas duas primeiras etapas, definiu-se a condição ótima, determinou-se experimentalmente a curva de extração, rendimento de extrato *versus* tempo de extração, e se procedeu a modelagem matemática da mesma. Os resultados obtidos indicam que a etapa para a inserção da extração supercrítica é após a etapa de branqueamento, remoção de 5,78% de extrato e de 94% de cafeína, e a relação ótima de massa de erva-mate/massa de solvente é  $1/65 \text{ g}_{\text{erva-mate}}/\text{g}_{\text{solvente}}$ . Observou-se que os palitos possuem uma baixa quantidade de cafeína presente em sua estrutura ( $0,18\%$  para os galhos inteiros e  $0,30\%$  para os galos moídos  $\text{g}_{\text{cafeína}}/\text{g}_{\text{palitos}}$ ), comprovando que a maior concentração deste composto se faz presente nas folhas do material vegetal. Em relação à modelagem matemática, esta representou adequadamente a curva de extração, apresentando um desvio médio em relação aos dados experimentais de 0,030.

Observação: artigo em processo de finalização e será submetido à revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

## 1. INTRODUÇÃO

Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) é uma espécie arbórea da América do Sul que nasce naturalmente na Argentina, no Brasil e no Uruguai. Diversas bebidas são preparadas a partir da infusão de suas folhas, como o chimarrão, quando utilizada água quente, e como o tereré, quando utilizada água fria (Colpo et al., 2016). O Uruguai possui o maior consumo per capita destes países, de 8-10 kg/habitante/ano, seguido pela Argentina, 6,5 kg/habitante/ano e pelo Brasil, com 3-5 kg/habitante/ano (Cardozo Junior and Morand, 2016). Este alto consumo de bebidas à base de erva-mate pode ser explicado pelos seus conhecidos benefícios à saúde, como sua atividade antioxidante, os seus efeitos estimulantes e os seus benefício à saúde cardiovascular (Cardozo Junior and Morand, 2016; Heck and de Mejia, 2007; Vieira et al., 2010). Estes benefícios podem ser explicados pela presença de diferentes compostos nas folhas de erva-mate como xantinas, principalmente a cafeína, polifenóis e saponinas (Burriss et al., 2012).

O consumo de produtos à base de cafeína, porém, não é recomendado a todos, visto que o mesmo também pode ter alguns efeitos prejudiciais à saúde, como insônia e mudanças de humor, podendo até causar um aumento na pressão sanguínea e alterações no batimento cardíaco. Os grupos mais sujeitos a estes efeitos são crianças, gestantes e pessoas idosas (Nawrot et al., 2003; Tello et al., 2011). Nos últimos anos o interesse por produtos descafeinados vem aumentando e já são encontrados no mercado diferentes tipos de cafés descafeinados. De acordo com a Resolução RDC nº 277 de 22 de setembro de 2005, da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, para um produto ser considerado descafeinado este deve ter um teor máximo de cafeína de 0,1% (g/100g) para produtos descafeinados e de 0,3% (g/100g) para produtos solúveis descafeinados.

Cafeína (1,3,7 – trimetilxantina) é hoje uma das substâncias estimulantes mais consumidas no do mundo, capaz de agir nos sistemas nervoso, muscular e circulatório, aumentando a capacidade de concentração e agindo contra a fadiga (Clark and Landolt, 2017; Içen and Gürü, 2010; Tello et al., 2011). A cafeína é altamente utilizada na produção de diferentes bebidas, como energéticos e refrigerantes. Além disso, a cafeína também é utilizada nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, ainda que em menor quantidade quando comparada a indústria de bebidas (Clark and Landolt, 2017; Rodrigues et al., 2016; van Hilten, 2011). A presença de cafeína nas folhas de erva-mate pode variar entre 0,5 a 2,0% (Filip et al., 1998). Três aspectos são responsáveis por esta variação: a época de colheita e plantio, o local da colheita e o processamento industrial o qual a planta é submetida (Cardozo Junior and Morand, 2016; Isolabella et al., 2010; Pagliosa et al., 2010; Schubert et al., 2006).

O processamento industrial ao qual a erva-mate é submetida consiste de cinco estágios principais: colheita, branqueamento (sapeco), secagem, moagem e preparações finais. Dependendo do mercado

para o qual a erva-mate é destinada, uma sexta etapa pode ser requerida, chamada de estacionamento (Butiuk et al., 2016; Isolabella et al., 2010). Para a preparação do chimarrão, são adicionados ainda galhos (palitos) ao produto final, sendo que 40% da massa do produto final enviado para o mercado são palitos.

Um processo conhecido de extração de cafeína de materiais vegetais é a extração com fluidos supercríticos (EFS), a qual é baseada nas propriedades de solvatação de um fluido que se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas (Sharif et al., 2014). EFS é um processo de separação e purificação que possui vantagens em relação a outros processos de extração, por exemplo, alto rendimento de extrato, facilidade de separação soluto-solvente e a não produção de resíduos (Nascimento et al., 2016; Park et al., 2012; Taylor, 1996; Tello et al., 2011). Para o caso específico da cafeína, um cossolvente é geralmente utilizado, devido a sua capacidade de alterar a polaridade do solvente inicial, favorecendo a extração de cafeína (Bermejo et al., 2016). Ainda, destaca-se que a ESF é o método de extração de cafeína mais utilizado por ser considerado mais seguro e sustentável para a preparação de extratos de materiais orgânicos (de Melo et al., 2014).

Entre as atividades associadas ao estudo do processo de extração, faz-se necessário também o uso de modelos matemáticos que relacionam o rendimento de extrato com o tempo como forma de correlacionar os dados experimentais e interpolar ou extrapolar estes a fim de aplicá-los a futuros estudos de extração supercrítica. A partir da modelagem matemática é possível generalizar os resultados experimentais, podendo aplicá-los para novas condições de um novo processo e/ou para outros materiais ainda não estudados. Além disso, a modelagem se torna muito útil para levar estes estudos da escala de laboratório para a escala piloto e/ou industrial (Cabeza et al., 2016; Reverchon, 1997; Scopel et al., 2013).

Tradicionalmente os estudos sobre o tema de extração de cafeína com fluidos supercríticos têm como matéria-prima diferentes tipos de chás e cafés (Bermejo et al., 2016; Içen and Gürü, 2010; Kim et al., 2008; Park et al., 2007, 2012; Tello et al., 2011), enquanto que estudos tendo a erva-mate como matéria-prima são insipientes (Cassel et al., 2010; Franceschini et al., 2017; Saldaña et al., 1999). No estudo proposto por FRANCESCHINI et al. (2017), avaliou-se as condições ótimas para a obtenção de uma erva-mate descafeinada, obtendo-se uma concentração final de cafeína de 0,03% aproximadamente. Porém, a quantidade de CO<sub>2</sub> utilizada foi muito elevada, de 300 g de CO<sub>2</sub> para 1 g de erva-mate, número muito alto para a otimização de um processo em escala industrial.

Neste contexto, o propósito deste trabalho foi avaliar experimentalmente a condição ótima de processo para a obtenção de uma erva-mate descafeinada, isto é, com concentração final de cafeína igual ou menor a 0,1% e, ao mesmo tempo, avaliar como as diferentes etapas do processamento industrial

modificam a matéria prima e influem na remoção de cafeína por extração com fluido supercrítico para a produção do chimarrão. Variou-se a massa de erva-mate utilizada nas extrações a fim de se buscar a melhor condição de extração que minimiza a quantidade necessária de solvente para remoção da cafeína. Para esta condição, determinou-se experimental a curva de extração, rendimento *versus* tempo de extração, e procedeu-se a modelagem matemática da curva.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material

As folhas e os palitos da erva-mate utilizadas neste trabalho foram doadas pela Baldo S.A. (Encantado – Brasil). Em relação às folhas, as mesmas foram obtidas em três estágios do processamento: *in natura*, branqueada (sapecada) e seca e triturada (cancheada), todas provenientes da mesma colheita. Estas amostras foram moídas e peneiradas até um diâmetro de partícula médio de 0,4120 ( $\pm$  0,0870) mm. Para esta granulometria, determinou-se a densidade específica da planta a partir da técnica de picnometria (Oppenheimer et al., 1997; Ruggieri et al., 2009). As folhas *in natura* foram secas a 35°C por 20 minutos para facilitar o processo de moagem, enquanto que as outras duas amostras foram moídas no estado em que foram recebidas. Uma amostra dos palitos que são posteriormente adicionados ao chimarrão também foi doada pela Baldo S.A.

### 2.2. Extração Supercrítica

Os experimentos de extração supercrítica foram conduzidos em um aparelho de escala piloto de extração (Scopel et al., 2013; Vargas et al., 2013). A definição das condições operacionais utilizadas nos experimentos é fruto dos resultados obtidos no estudo de Franceschini et al. (2017): P = 300 bar, T = 60° C, vazão de CO<sub>2</sub> (Air Products 99,9%) = 1200 g/h, concentração de cossolvente (etanol - Merck 96%) = 5,5 m/v. A porosidade de cada amostra foi determinada a partir da equação abaixo (Equação 1):

$$\epsilon = 1 - \frac{\rho_{ap}}{\rho_s} \quad (1)$$

onde  $\epsilon$  é a porosidade do leito,  $\rho_s$  é a densidade específica do material vegetal e  $\rho_{ap}$  é a massa específica do leito.

As folhas utilizadas na etapa de extração vieram de três estágios do processamento: *in natura*, branqueada (sapecada) e seca e triturada (cancheada) a fim de se verificar o efeito que o processamento tem na remoção de cafeína por extração supercrítica. Cada extração foi realizada com

uma quantidade de massa maior que a anterior, com o intuito de buscar a condição ótima que minimiza a quantidade de solvente necessária para a remoção de cafeína, isto é, a razão massa de planta/ massa de solvente ( $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ ). Inicialmente, 8 g foram utilizadas, pois esta foi a melhor condição de remoção de cafeína no trabalho citado. As extrações seguintes foram realizadas com 16, 24 e 36,5 g, este último valor sendo o máximo de planta possível em função do tamanho do vaso extrator. Este plano de experimentos está representado pela Tabela 1. Além disso, procedeu-se a extração da amostra de galhos para verificar se as condições propostas seriam também capazes de remover cafeína dos mesmos, levando-se em consideração que 40% da massa do chimarrão é composta por eles. Inicialmente, 19 experimentos foram realizados.

Tabela 1 – Plano experimental da extração supercrítica de cafeína da erva-mate em relação à razão massa de matéria prima/massa de solvente. P = 300 bar, T = 60° C, vazão de CO<sub>2</sub> = 1200 g/h e concentração de etanol de 5,5%.

Amostra	Amostra de Erva-mate	$m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$
01	<i>In natura</i>	1/300
02		1/150
03		1/100
04*		1/65
05	Branqueada	1/300
06		1/150
07		1/100
08*		1/65
09	Seca e Triturada	1/300
10		1/150
11		1/100
12*		1/65

\* Experimentos realizados em triplicata.

A extração com os palitos seguiu as mesmas condições propostas acima, pressão de 300 bar, temperatura de 60°C, vazão de CO<sub>2</sub> de 1200 g/h e vazão de etanol de 5,5% m/v. A massa de palitos utilizada foi de 21 g, visto que esta foi a quantidade máxima de palitos que coube no vaso extrator. A razão  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$  foi de 1/57.

### 2.3. Determinação da Concentração de Cafeína



A determinação de cafeína nas matérias-primas, folhas e galhos nos produtos descafeinados foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na decocção aquosa dos materiais analisados (Filip et al., 1998). As folhas e os galhos da erva-mate foram moídos até a obtenção de um pó fino com diâmetro de partícula menor que 0,3025 mm. Após, 100 mL de água MiliQ foram adicionados a 5g deste pó e esta mistura foi aquecida por 20min. Após resfriar, a mistura foi filtrada e uma alíquota de 1 mL foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise cromatográfica foi conduzida em um cromatografo Agilent, modelo 1200 com detector de UV. A separação dos compostos foi realizada utilizando um método de gradiente de mistura A contendo água MiliQ/ácido acético (98:2 v/v) e B contendo metanol/ácido acético (98:2 v/v). O gradiente foi de 17% B até 20% B em 20 minutos de maneira isocrática em 5 minutos, 20% de B até 23% de B em 10 minutos e 23% de B até 100 de B em 5 minutos. A vazão foi de 1mL/min. A coluna utilizada é C18 (4.6 x 250 mm x 5 µm) e o comprimento de onda,  $\lambda$ , foi de 273 nm (Filip et al., 1998).

Para validar a análise quantitativa, 10 mg de cafeína (99%, Sigma-Aldrich) foram diluídas em 100 mL de água MiliQ e diferentes diluições desta solução foram preparadas, com concentrações variando de 0,002 a 0,2 mg/mL. A partir da análise destas soluções construiu-se uma curva de calibração entre o comportamento da concentração de cafeína e a área de cada pico (Equação 2). A curva foi ajustada por regressão linear o coeficiente de terminação encontrado ( $R^2$ ) foi de 0,9998.

$$y = 6.10^{-5}x + 0.0003 \quad (2)$$

Onde y é a concentração de cafeína e x é a área de cada pico.

#### 2.4. Modelagem matemática

Um modelo dinâmico foi implementado neste trabalho para representar matematicamente a curva de extração de rendimento *versus* tempo (Reverchon, 1996). Este foi baseado em um balanço de massa unidimensional para o vaso extrator, negligenciando a dispersão axial e considerando a hipótese de um comportamento linear para o equilíbrio entre a fase sólida e fase fluida. A resistência interna à transferência de massa controla a extração supercrítica, desconsiderando o efeito do coeficiente de transferência de massa externo. A densidade específica e a vazão de solvente foram consideradas constantes ao longo do leito. As equações 3 e 4 descrevem este modelo.

Para o fluido supercrítico:

$$\frac{\partial C(z, t)}{\partial t} = -u \frac{\partial C(z, t)}{\partial z} - \frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} \rho_s \frac{\partial q(z, t)}{\partial t} \quad (3)$$

Para a fase sólida:

$$\frac{\partial q(z, t)}{\partial t} = -K_{mt}(q(z, t) - q^*(z, t)) \quad (4)$$

Onde  $C(z, t)$  é a concentração de extrato na fase supercrítica, (g/mL),  $q(z, t)$  é a quantidade de extrato nas folhas de erva-mate ( $g_{\text{extrato}}/g_{\text{planta}}$ ),  $u$  é a velocidade intersticial (m/s) e  $K_{mt}$  o coeficiente de transferência de massa ( $s^{-1}$ ). O equilíbrio entre as fases,  $q^*(z, t)$ , é definido por meio da seguinte equação linear (Equação 5).

$$q^*(z, t) = K_{eq}C(z, t) \quad (5)$$

Onde  $K_{eq}$  é a constante de equilíbrio em  $m^3/kg$ .

Como condições de contorno, considerou-se que o solvente entra livre de soluto no leito extrator, expresso como:

$$C(0, t) = 0 \text{ para todo } t, \quad C(z, 0) = 0 \text{ e } q(z, 0) = q_0 \text{ para todo } z,$$

os quais se associam ao fato de que o solvente está livre de soluto no início da extração, enquanto que o material sólido possui uma concentração homogênea de soluto na planta igual a  $q_0$ .

A massa acumulada de extrato durante a extração é determinada pela integração da equação 6, particularizada pela posição  $z = H$ .

$$\frac{\partial m(z, t)}{\partial t} = C(z, t)Q \quad (6)$$

Onde  $Q$  é a vazão volumétrica de solvente (g/mL) e  $m(z, 0) = 0$  como condição inicial (Sartor et al., 2011).

O modelo matemático utilizado neste trabalho para resolver o sistema de equações proposto foi implementado no software MatLab e o sistema foi resolvido utilizando o solver *ode15s*. Este foi utilizado para que, caso houvesse uma diferença muito grande entre os parâmetros, o sistema pudesse resolver problemas rígidos de forma rápida (Shampine and Reichelt, 1997).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Previamente à extração supercrítica, realizou-se uma extração aquosa de cada uma das amostras recebidas, folhas *in natura*, sapecadas e cancheadas para verificar o valor da concentração de cafeína inicial de cada. As folhas frescas tiveram a maior concentração de cafeína inicial (1,33% g/g), seguida pelas folhas sapecadas (1,30% g/g) e cancheadas (1,26% g/g). Estes resultados vão ao encontro do trabalho de Schmalko & Alzamora, (2001), no qual a concentração de cafeína diminuiu após cada estágio de processamento seguinte. Visto que as amostras frescas foram secas a uma temperatura mais baixa em relação às demais, a presença de uma maior quantidade de água favoreceu a retenção da cafeína na folha devido a sua baixa solubilidade em água (Sfredo, 2002). Em relação aos palitos, estes apresentaram uma concentração de cafeína extremamente baixa em relação às demais, de apenas 0,18%. Este resultado comprova que a maioria da cafeína presente na erva-mate se encontra nas folhas e não nos galhos.

#### 3.1. Resultados da extração supercrítica: concentração de cafeína e rendimento de extrato

Os resultados de rendimento, porosidade do leito de extração e concentração de cafeína para os experimentos realizados com as amostras obtidas nas três etapas de processamento da erva-mate são apresentados na Tabela 5 para as primeiras três amostras de cada etapa do processamento. Os resultados para as extrações realizadas em triplicata encontram-se na Tabela 6. As extrações foram realizadas variando a razão  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ , com pressão ( $P = 300$  bar), temperatura ( $T = 60^{\circ}\text{C}$ ), vazão de solvente ( $v_{\text{solvente}} = 1200$  g/h) e concentração do cossolvente etanol ( $c_{\text{cossolvente}} = 5,5\%$ ) constantes. Foram realizados os experimentos na condição  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$  igual a 1/65 em triplicata, visto que essa foi a menor relação entre as estudadas, assim como os resultados obtidos atendem a legislação vigente (ANVISA) quanto definição de um produto descafeinado, isto é, concentração de cafeína menor ou igual a 0,1%.

Tabela 5 – Resultados do rendimento de extrato e de concentração final de cafeína após ESF para as três etapas do processamento:  $P = 300$  bar,  $T = 60^{\circ}\text{C}$  e  $v_{\text{solvente}} = 1200\text{g/h}$  e  $c_{\text{cossolvente}} = 5,5\%$  m/v.

Amostra	Processamento	$m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ (g/g)	Rendimento de Extrato % (g/g)	Porosidade do Leito	$C_{\text{cafeína}}$ na erva-mate % (g/g)
01	<i>In natura</i>	1/300	6,53	0,83	0,090
02		1/150	6,13	0,80	0,114
03		1/100	5,07	0,78	0,110
04		1/65	5,37	0,76	0,047
05	Branqueada	1/300	7,30	0,83	0,060
06		1/150	6,30	0,80	0,080
07		1/100	4,65	0,78	0,100
08		1/65	4,65	0,76	0,030
09	Seca e triturada	1/300	5,72	0,83	0,036
10		1/150	4,40	0,80	0,088
11		1/100	4,28	0,78	0,124
12		1/65	4,04	0,76	0,058

Tabela 6 – Resultados do rendimento de extrato e de concentração final de cafeína após ESF para os experimentos em triplicata:  $P = 300$  bar,  $T = 60^{\circ}\text{C}$  e  $v_{\text{solvente}} = 1200\text{g/h}$  e  $c_{\text{cossolvente}} = 5,5\%$  m/v.

Amostra	Processamento	$m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ (g/g)	Rendimento de Extrato % (g/g)	Porosidade do Leito	$C_{\text{cafeína}}$ na erva-mate % (g/g)
04	In natura	1/65	$5,14 \pm 0,19$	0,76	$0,062 \pm 0,024$
08	Branqueada	1/65	$4,87 \pm 0,29$	0,76	$0,05 \pm 0,017$
12	Seca e triturada	1/65	$4,60 \pm 0,50$	0,76	$0,078 \pm 0,028$

Observaram-se nos dados apresentados nas Tabelas 5 e 6 que a extração supercrítica aplicada às folhas branqueadas resultou no maior rendimento de extrato e na menor concentração final de cafeína, de 7,30% e 0,003% (g/g). Este resultado era esperado em função do aquecimento da característica do processo de branqueamento, também conhecido como sapeco, onde a alta temperatura do processo ( $250^{\circ}\text{C} < T_{\text{sapeco}} < 500^{\circ}\text{C}$ ) faz com que a água presente na folha (umidade) passe para o estado vapor, rompendo as estruturas internas do material vegetal, facilitando assim a remoção da cafeína. Quando comparado com os resultados obtidos da extração supercrítica a partir das folhas *in natura*, é possível notar que, na maioria dos casos, a etapa de branqueamento promove uma maior remoção de cafeína.

O efeito direto da vazão de solvente sobre o rendimento de extrato é observado, porém o mesmo comportamento não foi observado em relação à remoção da cafeína. Sugere-se como justificativa para explicar a inexistência da relação direta entre a vazão de solvente e a extração de cafeína as imprecisões na determinação da massa de extrato, principalmente para os experimentos com 8g ( $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/300$ ) e 16g ( $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/150$ ) de material vegetal. Com o objetivo de minimizar este erro, os experimentos realizados com 36,5 g ( $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/65$ ), considerando as amostras *in natura*, branqueada e seca e triturada, foram executados em triplicata.

Observou-se que a porosidade do leito varia para as diferentes relações  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ . Esta variação ocorre devido ao fato que a vazão de solvente foi mantida constante para os diferentes experimentos, alterando a massa de folhas. Na condição  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/65$  a massa de planta introduzida no vaso de extração o preenche completamente, enquanto que para as demais condições,  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/300$ ,  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/150$  e  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/100$  o material vegetal preenche 30%, 50% e 69% da altura do vaso, respectivamente. A partir dos resultados apresentados na Tabela 5 é possível notar que a remoção de cafeína é maior para menores valores de porosidade, permitindo inferir que esta variável de processo também influi no processo de extração supercrítica de cafeína a partir das folhas de erva para as condições operacionais  $P = 300$  bar,  $T = 60^{\circ}\text{C}$  e  $v_{\text{solvente}} = 1200\text{g/h}$  e  $c_{\text{cossolvente}} = 5,5\%$  m/v.

Em relação aos resultados da extração supercrítica a partir dos galhos (palitos) da erva-mate se obteve um rendimento de 0,35% (g/g) para as mesmas condições operacionais usadas para as folhas de erva-mate. A única diferença foi a relação  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}} = 1/57$ , pois a capacidade máxima do vaso de extração para os palitos foi de 21g. A concentração de cafeína nos palitos após o material passar pelo processo de extração supercrítica foi de 0,076% (g/g). Assim, como no caso das folhas de erva-mate, a concentração de cafeína nos palitos atende a legislação brasileira (ANVISA) para produtos descafeinados (<0,1%).

A seletividade da cafeína nos extratos permaneceu alta em todos os experimentos, nunca diminuindo de 90%, mesmo quando o rendimento do extrato em geral foi baixo. As amostras 12a e 12b demonstram este comportamento.

### 3.3. Modelagem matemática

Para a modelagem matemática, os valores de densidade específica da planta ( $1,314\text{ g/cm}^3$ ), altura (5,5 cm) e diâmetro do leito (2,7 cm), vazão de  $\text{CO}_2$  (1200 g/h), tempo de extração (2 h) e rendimento esperado de extrato consistem nas variáveis de entrada para a modelagem matemática realizada no simulador MatLab. Para a estimação dos parâmetros do modelo também foi necessário fornecer

valores com as estimativas iniciais dos coeficientes de equilíbrio e de transferência de massa. Os resultados da modelagem são apresentados na Figura 1.

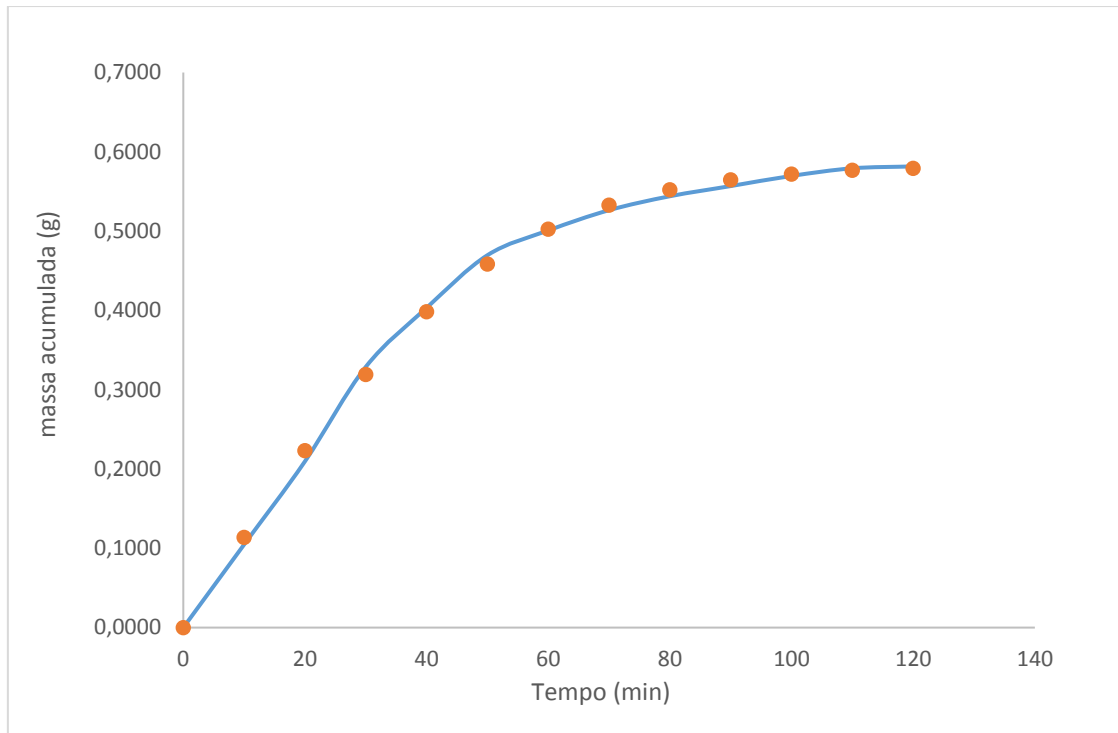


Figura 1 - Curva de extração rendimento *versus* tempo para Amostra 05: (●) dados experimentais; (—) modelo matemático

Os coeficientes de transferência de massa e o valor de  $R^2$  para a curva de extração encontram-se na tabela abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de coeficientes de transferência de massa e de equilíbrio e de  $R^2$  para a modelagem matemática

$K_{eq}$ ( $m^3/kg$ )	0,6143
$K_{mt}$ ( $min^{-1}$ )	0,0966
$R^2$	0,9986

A partir da análise da Figura 1, assim como o valor de  $R^2$  da Tabela 6, percebe-se que o modelo matemático escolhido representou adequadamente os dados experimentais obtidos. Os parâmetros estimados para o modelo foram a constante de equilíbrio ( $K_{eq}$ ) e o coeficiente de transferência de massa ( $K_{mt}$ ). Estes parâmetros foram estimados a partir da minimização da diferença da soma de quadrados de erros entre os dados experimentais e a predição utilizada no modelo. A convergência dos parâmetros está representada na região de confiança elíptica demonstrada na Figura 2. O valor encontrado de convergência entre os parâmetros foi de 0,90.

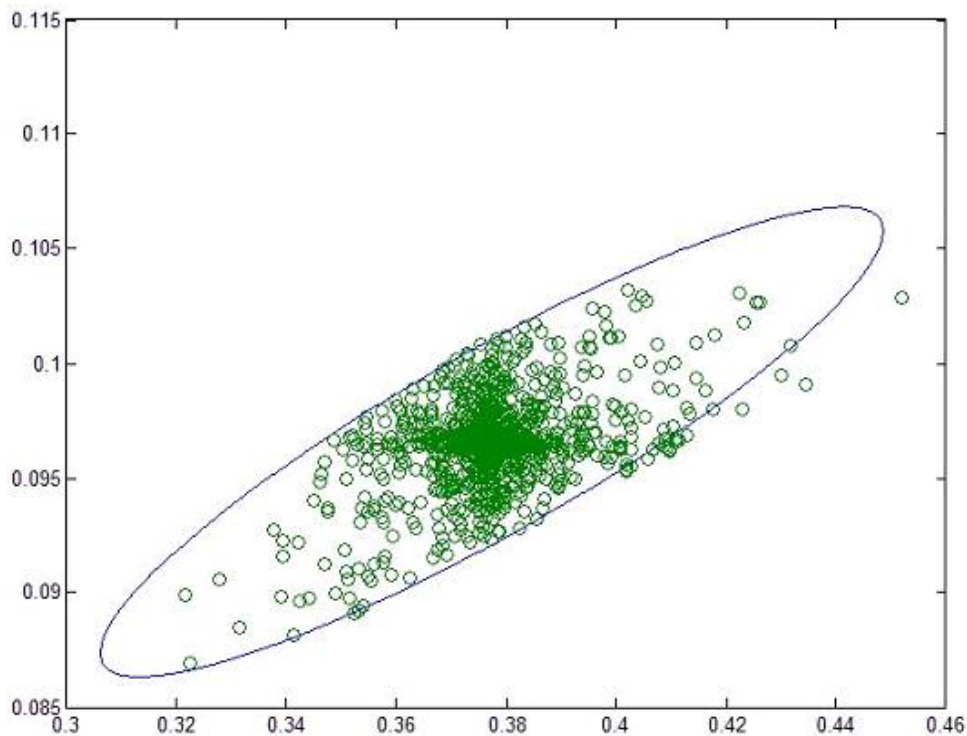


Figura 2 - Região de confiança elíptica dos parâmetros obtidos a partir da modelagem matemática da curva de extração para Amostra 5

A partir do valor encontrado de convergência, 0,90, e pela Figura 2, comprova-se que há uma forte relação de convergência entre os parâmetros  $K_{eq}$  e  $K_{mt}$ . Nota-se na figura que a grande maioria dos círculos tende a ficar exatamente no meio da elipse, fortalecendo esta afirmação. Como melhoria do modelo, sugere-se a incorporação de modelos termodinâmicos (Scopel et al., 2016), visto que etanol foi utilizado junto com o  $CO_2$  e cada concentração de etanol resultaria em um valor de parâmetro diferente. Além disso, sugere-se também que o modelo seja utilizado para estimação de mais conjuntos de parâmetros ao mesmo tempo, como forma de aumentar a capacidade preditiva do modelo.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos para a descafeinização das folhas da erva-mate foi possível concluir que a etapa mais indicada para a incorporação da operação unitária extração supercrítica ao processamento da erva-mate para chimarrão, visando a produção de um produto descafeinado, é em sequência ao branqueamento (sapeco). Esta conclusão é fruto da concentração final de cafeína (0,050

$\pm 0,017\%$ ) obtido para as folhas branqueadas, associada ao fato que a erva-mate necessita passar pela etapa de branqueamento após a colheita para evitar a oxidação da matéria-prima, inviabilizando assim o uso das folhas *in natura*, etapa que apresentou resultados semelhantes ao selecionado.

Destaca-se que, na grande parte dos experimentos, as condições operacionais escolhidas  $P = 300$  bar,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $v_{\text{solvente}} = 1200\text{g/h}$  e  $c_{\text{cosolvente}} = 5,5\%$  m/v satisfizeram a condição imposta pela ANVISA para um produto descafeinado, resultando em um produto final com uma concentração de cafeína abaixo de  $0,1\%$ . Entre as relações  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ , aquela que se apresentou como a mais indicada  $1/65$  g<sub>erva-mate</sub>/g<sub>solvente</sub>, pois consiste na condição de menor quantidade de solvente, consequentemente na condição mais viável economicamente.

Em relação à modelagem matemática, esta representou adequadamente os dados experimentais, fato este evidenciado pelo valor encontrado de  $R^2$  de  $0,998$ . Uma forte correlação entre os parâmetros gerados pelo modelo também pôde ser comprovada. A viabilidade destes dados gerados pode ser muito útil em um futuro processo de *scale-up* para a remoção de cafeína das folhas de erva-mate.

## Referências

- Bermejo, D.V., Ibáñez, E., Reglero, G., Fornari, T., 2016. Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from green tea. *J. Supercrit. Fluids* 107, 507–512. doi:10.1016/j.supflu.2015.07.008
- Burris, K.P., Harte, F.M., Michael Davidson, P., Neal Stewart Jr, C., Zivanovic, S., 2012. Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. *Chil. J. Agric. Res.* 72, 268–275. doi:10.4067/S0718-58392012000200016
- Butiuk, A.P., Martos, M.A., Adachi, O., Hours, R.A., 2016. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 3, 27–33. doi:10.1016/j.jarmap.2015.12.003
- Cabeza, A., Sobrón, F., García-Serna, J., Cocero, M.J., 2016. Simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction from natural matrices in packed bed columns: User-friendly simulator tool using Excel. *J. Supercrit. Fluids* 116, 198–208. doi:10.1016/j.supflu.2016.05.020
- Cardozo Junior, E.L., Morand, C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *J. Funct. Foods* 21, 440–454. doi:10.1016/j.jff.2015.12.010
- Cassel, E., Vargas, R.M.F., Brun, G.W., Almeida, D.E., Cogoi, L., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *J. Food Eng.* 100, 656–661. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015
- Clark, I., Landolt, H.P., 2017. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Med. Rev.* 31, 70–78. doi:10.1016/j.smr.2016.01.006
- Colpo, A.C., Rosa, H., Lima, M.E., Pazzini, C.E.F., de Camargo, V.B., Bassante, F.E.M., Puntel, R., Ávila, D.S., Mendez, A., Folmer, V., 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem.* 209, 185–195. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.059
- de Melo, M.M.R., Silvestre, A.J.D., Silva, C.M., 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable



- matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids* 92, 115–176. doi:10.1016/j.supflu.2014.04.007
- Filip, R., Lopez, P., Coussio, J., Ferraro, G., 1998. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. *Phyther. Res.* 12, 129–131. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<129::AID-PTR191>3.0.CO;2-1
- Franceschini, G. do N., Sanvido, M.E., Garcez, J.J., Barros, F.N. de, Lucas, A.M., Kunde, M.A., Cappellari, A.R., Morrone, F.B., Cassel, E., 2017. Evaluation of an Infusion obtained from Decaffeinated Yerba Mate Processed by Supercritical Fluid Extraction on the Cell Viability of Human Esophageal Cancer.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, 138–151. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
- Içen, H., Gürü, M., 2010. Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. *J. Supercrit. Fluids* 55, 156–160. doi:10.1016/j.supflu.2010.07.009
- Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem.* 122, 695–699. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.039
- Kim, W.-J., Kim, J.-D., Kim, J., Oh, S.-G., Lee, Y.-W., 2008. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J. Food Eng.* 89, 303–309. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.05.018
- Nascimento, A.D.P. do, Soares, L.A.L., Stragevitch, L., Danielski, L., 2016. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. *J. Supercrit. Fluids* 111, 1–7. doi:10.1016/j.supflu.2016.01.013
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Addit. Contam.* 20, 1–30. doi:10.1080/0265203021000007840
- Oppenheimer, J.R., Martin, A.G., Walker, L.P., 1997. Measurements of air-filled porosity in unsaturated organic matrices using a pycnometer. *Bioresour. Technol.* 59, 241–247.
- Pagliosa, C.M., de Simas, K.N., Amboni, R.D.M.C., Murakami, A.N.N., Petkowicz, C.L.O., Medeiros, J. de D., Rodrigues, A.C., Amante, E.R., 2010. Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ind. Crops Prod.* 32, 428–433. doi:10.1016/j.indcrop.2010.06.010
- Park, H., Lee, H., Shin, M., Lee, K., Lee, H., Kim, Y., Kim, K., Kim, K., 2007. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 105, 1011–1017. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.064
- Park, H.S., Im, N.G., Kim, K.H., 2012. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 73–78. doi:10.1016/j.lwt.2011.07.023
- Reverchon, E., 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids* 10, 1–37. doi:10.1016/S0896-8446(97)00014-4
- Reverchon, E., 1996. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *Aiche J.* 42, 1765–1771. doi:10.1002/aic.690420627
- Rodrigues, F., Alves, A.C., Nunes, C., Sarmiento, B., Amaral, M.H., Reis, S., Oliveira, M.B.P.P., 2016. Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? *Int. J. Pharm.* 513, 496–503. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.059
- Ruggieri, L., Gea, T., Artola, A., Sánchez, A., 2009. Bioresource Technology Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: A review and a correlation analysis. *Bioresour. Technol.* 100, 2655–2666. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.049
- Saldaña, M.D., Mohamed, R.S., Baer, M.G., Mazzafera, P., 1999. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3804–8. doi:10.1021/jf981369z
- Sartor, R.B., Secchi, A.R., Soares, R.D.P., Cassel, E., 2011. Dynamic Simulation of Rosemary Essential Oil Extraction in an Industrial Steam Distillation Unit. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 3955–3959. doi:10.1021/ie1015848

- Schmalko, M.E., Alzamora, S.M., 2001. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing 19, 599–610. doi:10.1081/DRT-100103937
- Schubert, A., Zanin, F., Pereira, D., Athayde, M., 2006. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.(erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova* 29, 1233–1236.
- Scopel, R., da Silva, C.F., Lucas, A.M., Garcez, J.J., do Espírito Santo, A.T., Almeida, R.N., Cassel, E., Vargas, R.M.F., 2016. Fluid phase equilibria and mass transfer studies applied to supercritical fluid extraction of *Illicium verum* volatile oil. *Fluid Phase Equilib.* 417, 203–211. doi:10.1016/j.fluid.2016.02.042
- Scopel, R.S., Neto, R.G., Falcão, M.A., Cassel, E., Vargas, R.M.F., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of *Schinus molle* L with Co-Solvents: Mathematical Modeling and Antimicrobial Applications. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56, 513–519. doi:10.1590/S1516-89132013000300020
- Sfredo, M., 2002. Secagem de café para obtenção de bebidas finas. Universidade Federal de Uberlândia.
- Shampine, L.F., Reichelt, M.W., 1997. The MATLAB ODE Suite. *SIAM J. Sci. Comput.* 18, 1–22. doi:10.1137/S1064827594276424
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, a., Jahurul, M.H. a, Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *J. Food Eng.* 124, 105–116. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003
- Taylor, L.T., 1996. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons, New York.
- Tello, J., Viguera, M., Calvo, L., 2011. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 59, 53–60. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.018
- van Hilten, H.J., 2011. *The Coffee Exporter's Guide*, Terceira. ed. Geneva.
- Vargas, R.M.F., Barroso, M.S.T., Neto, R.G., Scopel, R., Falcão, M.A., Silva, C.F. da, Cassel, E., 2013. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO<sub>2</sub>. *Ind. Crops Prod.* 50, 430–435. doi:10.1016/j.indcrop.2013.08.021
- Vieira, M.A., Maraschin, M., Pagliosa, C.M., Podestá, R., de Simas, K.N., Rockenbach, I.I., Amboni, R.D.D.M.C., Amante, E.R., 2010. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *J. Food Sci.* 75, 280–285. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal deste trabalho foi a obtenção de uma erva-mate descafeinada de acordo com as normas da ANVISA, ou seja, com concentração máxima de cafeína de 0,1% m/m a partir da tecnologia de extração com dióxido de carbono supercrítico e misturas deste com etanol. A primeira etapa do trabalho consistiu em encontrar a condição ótima de remoção de cafeína avaliando as seguintes variáveis de processo: propriedades da matéria prima, como granulometria, densidade e teor de umidade, assim como as condições operacionais do processo de extração, temperatura, pressão e quantidade de etanol necessário. A partir da definição da condição ótima de extração, novas variáveis de processo foram avaliadas, a fim de refinar o estudo inicial. Estudou-se então como o processamento industrial modifica a matéria-prima e influi na remoção de cafeína por extração com fluido supercrítico, assim como se procurou encontrar a razão ótima entre a massa de planta e a massa de solvente utilizada no processo extrativo. A fim de correlacionar as variáveis de processo com os dados experimentais, foi realizada a modelagem matemática da curva de extração rendimento *versus* tempo, gerando uma ferramenta importante para o *scale-up* do processo. Por fim, avaliou-se a viabilidade celular de extratos com cafeína e sem cafeína em diferentes linhagens de câncer esofágico.

As propriedades físicas da erva-mate, densidade, teor de umidade e granulometria, assim como as condições operacionais do processo de extração supercrítica, como temperatura, pressão, vazão de CO<sub>2</sub> e uso de etanol como cossolvente, tiveram uma grande influência na remoção de cafeína do material vegetal. A ocorrência de partículas menores aumentou a acessibilidade do solvente ao extrato, conseqüentemente aumentando o rendimento da extração e a remoção de cafeína. Ao mesmo tempo, a seletividade para cafeína atingiu seu pico e depois foi reduzida. Comportamento oposto pode ser observado para as amostras

posteriores em relação ao teor de umidade e uso de etanol como cossolvente, respectivamente. Neste caso, a seletividade em relação a cafeína permaneceu maior quando comparada aos outros compostos. O uso de etanol como cossolvente gerou os melhores resultados, seguido pelo uso de água para alteração do teor de umidade do material vegetal. Todos estes resultados demonstraram a importância não só da otimização das condições de operação, mas também da verificação das propriedades físicas da matéria-prima previamente à extração e a polaridade do solvente.

A partir da avaliação dos efeitos causados pelas etapas do processamento industrial na matéria prima, foi possível concluir que a etapa mais indicada para a incorporação da operação unitária de extração supercrítica ao processamento da erva-mate para chimarrão, visando a produção de um produto descafeinado, é em sequência ao branqueamento (sapeco). Esta conclusão é fruto da concentração final de cafeína ( $0,050 \pm 0,017\%$ ) obtido para as folhas branqueadas, associada ao fato que a erva-mate necessita passar pela etapa de branqueamento após a colheita para evitar a oxidação da matéria-prima, inviabilizando assim o uso das folhas *in natura*, etapa que apresentou resultados semelhantes ao selecionado.

Destaca-se que, na grande parte dos experimentos, as condições operacionais escolhidas  $P = 300 \text{ bar}$ ,  $T = 60^\circ\text{C}$  e  $V_{\text{solvente}} = 1200\text{g/h}$  e  $C_{\text{cossolvente}} = 5,5\% \text{ m/v}$  satisfizeram a condição imposta pela ANVISA para um produto descafeinado, resultando em um produto final com uma concentração de cafeína abaixo de  $0,1\%$ . Entre as relações  $m_{\text{planta}}/m_{\text{solvente}}$ , aquela que se apresentou como a mais indicada  $1/65 \text{ g}_{\text{erva-mate}}/\text{g}_{\text{solvente}}$ , pois consiste na condição de menor quantidade de solvente, conseqüentemente na condição mais viável economicamente.

Em relação à modelagem matemática, esta representou adequadamente os dados experimentais, fato este evidenciado pelo valor encontrado de  $R^2$  de  $0,998$ . Uma forte correlação entre os parâmetros gerados pelo modelo também pôde ser comprovada. A viabilidade destes dados gerados pode ser muito útil em um futuro processo de *scale-up* para a remoção de cafeína das folhas de erva-mate, tornando-se possível a introdução de um produto até agora inexistente no mercado, a erva-mate descafeinada.

Quanto aos resultados observados na viabilidade celular do câncer de esôfago, sugere-se que os extratos de erva-mate diminuíram a viabilidade celular no CE e este efeito foi independente da composição da cafeína.

Por fim, como trabalhos futuros, sugere-se a realização de análises sensoriais com a erva-mate descafeinada a fim de realizar a comparação entre infusões descafeinadas e infusões tradicionais.

## 6 REFERÊNCIAS

- Aguiar, A.C. de, Silva, L.P.S., Rezende, C.A. de, Barbero, G.F., Martínez, J., 2016. Encapsulation of pepper oleoresin by supercritical fluid extraction of emulsions. *J. Supercrit. Fluids* 112, 37–43. doi:10.1016/j.supflu.2016.02.009
- Ajani, J.A., Barthel, J.S., Bentrem, D.J., D'Amico, T.A., Das, P., Denlinger, C.S., Fuchs, C.S., Gerdes, H., Glasgow, R.E., Hayman, J.A., Hofstetter, W.L., Ilson, D.H., Keswani, R.N., Kleinberg, L.R., Korn, W.M., Lockhart, A.C., Mulcahy, M.F., Orringer, M.B., Osarogiagbon, R.U., Posey, J.A., Sasson, A.R., Scott, W.J., Shibata, S., Strong, V.E.M., Varghese, T.K., Warren, G., Washington, M.K., Willett, C., Wright, C.D., National Comprehensive Cancer Network, 2011. Esophageal and esophagogastric junction cancers. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 9, 830–87.
- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., Filip, R., 2012. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 299–304. doi:10.1016/j.lwt.2011.06.015
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005.
- Arnal, M.J.D., Arenas, Á.F., Arbeloa, Á.L., 2015. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J. Gastroenterol.* 21, 7933–43. doi:10.3748/wjg.v21.i26.7933
- Arnold, M., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Forman, D., 2015. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Lancet. Oncol.* 64, 381–387. doi:10.1016/S1470-2045(13)70546-1
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E.H.A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F.N.R., Elaissari, A., 2015.

- Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int. J. Pharm.* 483, 220–243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- Ashihara, H., Crozier, A., 2001. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci.* 6, 407–413. doi:10.1016/S1360-1385(01)02055-6
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- B Gupta, R., Shim, J.-J., 2007. *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Bermejo, D.V., Ibáñez, E., Reglero, G., Fornari, T., 2016. Effect of cosolvents (ethyl lactate, ethyl acetate and ethanol) on the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of caffeine from green tea. *J. Supercrit. Fluids* 107, 507–512. doi:10.1016/j.supflu.2015.07.008
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethnopharmacol.* 136, 378–384. doi:10.1016/j.jep.2010.06.032
- Brenelli, E., 2003. A extração de cafeína em bebidas estimulantes-uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. *Quim. Nova* 26, 136–138. doi:10.1590/S0100-40422003000100023
- Brun, G.W., 2012. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ERVA-MATE DESCAFEINADA E DE MICRO / NANOPARTÍCULAS DE CAFEÍNA USANDO DIÓXIDO DE CARBONO. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Butiuk, A.P., Martos, M.A., Adachi, O., Hours, R.A., 2016. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 3, 27–33. doi:10.1016/j.jarmap.2015.12.003
- Cabeza, A., Sobrón, F., García-Serna, J., Cocero, M.J., 2016. Simulation of the

- supercritical CO<sub>2</sub> extraction from natural matrices in packed bed columns: User-friendly simulator tool using Excel. *J. Supercrit. Fluids* 116, 198–208. doi:10.1016/j.supflu.2016.05.020
- Cardozo, E.L., Ferrarese-Filho, O., Filho, L.C., Ferrarese, M.D.L.L., Donaduzzi, C.M., Sturion, J.A., 2007. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *J. Food Compos. Anal.* 20, 553–558. doi:10.1016/j.jfca.2007.04.007
- Cardozo Junior, E.L., Morand, C., 2016. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. *J. Funct. Foods* 21, 440–454. doi:10.1016/j.jff.2015.12.010
- Cassel, E., Bedinot, C., Vargas, F.R.M., 2011. Unidade Piloto de Extração Supercrítica. PROV020110081175.
- Cassel, E., Vargas, R.M.F., Brun, G.W., 2008. Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterapêuticos, in: *Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais*. Edipucrs, Porto Alegre, p. 21.
- Cassel, E., Vargas, R.M.F., Brun, G.W., Almeida, D.E., Cogoi, L., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *J. Food Eng.* 100, 656–661. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.05.015
- Clark, I., Landolt, H.P., 2017. Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Med. Rev.* 31, 70–78. doi:10.1016/j.smrv.2016.01.006
- Colpo, A.C., Rosa, H., Lima, M.E., Pazzini, C.E.F., de Camargo, V.B., Bassante, F.E.M., Puntel, R., Ávila, D.S., Mendez, A., Folmer, V., 2016. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chem.* 209, 185–195. doi:10.1016/j.foodchem.2016.04.059
- Daniel, O., 2009. Erva-mate: Sistema de produção e processamento industrial. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- de Melo, M.M.R., Silvestre, A.J.D., Silva, C.M., 2014. Supercritical fluid extraction of



- vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *J. Supercrit. Fluids* 92, 115–176. doi:10.1016/j.supflu.2014.04.007
- Demissie, E.G., Woyessa, G.W., Abebe, A., 2016. UV/VIS spectrometer determination of caffeine in green coffee beans from hararghe, ethiopia, using beer-lambert's law and integrated absorption coefficient techniques. *Ind. Aliment. Sci. Study Res. Chem. Chem. Eng. Biotechnol.* 17, 109–123.
- DERAL - Departamento de Economia Rural, 2014. Produtos Florestais - Erva-mate 9.
- EMBRAPA, (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2014. Cultivo da Erva-Mate [WWW Document]. Cultiv. da Erva-Mate. URL <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/temas-publicados> (accessed 4.19.16).
- Filip, R., Lopez, P., Coussio, J., Ferraro, G., 1998. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. *Phyther. Res.* 12, 129–131. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199803)12:2<129::AID-PTR191>3.0.CO;2-1
- Gerhardt, M., 2011. Colonos ervateiros: história ambiental e imigração no Rio Grande do Sul. *Esboços - Rev. do Programa Pós-Graduação em História da UFSC* 18, 73–95. doi:10.5007/2175-7976.2011v18n25p73
- Gnoatto, S.C.B., Bassani, V.L., Coelho, G.C., Schenkel, E.P., 2007. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). *Quim. Nova* 30, 304–307. doi:10.1590/S0100-40422007000200012
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, 138–151. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x
- Içen, H., Gürü, M., 2010. Effect of ethanol content on supercritical carbon dioxide extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes. *J. Supercrit. Fluids* 55, 156–160. doi:10.1016/j.supflu.2010.07.009

- INCA, 2016. *estimativa-2016-v11* [WWW Document]. URL <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
- Islami, F., Boffetta, P., Ren, J.-S., Pedoeim, L., Khatib, D., Kamangar, F., 2009. High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk--a systematic review. *Int. J. cancer* 125, 491–524. doi:10.1002/ijc.24445
- Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R., 2010. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chem.* 122, 695–699. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.039
- Jin, J.-Q., Yao, M.-Z., Ma, C.-L., Ma, J.-Q., Chen, L., 2016. Association mapping of caffeine content with TCS1 in tea plant and its related species. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 251–259. doi:10.1016/j.plaphy.2016.04.032
- Kim, W.-J., Kim, J.-D., Kim, J., Oh, S.-G., Lee, Y.-W., 2008. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. *J. Food Eng.* 89, 303–309. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.05.018
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., Lu, J., Xu, H., Wang, H., 2007. Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment. *Food Chem.* 101, 1451–1456. doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.054
- Lisowski, A., Tochowski, A.Ś.W.I.Ę., 2011. Density and porosity of the cut and ground material of energy plants. *Agric. For. Eng.* 58, 21–28.
- Mazzafera, P., 1997. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chem.* 60, 67–71. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00311-1
- Mazzafera, P., Carvalho, A., 1991. A cafeína do café. *Doc. IAC* 25, 1–22.
- Mello, D.R. de, 2005. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005, Diário Oficial da União. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior, 2015. Alice Web [WWW Document]. Balança Comer. Cafeína 2015. URL <http://aliceweb.mdic.gov.br/> (accessed 4.19.16).
- Montes, A., Wehner, L., Pereyra, C., Ossa, E.J.M. de la, 2016. Mangiferin

- nanoparticles precipitation by supercritical antisolvent process. *J. Supercrit. Fluids* 112, 44–50. doi:10.1016/j.supflu.2016.02.008
- Nascimento, A.D.P. do, Soares, L.A.L., Stragevitch, L., Danielski, L., 2016. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. *J. Supercrit. Fluids* 111, 1–7. doi:10.1016/j.supflu.2016.01.013
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M., 2003. Effects of caffeine on human health. *Food Addit. Contam.* 20, 1–30. doi:10.1080/0265203021000007840
- Pagliosa, C.M., Vieira, M.A., Podestá, R., Maraschin, M., Zeni, A.L.B., Amante, E.R., Amboni, R.D.D.M.C., 2010. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *Food Chem.* 122, 173–178. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.040
- Park, H., Lee, H., Shin, M., Lee, K., Lee, H., Kim, Y., Kim, K., Kim, K., 2007. Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 105, 1011–1017. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.064
- Park, H.S., Im, N.G., Kim, K.H., 2012. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 73–78. doi:10.1016/j.lwt.2011.07.023
- Peker, H., Srinivasan, M., Smith, J., McCoy, B., 1992. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. *AIChE J.* 38, 761–770. doi:10.1002/aic.690380513
- Reverchon, E., 1997. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids* 10, 1–37. doi:10.1016/S0896-8446(97)00014-4
- Reverchon, E., 1996. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *Aiche J.* 42, 1765–1771. doi:10.1002/aic.690420627
- Reverchon, E., De Marco, I., 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of

- natural matter. *J. Supercrit. Fluids* 38, 146–166. doi:10.1016/j.supflu.2006.03.020
- Rodrigues, F., Alves, A.C., Nunes, C., Sarmiento, B., Amaral, M.H., Reis, S., Oliveira, M.B.P.P., 2016. Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? *Int. J. Pharm.* 513, 496–503. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.059
- Rubenstein, J.H., Shaheen, N.J., 2015. Epidemiology, Diagnosis, and Management of Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 149, 302–317.e1. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.053
- Saldaña, M.D., Mohamed, R.S., Baer, M.G., Mazzafera, P., 1999. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3804–8. doi:10.1021/jf981369z
- Sartor, R.B., Secchi, A.R., Soares, R.D.P., Cassel, E., 2011. Dynamic Simulation of Rosemary Essential Oil Extraction in an Industrial Steam Distillation Unit. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 3955–3959. doi:10.1021/ie1015848
- Scopel, R.S., 2013. Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Scopel, R.S., Neto, R.G., Falcão, M.A., Cassel, E., Vargas, R.M.F., 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of *Schinus molle* L with Co-Solvents: Mathematical Modeling and Antimicrobial Applications. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56, 513–519. doi:10.1590/S1516-89132013000300020
- Sfredo, M., 2002. Secagem de café para obtenção de bebidas finas. Universidade Federal de Uberlândia.
- Sharif, K.M., Rahman, M.M., Azmir, J., Mohamed, a., Jahurul, M.H. a, Sahena, F., Zaidul, I.S.M., 2014. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *J. Food Eng.* 124, 105–116. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003
- Silva, G.F. da, Gandolfi, P.H.K., Almeida, R.N., Lucas, A.M., Cassel, E., Vargas, R.M.F., 2015. Analysis of supercritical fluid extraction of lycopodium using

- response surface methodology and process mathematical modeling. *Chem. Eng. Res. Des.* 100, 353–361. doi:10.1016/j.cherd.2015.05.039
- Simões, C.M.O., P. Schenkel, E., Gosmann, G., C. P. de M., J., Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6th ed. UFRGS.
- Sovová, H., 2012. Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials. *J. Chromatogr. A* 1250, 27–33. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.014
- Sovová, H., 1994. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub> - I. Modelling of extraction curves. *Chem. Eng. Sci.* 49, 409–414. doi:10.1016/0009-2509(94)87012-8
- Taylor, L.T., 1996. *Supercritical Fluid Extraction*. John Wiley & Sons, New York.
- Tello, J., Viguera, M., Calvo, L., 2011. Extraction of caffeine from Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 59, 53–60. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.018
- Thea, A.E., Ferreira, D., Brumovsky, L.A., Schmalko, M.E., 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). *Food Control* 60, 215–220. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.046
- van Hilten, H.J., 2011. *The Coffee Exporter's Guide*, Terceira. ed. Geneva.
- Vieira, M.A., Maraschin, M., Pagliosa, C.M., Podestá, R., de Simas, K.N., Rockenbach, I.I., Amboni, R.D.D.M.C., Amante, E.R., 2010. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. *J. Food Sci.* 75, 280–285. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01548.x
- Vieira, M.A., Rovaris, A.A., Maraschin, M., Simas, K.N., Pagliosa, C.M., Podestá, R., Amboni, R.D.M.C., Barreto, P.L.M., Aamante, E.R., 2008. Chemical Characterization of Candy Made of Erva (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *J. Agric. Food Chem* 56, 4637–4642.

