

CRISTINA BENINCÁ

**ESTABILIDADE DO ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO: RELAÇÃO ENTRE A
CINÉTICA QUÍMICA E O PROCESSAMENTO DE ERVA-MATE**

CURITIBA

2009

CRISTINA BENINCÁ

**ESTABILIDADE DO ÁCIDO 5-O-CAFEOILQUÍNICO: RELAÇÃO ENTRE A
CINÉTICA QUÍMICA E O PROCESSAMENTO DE ERVA-MATE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTA – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Georges Kaskantzis Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Everton Fernando Zanoelo

CURITIBA

2009

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Prof. Georges Kaskantzis Neto e Prof. Everton F. Zanoelo, pelo incentivo e suporte para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Jesuíno (*in memoriam*) e Élide Benincá, pelo esforço incondicional na promoção dos meus estudos e por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA) da UFPR pela oportunidade concedida e pelo suporte laboratorial e de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ) da UFPR por compartilhar toda sua infraestrutura de pesquisa experimental e de modelagem disponível.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, sem a qual a realização deste trabalho seria inviável.

Aos colegas e colaboradores Maurício Passos, Maria da Graça Teixeira de Toledo, Eriel Forville de Andrade, ao Prof. Luiz Fernando de Lima Luz Júnior e ao CEPPA pela colaboração com os ensaios cromatográficos.

Ao amigo e discente de graduação em Engenharia Química Tiago Effting pelo auxílio no início dos ensaios experimentais.

A todos os amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, expresso minha sincera gratidão.

RESUMO

Ensaio experimentais para a investigação da estabilidade química do ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-CQA) foram realizados em solução aquosa, e em fase gás, na presença de vapor e oxigênio. Os experimentos foram conduzidos em escala de laboratório utilizando reatores batelada de vidro em condições isotérmicas. As concentrações do 5-CQA nos ensaios cinéticos em solução aquosa e na presença de vapor foram determinadas em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado a um detector de arranjo de diodos. As análises espectrofotométricas foram empregadas para as amostras de 5-CQA submetidas à atmosfera oxidante. Os experimentos foram realizados em diferentes temperaturas para a determinação das constantes cinéticas da taxa de decomposição do 5-CQA. Os resultados dos experimentos conduzidos em solução aquosa, com pH 4, indicam que o reagente se mantém estável até a temperatura de ebulição da água, na pressão atmosférica. Modelos cinéticos que representam uma reação reversível e irreversível de pseudo-primeira ordem foram utilizados com sucesso para representar a redução da concentração de 5-CQA na presença de vapor d'água e oxigênio, respectivamente. O efeito da temperatura sobre as constantes da taxa de reação, nos ensaios em atmosfera, foi descrito adequadamente pela expressão de Arrhenius no intervalo de temperatura de 100 a 226 °C. Os resultados sugerem transesterificação e oxidação irreversível do 5-CQA presente na erva-mate quando submetida a operações que exponham o produto a altas temperaturas em atmosfera inerte (vapor) e oxidativa, respectivamente.

ABSTRACT

A set of experiments to investigate the chemical stability of the 5-*o*-caffeoylquinic acid (5-CQA) was carried out in aqueous solution and in gas phase. A bench-scale batch reactor made of glass and operated at isothermal conditions was used to obtain the experimental results in different reaction times and temperatures. A high performance liquid chromatograph (HPLC) with diode-array detection, and a spectrophotometer were applied to monitor the 5-CQA concentrations in the presence of liquid/vapor water and oxygen, respectively. The experimental results in aqueous solution at pH close to 4,0 indicate that the investigated compound is stable up to the boiling point of water at atmospheric pressure. The observed consume of 5-CQA in the experiments involving water vapor and oxygen were correctly calculated with simplified kinetic models that represent the rates of a reversible and irreversible pseudo-first order reaction, respectively. In these cases, the influence of temperature on the experimental rate constants were correctly described with an Arrhenius type expression in the range of temperature from 100 to 226 °C. On the whole, the results suggest transesterification and oxidation of 5-CQA during manufacturing process of mate leaves in the presence of water and oxygen at elevated temperatures, respectively.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – ESTRUTURAS DOS ÁCIDOS HIDRÓXICINÂMICOS. FONTE: ADAPTADO DE LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA (1995).....	8
FIGURA 2.2 – ESTRUTURA DO ÁCIDO 5-O-CAFFEOILQUÍNICO FONTE: ADAPTADO DE CLIFFORD <i>et al.</i> (2008).....	8
FIGURA 2.3 – ESTRUTURA DO ÁCIDO QUÍNICO (Q) E CAFFEOIL (C) <i>cis e trans</i> FONTE: ADAPTADO DE CLIFFORD <i>et al.</i> (2008).....	9
FIGURA 2.4 – QUANTIDADE DE 5-CQA (BARRAS ESCURAS) E CQA TOTAIS (BARRAS CLARAS) EM RELAÇÃO A QUANTIDADE TOTAL DE CGA PRESENTES NA ERVA-MATE. 1-5: CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; 6: NEGISHI <i>ET AL.</i> , 2004; 7-9: BRAVO <i>ET AL.</i> , 2007.	11
FIGURA 2.5 – CONCENTRAÇÃO DE 5-CQA PRESENTE EM FOLHAS E ERVA-MATE COMERCIAL DA ESPÉCIE ILEX PARAGUARIENIS. 1: FILIP <i>ET AL.</i> (2000); 2-3; TAMASI <i>ET AL.</i> , 2007; 4: NEGISHI <i>ET AL.</i> , 2004, 5: MAZZAFERA, 1997; 6: ZANOELO <i>ET AL.</i> , 2006; 7-9: BRAVO <i>ET AL.</i> , 2007; 10: BASTOS <i>ET AL.</i> , 2006.	12
FIGURA 3.1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REATOR (1), TERMOPAR (2), BANHO ULTRATERMOSTÁTICO (3), AGITADOR MAGNÉTICO (4) E BARRA MAGNÉTICA (5).....	19
FIGURA 3.2 – ESQUEMA DO SISTEMA CONTENTO AMOSTRA REACIONAL: (1) VIAL, (2) VIDRO DE PENICILINA, (3) ALÇA PARA REMOVER O VIAL, (4) TERMOPAR	23
FIGURA 4.1 – ABSORBÂNCIA RELATIVA DO 5-CQA EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA.....	31
FIGURA 4.2 – CURVAS PADRÃO NOS CROMATÓGRAFOS SHIMADZU (A) E VARIAN (B) A 323 NM.....	32
FIGURA 4.3 – CURVA PADRÃO NO CROMATÓGRAFO AGILENT A 323 NM.....	33
FIGURA 4.4 – CURVA PADRÃO NO ESPECTROFOTÔMETRO A 323 NM.....	34

FIGURA 4.5 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM SOLUÇÃO AQUOSA	35
FIGURA 4.6 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM ATMOSFERA COM VAPOR.....	35
FIGURA 4.7 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM ATMOSFERA COM O ₂	36
FIGURA 4.8 – CONCENTRAÇÕES ADIMENSIONAIS DE 5-CQA. (A) ESTE TRABALHO A 70°C COM CROMATÓGRAFO SHIMADZU () E VARIAN (◊). (B) ESTE TRABALHO A 90°C COM CROMATÓGRAFO SHIMADZU () E VARIAN (◊). LINHA CONTÍNUA: EXPERIMENTO 6 DA TABELA 2.3; LINHA TRACEJADA: EXPERIMENTO 4 DA TABELA 2.3. CRUZES: RESULTADOS DA TABELA 4.2.....	37
FIGURA 4.9 – DETERMINAÇÃO DE K ₂₉₈ E ΔH/R DA EQUAÇÃO DE VAN'T HOFF INTEGRADA E LINEARIZADA A PARTIR DE DADOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO A DIFERENTES TEMPERATURAS, R ² =0,74.	41
FIGURA 4.10 – RELAÇÃO ENTRE A TEMPERATURA E A CONSTANTE DE VELOCIDADE DA EQUAÇÃO (3.12) NAS DIFERENTES TEMPERATURAS INVESTIGADAS, R ² =0,89.....	42
FIGURA 4.11 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 125 °C (A) E 155 °C (B).	43
FIGURA 4.12 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 188 °C (A) E 226 °C (B).	44
FIGURA 4.13. CROMATOGRAMA TÍPICO OBTIDO EM UM EQUIPAMENTO DE CLAE-UV (AGILENT) EM TRÊS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA.....	45
FIGURA 4.14 – VARIAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO 3.13 COM A TEMPERATURA. SÍMBOLOS: CONSTANTES DE VELOCIDADE DA EQUAÇÃO (3.16) DETERMINADAS A PARTIR DE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE CONVERSÃO DE 5-CQA EM FUNÇÃO DO TEMPO A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURVA: AJUSTE DA CONSTANTE DE VELOCIDADE COM A EXPRESSÃO DE ARRHENIUS.....	46

FIGURA 4.15 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 96°C (A) E 125°C (B).	47
FIGURA 4.16 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 153°C (A) E 188°C (B)	48
FIGURA 4.17 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE OXIDAÇÃO DO 5-CQA (SÍMBOLOS) REPORTADOS NA LITERATURA (DE MARIA <i>et al.</i> , 1998) E CALCULADOS (CURVAS) COM OS PARÂMETROS CINÉTICOS ENCONTRADOS NESTA INVESTIGAÇÃO NAS TEMPERATURAS DE 100°C (A) E 200°C (B)	49
FIGURA 4.18 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE OXIDAÇÃO DO 5-CQA (SÍMBOLOS) REPORTADOS NA LITERATURA (Murakami <i>et al.</i> , 2004) E CALCULADOS (CURVAS) COM OS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS NESTA INVESTIGAÇÃO NA TEMPERATURA DE 180°C.	50
FIGURA 4.19 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE DURANTE A DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 300 °C A 460 °C	51
FIGURA 4.20 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE DURANTE A SECAGEM NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 60°C A 130 °C	52
FIGURA 4.21 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE ASSUMINDO VARIAÇÃO LINEAR DE TEMPERATURA NO EQUIPAMENTO DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	53
FIGURA 4.22 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE ASSUMINDO VARIAÇÃO EXPONENCIAL DE TEMPERATURA NO EQUIPAMENTO DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS TÍPICAS DURANTE A DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E SECAGEM INDUSTRIAL DE ERVA-MATE	6
TABELA 2.2 – ESTRUTURA DOS ÁCIDOS MONO-CAFEOILQUÍNICOS, DI-CAFEOILQUÍNICOS E TRI-CAFEOILQUÍNICOS (IUPAC, 1976).....	10
TABELA 2.3 – DEGRADAÇÃO DO 5-CQA PURO.....	14
TABELA 2.4 – DEGRADAÇÃO DO 5-CQA PRESENTE EM ALIMENTOS.....	15
TABELA 3.1 – MATRIZ DOS ENSAIOS CINÉTICOS EM SOLUÇÃO (S1-S2), NA PRESENÇA DE VAPOR (AV1-AV4) E OXIGÊNIO (AO1-AO4).	18
TABELA 4.1 – PROPRIEDADES DAS CURVAS PADRÃO PARA O 5-CQA	33
TABELA 4.2 – CORREÇÃO DOS VALORES DE DEGRADAÇÃO DO 5-CQA EM ALIMENTOS SUBMETIDOS A COCÇÃO A 100 °C.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS

- A_i – fator de frequência da reação i (s^{-1})
 E_{a_i} – energia de ativação da reação i ($J\ s^{-1}\ K^{-1}$)
[5-CQA] – concentração de 5-CQA
[3-CQA] – concentração de 3-CQA
[H₂O] – concentração de H₂O (g)
[O₂] – concentração de O₂
[5-CQA]^o – concentração inicial de 5-CQA
[3-CQA]^o – concentração inicial de 3-CQA
[H₂O]^o – concentração inicial de H₂O (g)
[O₂]^o – concentração inicial de O₂
 k_i – constante de velocidade da reação i (s^{-1})
 k_1^* – constante de velocidade definida na Equação (3.3)
 k_2^* – constante de velocidade definida na Equação (3.4)
 k_3^* – constante de velocidade definida na Equação (3.15)
 K_c – constante de equilíbrio
 K_{298} – constante de equilíbrio a 298 K
 M – razão entre as concentrações iniciais de 3-CQA e 5-CQA
 n_i – número de moles da espécie i
 n_i^o – número de moles inicial da espécie i
 R – constante universal dos gases ($8,314\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$)
 t – tempo (s)
 T – temperatura (°C)
 X_{5-CQA} – conversão do 5-CQA
 $X_{e_{5-CQA}}$ – conversão do 5-CQA no equilíbrio

Letras Gregas

- ΔH_{298} – calor da reação de transesterificação a 298 K ($J\ mol^{-1}$)
 ξ – grau de avanço da reação de transesterificação

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 ERVA-MATE.....	2
2.1.1 Características da Planta e Importância Sócio-Econômica.....	2
2.1.2 Composição Química.....	3
2.1.3 Beneficiamento.....	4
2.2 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS.....	6
2.2.1 – CGA e 5-CQA na Erva-Mate.....	10
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CLAE-UV) E ESPECTROFOTOMETRIA.....	12
2.4 ESTABILIDADE DO 5-CQA.....	13
3 - MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 REAGENTES, INSTRUMENTOS DE LABORATÓRIO E EQUIPAMENTOS ..	17
3.2 EXPERIMENTOS CINÉTICOS.....	18
3.2.1 Ensaio em Solução Aquosa.....	18
3.2.2 Ensaio em Atmosferas de vapor de água e oxigênio.....	22
3.3 MODELAGEM CINÉTICA.....	24
3.3.1 Cinética de Decomposição Térmica do 5-CQA na Presença de Vapor d'Água.....	24
3.3.2 Cinética de Oxidação do 5-CQA em Atmosfera Oxidante.....	26
3.3.3 Interpretação de Dados Cinéticos.....	27
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1 VALIDAÇÃO DA CLAE-UV E ESPECTROFOTOMETRIA.....	30
4.2 PERFIS DE TEMPERATURA NO SISTEMA REACIONAL.....	34
4.3 COMPORTAMENTO DO 5-CQA EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	36
4.4 COMPORTAMENTO DO 5-CQA em atmosfera, com vapor.....	40
4.5 COMPORTAMENTO DO 5-CQA em atmosfera, com AR.....	45
4.6 SIMULAÇÃO DO CONSUMO DE 5-cqa POR OXIDAÇÃO QUÍMICA NAS ETAPAS DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E SECAGEM DE ERVA-MATE.....	51
5 - CONCLUSÕES	56
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	57
REFERÊNCIAS	58

1 - INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos científicos (CLIFFORD; MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; NEGISHI *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2007) têm indicado que a erva-mate apresenta altas concentrações de uma família de determinados compostos denominados ácidos clorogênicos (CGA). Dentre os diferentes grupos de ésteres que constituem essa família de aproximadamente 18 espécies identificadas (CLIFFORD *et al.*, 2003), os monoésteres do ácido caféico são os mais abundantes na erva-mate. Nesse grupo particularmente importante, o ácido 5-*o*-cafeoilquínico (5-CQA) destaca-se por ser disponível comercialmente e, principalmente, por corresponder até 25% da massa (CLIFFORD; MARTINEZ, 1990; NEGISHI *et al.*, 2004) do total de CGA encontrados na erva-mate.

A presença de anéis aromáticos, invariavelmente ligados às hidroxilas que caracterizam estruturalmente os fenóis, é uma propriedade importante dos ácidos clorogênicos presentes nos alimentos. De fato, estudos *in vitro* e/ou *in vivo* têm sugerido que compostos fenólicos apresentam ação associada à inibição de certos tipos de tumores (IARC, 1991; TANAKA; MORI, 1995; FERGUSON; HARRIS, 1999) e redução do risco de doenças de origem cardíaca em seres humanos (WEDWORTH; LYNCH, 1995; HERTOGE *et al.*, 1995; VINSON *et al.*, 1995), devido à ação antioxidante (GUGLIUCCI, 1996) dos diferentes tipos de células envolvidas nestas patologias.

Embora a oxidação e degradação térmica do 5-CQA dissolvido em alimentos (DAO; FRIEDMAN, 1992; CHUDA *et al.*, 1998; DE MARIA *et al.*, 1998; TAKENAKA *et al.*, 2006) ou puro (DE MARIA *et al.*, 1998; MURAKAMI *et al.*, 2004; TAKENAKA *et al.*, 2006) tenham sido investigadas, os resultados obtidos até o momento não permitem o conhecimento detalhado da cinética química relacionada à estabilidade deste composto. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar o comportamento cinético do 5-CQA em solução aquosa e nas atmosferas de vapor de água e oxigênio, na faixa de temperatura de 70 e 226 °C. Um modelo cinético foi proposto para descrever a variação da concentração do 5-CQA em função do tempo de reação, nas condições investigadas. As constantes de velocidade obtidas para cada temperatura foram utilizadas para determinação das constantes da equação de Arrhenius.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma breve descrição sobre as características da erva-mate, sua importância sócio-econômica, composição química e beneficiamento. Em particular, as temperaturas e atmosferas envolvidas no processamento da erva-mate são importantes para definição das condições experimentais que serão adotadas para realização dos experimentos, visto que um dos objetivos do trabalho é relacionar o estudo da estabilidade do 5-CQA puro com a possível decomposição deste composto durante as diferentes etapas da manufatura da erva-mate.

Os ácidos clorogênicos presentes na erva-mate serão tratados em detalhe e separadamente das demais espécies mencionadas quando da apresentação da composição química. Essencialmente, esta separação decorre do fato do composto químico objeto desta investigação (5-CQA) pertencer à família dos CGA, como já evidenciado. Visto que a obtenção dos dados cinéticos requeridos nesta investigação envolve a quantificação do 5-CQA utilizado nos ensaios, uma rápida revisão das técnicas de cromatografia líquida (CLAE-UV) e espectrofotometria para análise de CGA também são apresentadas. Dados relacionados ao estudo cinético da estabilidade do 5-CQA obtidos em diferentes condições experimentais disponíveis na literatura serão finalmente reportados a fim de que os mesmos possam ser utilizados para validação dos resultados obtidos nesta investigação.

2.1 ERVA-MATE

2.1.1 Características da Planta e Importância Sócio-Econômica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma planta da família Aquifoliácea (VÁZQUEZ; MOYNA, 1986) pertencente ao gênero *Ilex*, o qual envolve cerca de 600 espécies (WENDT, 2005). Embora equivocadamente receba uma denominação de erva, a planta apresenta característica arbórea. A erva-mate tem ocorrência natural no sul da América do Sul, principalmente regiões subtropicais e temperadas do Brasil, Argentina, e Paraguai (OLIVEIRA; ROTTA, 1985; VIDOR, 2002).

A produção mundial de erva-mate, a qual concentra-se principalmente nos países anteriormente citados (HECK; DE MEJIA, 2007), tem sido elevada de aproximadamente 300 mil toneladas de folha seca por ano (KAWAKAMI;

KOBAYASHI, 1991; GOLDENBERG, 2002) para em torno de 900 mil toneladas em 2001 (FAO, 2002). De acordo com a literatura (HALLOY; REID, 2003), o incremento do comércio internacional deste produto é atestado pela presença de erva-mate comercial em mais de 70 países em todos os continentes, com mais de 60 mil toneladas envolvidas somente no comércio exterior (FAO, 2002) e duplicação do faturamento nos últimos 15 anos. Na América do Sul, o consumo concentra-se nos países produtores, além do Uruguai e Chile, este último em menor escala (EIBL *et al.*, 2000). Em termos globais, os maiores compradores são os Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Japão (CARDOZO JUNIOR, *et al.*, 2007), onde a erva-mate é adquirida como matéria-prima para obtenção de outros produtos industrializados, além das bebidas tipicamente obtidas por infusão das folhas e ramos desidratados (ANTONI, 1999). No todo, considerando a comercialização externa e interna de erva-mate em todo mundo, a atividade tem produzido riquezas da ordem de 1,0 bilhão de dólares anuais (HALLOY; REID, 2003).

Particularmente no caso do Brasil, a importância sócio-econômica da erva-mate é relevante. Estima-se que somente o cultivo desta planta envolva aproximadamente 180 mil propriedades agrícolas, enquanto que a etapa de beneficiamento é realizada em cerca de 600 a 700 pequenas e médias indústrias (MAZUCHOWSKI; RUCKER, 1993; VILCAHUAMAN, 1999). Somadas, as atividades de plantio e beneficiamento têm gerado em torno de 700 mil empregos diretos e indiretos com receita equivalente a R\$ 150-180 milhões (MAZUCHOWSKI; RUCKER, 1993; VILCAHUAMAN, 1999, LOURENÇO *et al.*, 2000). Apesar das estatísticas evidenciarem um grande volume de produção, existem algumas divergências na literatura em relação à quantidade anual produzida no Brasil, a qual acredita-se esteja entre 210 (LOURENÇO *et al.*, 2000) e aproximadamente 270 mil (SEAB, Paraná, 1997) toneladas de produto desidratado.

2.1.2 Composição Química

A composição química da erva-mate pode sofrer alterações significativas decorrentes de alguns fatores determinantes, tais como a idade das árvores e folhas, período de colheita, tipo de planta (nativa ou reflorestada), sistema de cultivo, região de produção e armazenamento (STREIT *et al.*, 2007), constituição do solo (ZAMPIER, 2001; CARDOZO JR. *et al.*, 2007; VALDUGA, 1995), metodologia de

processamento (ZANOELO, *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2006) e condições de armazenagem (MACCARI JR, 2003).

Entretanto, a composição química básica da erva-mate indica a presença de aminoácidos, compostos nitrogenados, ácidos graxos, antocianinas, ácidos terpênicos, álcoois, carboidratos, vitaminas (E, B e C), carotenóides, xantinas e compostos fenólicos (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; MENDES, 2005; CARDOZO JR *et al.*, 2007; HECK; DE MEJIA, 2007). O número de espécies químicas supera ainda esta diversidade de famílias, visto que somente os constituintes voláteis detectados envolvem mais de 250 espécies diferentes (KAWAKAMI; KOBAYASHI, 1991). Dos grupos citados, atenção especial tem sido dada aos fenóis, saponinas e as xantinas, particularmente devido às suas quantidades expressivas presentes na matéria prima *in natura* e à importância farmacológica dos mesmos (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; SALDAÑA *et al.*, 1999; BRAVO *et al.*, 2007).

2.1.3 Beneficiamento

As condições operacionais envolvidas nas etapas de processamento da erva-mate que apresentam potencial de oxidação ou degradação térmica do 5-CQA são particularmente importantes para os objetivos desta investigação. Em primeiro lugar porque indicam as variáveis que devem ser consideradas a fim de que se possa simular a estabilidade do 5-CQA e dos CGA durante o processamento da erva-mate. Além disso, permitem a definição do intervalo de variação destes fatores durante a investigação cinética.

Basicamente, a experiência prévia dos pesquisadores envolvidos nesta investigação apontam a temperatura, o tempo de reação e as concentrações de oxigênio como fatores que podem interferir na cinética de oxidação ou degradação do 5-CQA. Neste sentido, torna-se evidente que dentre as operações envolvidas na indústria ervateira deve-se dar atenção especial as etapas onde ocorrem as temperaturas mais elevadas que aumentam a velocidade das reações. Sendo assim, é possível dizer que o processamento da erva-mate envolve fundamentalmente uma operação de desativação enzimática, seguida de secagem. Reitera-se que o propósito desta secção é definir os intervalos de temperatura, a atmosfera e o tempo envolvido nestas duas etapas de beneficiamento (ver Tabela 2.1). Informações sobre

equipamentos utilizados e demais detalhes serão fornecidos a título puramente ilustrativo.

Na etapa de desativação enzimática, a erva-mate *in natura* é alimentada na cavidade de um cilindro metálico com diâmetro de aproximadamente 3 m e comprimento entre 15 e 20 m (ABITANTE, 2007). Devido a um movimento rotatório a velocidades moderadas e auxílio de pás internas, as folhas são conduzidas até a extremidade oposta. O tempo de residência total do material no equipamento pode variar de 2 (SCHMALKO; MACIEL; DELFEDERICO, 2003) a 8 minutos (ESMELINDRO *et al.*, 2002). Durante a passagem das folhas e ramos no cilindro, ocorre o contato da erva-mate com chamas de combustão de lenha a temperaturas que variam de 300-350 °C (SCHMALKO *et al.*, 1997) a 400-460 °C (NUÑEZ; KÄNZIG, 1995). Entretanto, na saída do cilindro as temperaturas são relativamente inferiores, particularmente da ordem de 65 °C (ESMELINDRO *et al.*, 2002). As altas temperaturas encontradas no equipamento são responsáveis pela desativação das peroxidases e polifenoloxidasas encontradas na erva-mate, as quais, em caso contrário atuariam no sentido de provocar alterações sensoriais e de cor ao produto. Neste equipamento também ocorre uma pré-secagem do material de valores de $60 \pm 5\%$ para valores em torno de $20 \pm 15\%$ em base úmida (ZANOELO *et al.*, 2003).

O produto retirado do equipamento responsável pela desativação enzimática e pré-secagem é alimentado em um secador que reduz o teor de umidade das folhas a valores inferiores a 10% (ABITANTE, 2007). Na execução desta operação, utilizam-se freqüentemente secadores contínuos rotativos ou de esteira, com temperaturas que tipicamente variam entre aproximadamente 60 e 130 °C (NUÑEZ; KÄNZIG, 1995; SCHMALKO; SCIPIONI; FERREYRA, 2005; ZANOELO, 2005; ZANOELO *et al.*, 2007; ABITANTE, 2007). Valores externos ao intervalo de temperatura acima apresentado podem ser eventualmente encontrados (NUÑEZ; KÄNZIG, 1995; SCHMALKO; SCIPIONI; FERREYRA, 2005), porém são pouco usuais. Ambos os secadores operam tipicamente com eficiências de aproximadamente 11%, o que equivale a um consumo médio de lenha de 2,2 toneladas por tonelada de erva-mate desidratada (ZANOELO *et al.*, 2007). O tempo de secagem depende do tipo de secador, porém pode ser de até aproximadamente 4 horas (ABITANTE, 2007).

TABELA 2.1 – CONDIÇÕES OPERACIONAIS TÍPICAS DURANTE A DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E SECAGEM INDUSTRIAL DE ERVA-MATE

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Atmosfera
Desativação	300-460	120-480	Gases de combustão de lenha
Secagem	60 -130	14400	Ar ou gases de combustão

2.2 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Convém inicialmente esclarecer que os CGA são caracterizados pela presença de apenas um grupo fenólico em sua estrutura molecular, o que os define como fenóis simples e não polifenóis, como eventualmente são reportados na literatura. De qualquer forma, a função dos CGA nas plantas onde estão presentes, assim como suas propriedades químicas são similares aos demais compostos fenólicos. Neste sentido, primeiramente é apresentada uma revisão das características dos fenóis em geral, e em seguida são tratadas em detalhes as especificidades dos CGA e do 5-CQA em particular.

Os compostos fenólicos também são conhecidos como metabólitos secundários, pois exercem funções fundamentais nas plantas, agindo principalmente na defesa destas contra mudanças do ambiente (BOUDET, 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004). Atuam também, contra o ataque de agentes patogênicos e herbívoros, e na absorção de luz, promovendo a relação simbiótica com os microrganismos para a fixação do nitrogênio (WILDMAN, 2001). No que se refere às propriedades químicas, pode-se dizer que a maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob a forma de ésteres solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção na região do UV, são instáveis principalmente em altas temperaturas, em meio básico e em valores de pH extremos, originando misturas de seus isômeros de posição (SIMÕES *et al.*, 2004).

Dentre os compostos fenólicos encontrados em plantas incluem-se os fenóis, os flavonóides, cumarinas, tocoferóis, ácidos orgânicos multifuncionais e derivados de ácidos cinâmicos (NACZK; SHAHIDI, 2004; DECKER, 1995). Os ácidos cinâmicos, como será visto a seguir, dão origem aos CGAs quando combinados a outras espécies químicas e acumulam-se em níveis bastante significativos nas plantas. Em especial, estes compostos podem participar de reações químicas e

bioquímicas com açúcares, aminas, alcalóides, terpenóides e ácidos orgânicos (quínico, shiquímico, tartárico, málico e malônico) (RHODES, 1994). De fato, como será observado, é a combinação entre certos ácidos cinâmicos, particularmente hidroxicinâmicos, e quínico que origina os CGA, objetos da presente investigação.

Os ácidos hidroxicinâmicos são os que mais ocorrem nas plantas (HAN; SHEN; LOU, 2007; MANACH *et al.*, 2004; CLIFFORD, 1999). Eles apresentam diferentes conformações das hidroxilas e metoxilas nos anéis aromáticos, sendo que os mais comuns são os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico (MATTILA; HELLSTRÖM, 2007). Na FIGURA 2.1 estão representadas as formas estruturais dos ácidos hidroxicinâmicos. Assim como outros compostos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos são acumulados na estrutura vacuolar das plantas (composta por solução aquosa de substâncias minerais e orgânicas) e no apoplasto (TAKAHAMA, 2004; AL-FARSI; LEE, 2008; FORSYTH, 1964; NACZK; SHAHIDI, 2004). Enquanto os compostos fenólicos permanecem nos vacúolos, onde não há presença de enzimas, os mesmos apresentam maior estabilidade. Entretanto, na ocorrência de rupturas, os tonoplastos permitem a difusão dos substratos e, por consequência ocorrem reações de oxidação destes compostos através da ação das polifenoloxidasas (FORSYTH, 1964). O mesmo fenômeno favorece a exposição dos fenóis a atmosferas ricas em oxigênio, que pode contribuir para a oxidação química destes compostos.

Dentre os ácidos hidroxicinâmicos, o ácido caféico é o mais comum em alimentos e quando apresenta ligação éster com o ácido quínico forma o ácido da família CGA conhecido como ácido 5-*o*-cafeoilquínico (HAN; SHEN; LOU, 2007; MATTILA; HELLSTRÖM, 2007; MANACH *et al.*, 2004), cuja formação e estrutura encontram-se na FIGURA 2.2.

De acordo com De Maria e Moreira (2004) o termo CGA parece ter sido introduzido em 1846 para designar um composto fenólico com função ácida, de estrutura desconhecida na época, que conferia cor verde ao meio aquoso levemente alcalino e exposto ao ar. Em 1907 este ácido foi isolado na forma de um complexo cristalino, denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. A estrutura química para este composto foi estabelecida por Fischer como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como ácido 5-*o*-cafeoilquínico). Mais tarde, outros compostos fenólicos ácidos foram isolados, caracterizados quanto à

estrutura química e agrupados na mesma família (CLIFFORD; JOHNSTON; KNIGHT; KUHNERT, 2003).

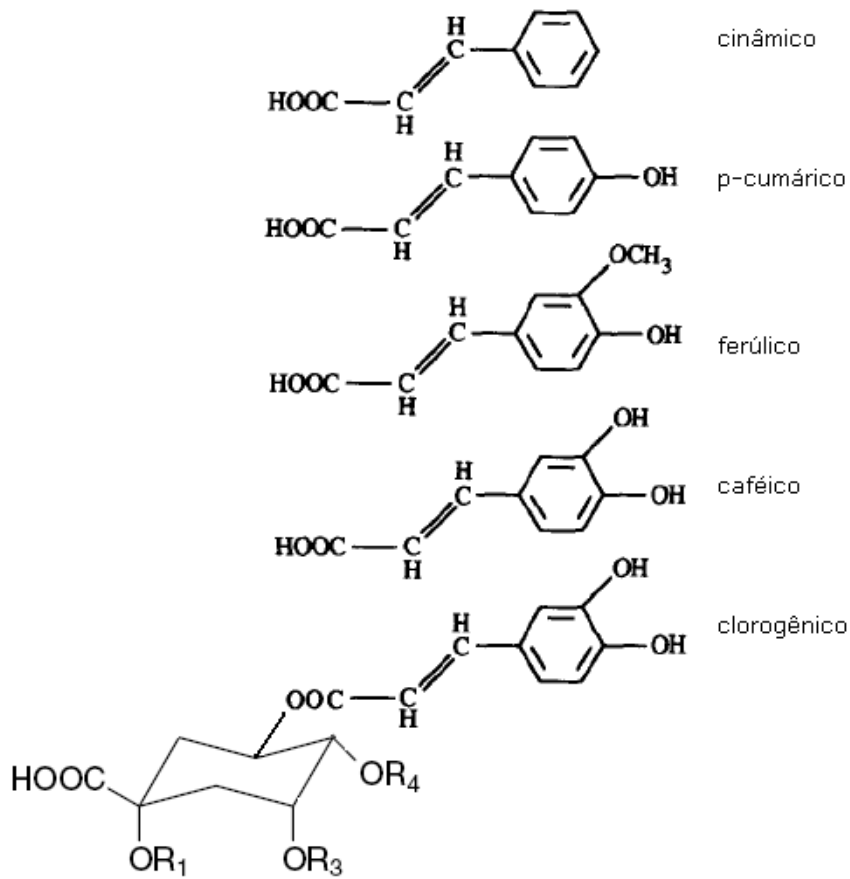


FIGURA 2.1 – ESTRUTURAS DOS ÁCIDOS HIDRÓXICINÂMICOS. FONTE: ADAPTADO DE LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA (1995)

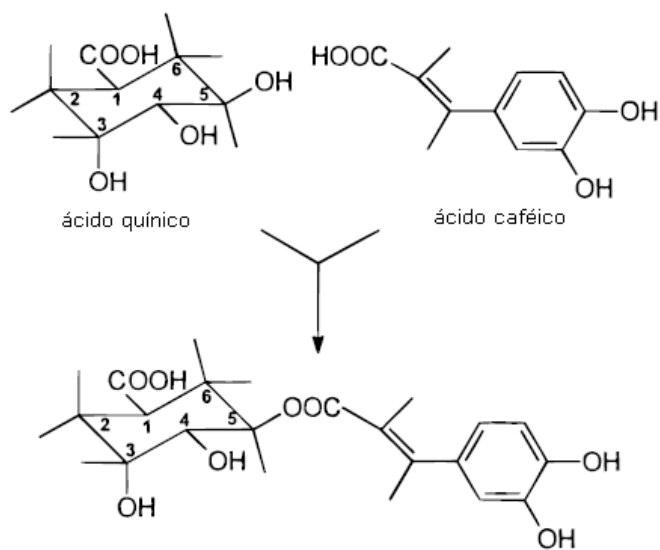


FIGURA 2.2 – ESTRUTURA DO ÁCIDO 5-O-CAFFEOILQUÍNICO FONTE: ADAPTADO DE CLIFFORD *et al.* (2008).

Atualmente, os CGA são caracterizados como uma família de ésteres formados entre certos ácidos *trans*-cinâmicos e o ácido quínico (FIGURA 2.3). De forma geral os ácidos clorogênicos podem ser subdivididos em grupos de monoésteres do ácido caféico (CQA), ácido *p*-cumárico (*p*CoQA) e ácido ferúlico (FQA); di, tri e tetra-ésteres do ácido caféico, respectivamente denominados diCQA, triCQA e tetraCQA; combinação de di-ésteres do ácido caféico e ferúlico (CFQA) e de di-ésteres do ácido caféico e sinápico (CsiQA); e combinações de ésteres do ácido caféico e de ácidos oxálicos, succínicos e glutáricos (CLIFFORD, 1999; CLIFFORD, 2000). Para cada grupo destes compostos existe um certo número de isômeros identificados. Basicamente estes isômeros são formados devido as diferentes posições de esterificação por parte dos grupos acilo. Com o auxílio das estruturas apresentadas na FIGURA 2.3, a Tabela 2.2 apresenta resumidamente os CGA identificados na literatura (CLIFFORD, 2000).

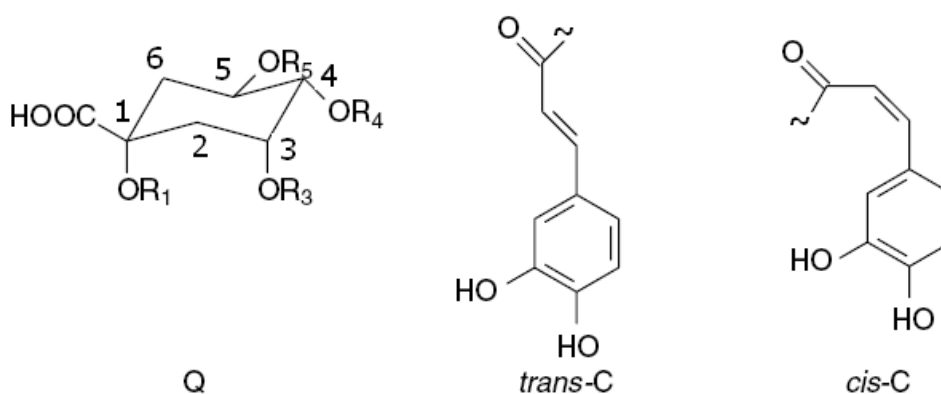


FIGURA 2.3 – ESTRUTURA DO ÁCIDO QUÍNICO (Q) E CAFFEYOIL (C) *cis* e *trans*
 FONTE: ADAPTADO DE CLIFFORD *et al.* (2008).

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm apontado que os CGA presentes nos alimentos apresentam ações terapêuticas no combate a inúmeras doenças de grande incidência em populações humanas modernas (KIKUGAWA *et al.*, 1983; STICH; ROSIN, 1984; SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005; FILIP *et al.*, 2000; VANDERJAGT *et al.*, 2002). Os efeitos benéficos do CGA no combate a doenças coronárias (WEDWORTH; LYNCH, 1995; HERTOOG *et al.*, 1995; VINSON *et al.*, 1995; GUGLIUCCI, 1996; SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) e a vários tipos de carcinomas (IARC, 1991; TANAKA; MORI, 1995; FERGUSON; HARRIS, 1999) são os de maior evidência na literatura. Normalmente a ação dos CGA é preventiva e de inibição de formação de substâncias carcinogênicas e mutagênicas

(KIKUGAWA *et al.*, 1983; STICH; ROSIN, 1984), ou de outra forma maléfica, como as lipoproteínas de baixa densidade (GUGLIUCCI, 1996). A maioria dos resultados terapêuticos atribuídos aos CGA é provavelmente devido à ação antioxidante destes compostos (FILIP *et al.*, 2000; VANDERJAGT *et al.*, 2002; RICE-EVANS *et al.*, 1995), a qual se deve ao seu alto potencial como agentes redutores. Os CGA atuam como doadores de hidrogênio, agindo sobre o oxigênio singlete de forma a retorna-lo à forma fundamental, e como quelantes de metais (TSAO; DENG, 2004). Devido a esta última propriedade, os ácidos hidroxycinâmicos formam complexos com Fe que, segundo a literatura, tem prevenido Alzheimer (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006).

TABELA 2.2 – ESTRUTURA DOS ÁCIDOS MONO-CAFEOILQUÍNICOS, DI-CAFEOILQUÍNICOS E TRI-CAFEOILQUÍNICOS (IUPAC, 1976)

Abreviação	R1	R3	R4	R5
1-O-CQA	C	H	H	H
3- O-CQA	H	C	H	H
5- O-CQA	H	H	H	C
4- O-CQA	H	H	C	H
1,3-di- O-CQA	C	C	H	H
1,4-di- O-CQA	C	H	C	H
1,5-di- O-CQA	C	H	H	C
3,4-di- O-CQA	H	C	C	H
3,5-di- O-CQA	H	C	H	C
4,5-di- O-CQA	H	H	C	C
1,3,4-tri- O-CQA	C	C	C	H
1,3,5-tri- O-CQA	C	C	H	C
1,4,5-tri- O-CQA	C	H	C	C
3,4,5-tri- O-CQA	H	C	C	C

2.2.1 – CGA e 5-CQA na Erva-Mate

A biodisponibilidade dos CGA é significativa em inúmeros alimentos de origem vegetal (PRATT; BIRAC, 1979; DE MARIA *et al.*, 1999; SAKAKIBARA *et al.*, 2003; CLIFFORD; JOHNSTON; KNIGHT; KUHNERT, 2003; MANACH *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; STALMACH *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006). Entretanto, as

quantidades encontradas na erva-mate são efetivamente altas (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; NEGISHI *et al.*, 2004; BIXBY *et al.*, 2005; CROZIER; CLIFFORD; HASHIHARA, 2006; BRAVO *et al.*, 2007), e variam de 2 a 13% da massa seca. (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; FILIP *et al.*, 2001; NEGISHI *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2007).

Resultados apresentados na literatura e reportados na FIGURA 2.4 (BRAVO *et al.*, 2007) demonstram que os ácidos cafeoilquínicos (CQA) são os CGA encontrados em maior proporção na erva-mate, como confirmado por outros autores (BIXBY *et al.*, 2005; CROZIER; CLIFFORD; HASHIHARA, 2006). De fato, da FIGURA 2.4 observa-se que se somados, o 3-CQA, o 4-CQA e o 5-CQA correspondem a aproximadamente 60% do total de CGA, sendo que somente o 5-CQA representa em torno de 15-25% desta quantia (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; NEGISHI *et al.*, 2004).

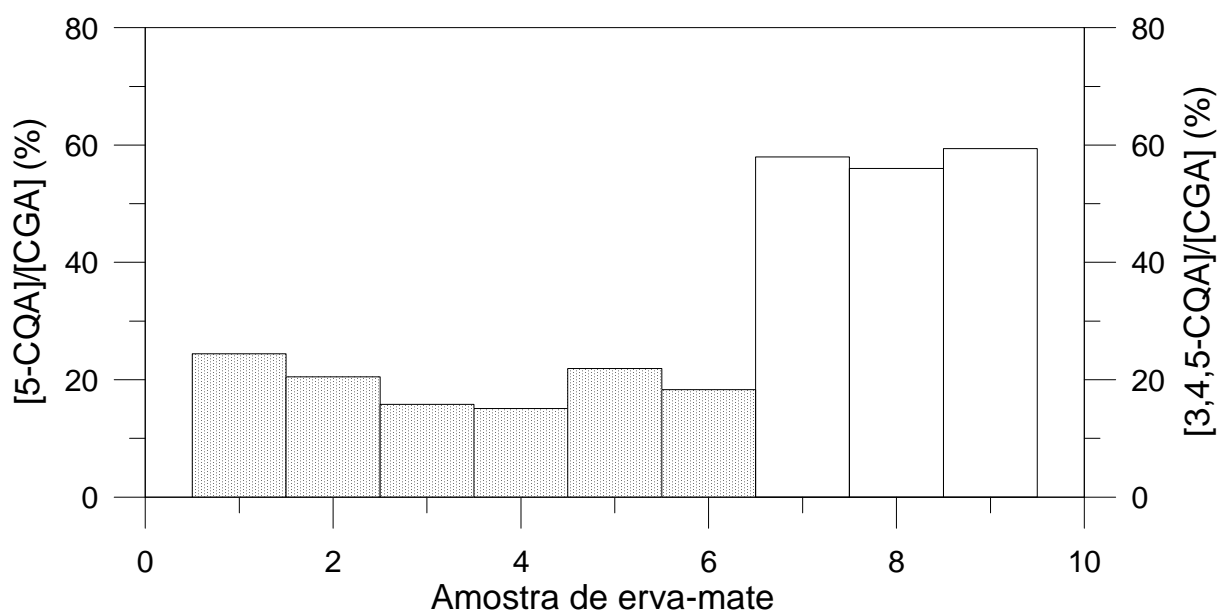


FIGURA 2.4 – QUANTIDADE DE 5-CQA (BARRAS ESCURAS) E CQA TOTAIS (BARRAS CLARAS) EM RELAÇÃO A QUANTIDADE TOTAL DE CGA PRESENTES NA ERVA-MATE. 1-5: CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; 6: NEGISHI *ET AL.*, 2004; 7-9: BRAVO *ET AL.*, 2007.

A quantidade expressiva de 5-CQA nas folhas de erva-mate é mais diretamente evidenciada na FIGURA 2.5, onde observa-se que aproximadamente 0,35% a 2,1% da massa seca deste produto corresponde ao 5-CQA (FILIP *et al.*, 2000; TAMASI *et al.*, 2007; NEGISHI *et al.*, 2004, MAZZAFERA, 1997; ZANOELO *et al.*, 2006; BRAVO *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2006). Considerando que a

quantidade de CGA é aproximadamente cinco vezes maior que a de 5-CQA (FIGURA 2.4), então os teores de CGA na erva-mate seca reportados no início desta seção são compatíveis com os números apresentados na FIGURA 2.5.

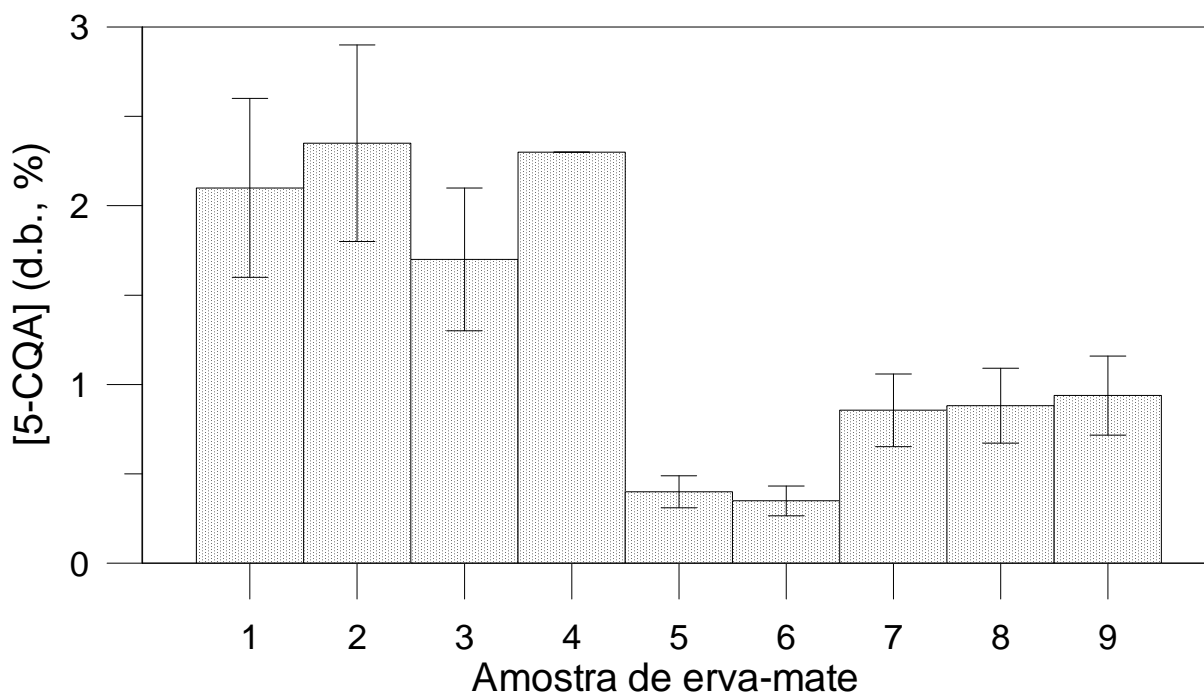


FIGURA 2.5 – CONCENTRAÇÃO DE 5-CQA PRESENTE EM FOLHAS E ERVA-MATE COMERCIAL DA ESPÉCIE ILEX PARAGUARIENIS. 1: FILIP ET AL. (2000); 2-3; TAMASI ET AL., 2007; 4: NEGISHI ET AL., 2004, 5: MAZZAFERA, 1997; 6: ZANOELO ET AL., 2006; 7-9: BRAVO ET AL., 2007; 10: BASTOS ET AL., 2006.

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (CLAE-UV) E ESPECTROFOTOMETRIA

Revisões detalhadas de métodos para detecção e quantificação de CGA são disponíveis na literatura (ex.; DE MARIA; MOREIRA, 2004) e não serão repetidas nesta revisão. Entretanto, uma breve descrição das técnicas de CLAE-UV e espectrofotometria será apresentada, visto que as mesmas foram aplicadas, como descrito no próximo capítulo, para caracterização das curvas cinéticas na presença de H₂O(l,g) e O₂, respectivamente.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais utilizada e apropriada para análises de polifenóis e em especial dos isômeros individuais dos CGA em infusões de vegetais (DE MARIA; MOREIRA, 2004), incluindo a erva-mate (MAZZAFERA, 1997; FILIP *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2006; RIVELLI *et al.*, 2007). Com o desenvolvimento de fases estacionárias contendo

micropartículas houve um grande avanço na análise de CGA através desta técnica. Esse tipo de fase estacionária permitiu a separação completa de todos os isômeros dos CGA (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Dentre as vantagens apresentadas pela CLAE em comparação com outras técnicas destaca-se: i) a presença de duas fases cromatográficas (móvel e estacionária) de interação seletiva com as moléculas da amostra, contra somente uma em cromatografia gasosa; ii) a maior variedade de fases estacionárias que atuam em diversos mecanismos de separação; e iii) a possibilidade de separação de compostos termicamente instáveis (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). A utilização de detectores de arranjo de diodos acoplados ao equipamento de CLAE permite a análise da absorvância em todos os comprimentos de onda da região do UV em uma única corrida cromatográfica, aumentando desta forma a precisão da técnica. Em particular, detectores deste tipo são freqüentemente utilizados para análise de compostos fenólicos e CGA na erva-mate (BASTOS *et al.*, 2006; RIVELLI *et al.*, 2007) e em demais plantas (DE MARIA; MOREIRA, 2004; TAKENAKA *et al.*, 2006; MATTILA; HELSTROM, 2007).

No que se refere ao método analítico espectrofotométrico para análise de CGA é notório que o mesmo apresenta a importante vantagem de ter seu custo consideravelmente baixo, especialmente quando comparado com os métodos cromatográficos. Alguns pesquisadores investigaram matrizes alimentícias em que a espectrofotometria foi aplicada para a determinação dos CGA com sucesso. Destas pode-se citar o café (MOORES *et al.*, 1948; CLIFFORD; WIGHT, 1976; LOWOR; AMOAH, 2008) e em batatas (DAO; FRIEDMAN 1992; FRIEDMAN, 1997). Estudos de cinética enzimática envolvendo o 5-CQA também utilizam com freqüência análises puramente espectrofotométricas (MURATA; KUROKAMI; HOMMA, 1992; NEVES; DA SILVA, 2007).

2.4 ESTABILIDADE DO 5-CQA.

Embora a oxidação e degradação térmica do 5-CQA presente nos alimentos (DAO; FRIEDMAN, 1992; CHUDA *et al.*, 1998; DE MARIA *et al.*, 1998; TAKENAKA *et al.*, 2006) ou puro tenha sido investigada (DE MARIA *et al.*, 1998; MURAKAMI *et al.*, 2004; TAKENAKA *et al.*, 2006), os resultados obtidos até o momento não estão aparentemente em acordo e não permitem o estudo detalhado da cinética química

relacionada à estabilidade deste composto. Entretanto, estes dados são importantes para efeito de validação dos resultados obtidos nesta investigação.

As Tabelas 2.3 e 2.4 apresentam uma compilação de resultados disponíveis na literatura sobre a estabilidade do 5-CQA puro e contido em alimentos, respectivamente.

TABELA 2.3 – DEGRADAÇÃO DO 5-CQA PURO.

Experimento	T (°C)	t (s)	[5-CQA]/[5-CQA] ₀	Referência
1	40	300-360	1	DE MARIA <i>et al.</i> (1998)
2	100	300	0,94	
		900	0,87	
		1800	0,83	
		2700	0,79	
		3600	0,71	
3	220	300	0,84	
		900	0,4	
		1800	<0,001	
		2700	<0,001	
		3600	<0,001	
4	100	3600	0,92	
		7200	0,86	
5	180	900	0,69	
		1800	0,59	
		2700	0,17	
		3600	0,125	
6	100	300	1,04	
		900	1,04	
		1800	1,08	
		3600	1,13	
				MURAKAMI <i>et al.</i> (2004)
				TAKENAKA <i>et al.</i> (2006)

Além das condições de temperatura e tempo, reportadas nas referidas tabelas, o fato do 5-CQA ter sido dissolvido em água ou ter permanecido sólido, quando submetido ao aquecimento, é um fator importante que caracteriza o

ambiente de reação. Este aspecto é particularmente relevante no caso dos dados reportados na Tabela 2.3 (DE MARIA *et al.*, 1998; MURAKAMI *et al.*, 2004; TAKENAKA *et al.*, 2006). Por exemplo, nos experimentos 4 e 6 da Tabela 2.3 uma solução aquosa de 5-CQA havia sido preparada e sua concentração foi monitorada periodicamente durante aquecimento da mesma a 100 °C. Em todos os demais ensaios envolvendo 5-CQA puro, o produto sólido foi exposto às referidas temperaturas em condições atmosféricas (na presença de ar).

TABELA 2.4 – DEGRADAÇÃO DO 5-CQA PRESENTE EM ALIMENTOS.

Experimento	T (°C)	t (s)	[5-CQA]/[5-CQA] _o	Referência
1	100	1800	0,4	DAO; FRIEDMAN (1992)
2	212	2700	0	
3	218	1800	0,54	
4	100	300	0,28	DE MARIA <i>et al.</i> (1998)
5	100	300	0,52	
6	100	300	0,8-0,83	TAKENAKA <i>et al.</i> (2006)
		1800	0,58	
		3600	0,49-0,53	

Em relação aos dados reportados na Tabela 2.4, convém esclarecer inicialmente que foram obtidos a partir do aquecimento de amostras de leguminosas que apresentavam-se na forma de pó (TAKENAKA *et al.*, 2006) ou de pequenos cubos (DAO; FRIEDMAN, 1992; DE MARIA *et al.*, 1998). Com exceção dos experimentos 2 e 3, ambos conduzidos em um forno convencional de microondas, os demais consistiam no aquecimento do alimento por imersão em água na temperatura de ebulição a pressão atmosférica.

Para os propósitos desta investigação, os resultados dos experimentos reportados na Tabela 2.4 devem ser utilizados com muita cautela. Isto decorre do fato de que outros fenômenos importantes ocorrem concomitantemente à provável reação de degradação térmica. A título de exemplo pode-se citar a extração do 5-CQA da matriz vegetal, a qual depende essencialmente da difusão e da solubilidade do 5-CQA no solvente em questão. A transferência de calor é outro aspecto importante, e se de fato o oxigênio apresenta algum efeito cinético, a difusão do mesmo na matriz sólida pode também limitar sensivelmente a oxidação do 5-CQA.

Em face da influência dos fenômenos de transporte de calor e massa sobre os resultados reportados na Tabela 2.4, torna-se evidente a importância da forma e tamanho das amostras, como de certa forma havia sido antecipado no parágrafo anterior. Reações químicas e enzimáticas laterais envolvendo o 5-CQA presente na matriz vegetal também podem interferir significativamente nos resultados, de forma que a perda do composto possa ser decorrente destes processos indesejáveis que não podem ser evitados ou controlados nas condições experimentais adotadas nos referidos experimentos (DAO; FRIEDMAN, 1992; FRIEDMAN, 1997).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, inicialmente são apresentados os reagentes, instrumentos de laboratório e equipamentos envolvidos nos ensaios, cujo propósito é descritivo. Na seqüência são abordados os aspectos relacionados à metodologia experimental e à modelagem matemática envolvidos no estudo cinético da estabilidade do 5-CQA.

3.1 REAGENTES, INSTRUMENTOS DE LABORATÓRIO E EQUIPAMENTOS

O padrão de ácido clorogênico (5-CQA) – $C_{16}H_{18}O_9$ utilizado no estudo foi adquirido da Sigma-Aldrich® Brasil Ltda (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com referência do produto C3878-1G, lote número 096K1722, e pureza de 98%. Ácido acético glacial p.a., metanol (OMNISOLV, grau HPLC), acetonitrila (OMNISOLV, grau HPLC), e ácido fosfórico 85% (14,7 Molar) p.a. foram adquiridos da Merck. Água ultrapurificada Milli-Q, indicada para utilização na preparação de fase móvel para HPLC, porém empregada em todas as demais diluições envolvidas nos experimentos, foi obtida do sistema Millipore A-10.

Os equipamentos utilizados nos ensaios experimentais e analíticos foram: 1) reator de vidro com camisa, com capacidade de 50 mL; 2) isolante de poliuretano; 3) banho ultratermostático (modelo 116C, UNITEMP – Fanem) com circulação de água e controlador microprocessado com capacidade de manter a temperatura com precisão de $\pm 0,1$ °C; 4) agitador magnético (modelo 78HW-1, BIOMIXER); 5) barra magnética lisa 7x20 mm (Fisatom); 6) termopar tipo K (Minipa) previamente calibrado; 7) cronômetro digital (CRONOBIO, SW 2018); 8) micropipeta de 100-1000 μ L (HTL); 9) micropipeta de 20-200 μ L (HTL); 10) ponteiras (Axygen); 11) microtubo para centrifuga de 1,5 mL, tipo eppendorf (Kartell); 12) centrífuga (MiniSpin Plus); 13) balança analítica modelo Adventurer (OHAUS) com precisão de 0,0001 g; 14) filtros de seringa PTFE 0,22 μ m, 13 mm, (Millipore); 15) membrana filtrante descartável de celulose 0,45 μ m (Millipore); 16) seringa de vidro, 250 μ L (Hamilton); 17) estufa sem circulação de ar, modelo Q317B242, com controlador de temperatura on-off (QUIMIS); 18) estufa com circulação de ar, modelo 400-2ND, com controlador de temperatura PID (NOVA ÉTICA); 19) vial com capacidade de 1,8 e de 5 mL; 20) frasco de penicilina de 8,5 mL; 21) conjunto de filtração (Sartorius) com funil,

kitassato e copo de vidro borossilicato, garra metálica e rolha; 22) banho ultra-sônico (Ultraclear 800A, Unique); 23) cubetas de quartzo; 24) balão volumétrico com capacidade de 50 mL; 25) mangueira de silicone; 26) medidor de pH, modelo B 474 (Micronal); 27) espectrofotômetro, modelo UV 1100 (Pró-Análise).

3.2 EXPERIMENTOS CINÉTICOS

Na Tabela 3.1 estão indicados os experimentos realizados para estudar o comportamento cinético do 5-CQA. Como já mencionado, a influência do tempo de reação, da temperatura e do meio reacional foram investigados. Os ensaios em solução aquosa (S1, S2) envolveram duas temperaturas, enquanto que os experimentos realizados na presença de vapor (AV1, AV2, AV3, AV4) e oxigênio (AO1, AO2, AO3, AO4), foram conduzidos em quatro temperaturas.

TABELA 3.1 – MATRIZ DOS ENSAIOS CINÉTICOS EM SOLUÇÃO (S1-S2), NA PRESENÇA DE VAPOR (AV1-AV4) E OXIGÊNIO (AO1-AO4).

Experimento	Tempo máximo (s)	T (°C)	Ambiente	[5-CQA] _o (mg mL ⁻¹)
S1-S2	7200	70-90	H ₂ O (l)	0,1
AV1-AV4	5400	125-226	H ₂ O (g)	0,02
AO1-AO4	5400	96-188	Ar	-

3.2.1 Ensaio em Solução Aquosa

Uma solução contendo 10 mg de 5-CQA dissolvidos em 10 mL de água foi inicialmente preparada. Como será detalhado a seguir, esta solução foi diluída de modo a obter-se uma concentração inicial de 0,1 mg mL⁻¹ de 5-CQA, a qual foi utilizada nos dois experimentos cinéticos conduzidos em solução aquosa nas temperaturas de 70 e 90 °C (ver Tabela 3.1). Nos estudos conduzidos por Takenaka *et al.* (2006) com 5-CQA puro, esta mesma concentração inicial foi adotada.

Preliminarmente a realização dos ensaios experimentais conectou-se o banho ultratermostático ao reator de vidro, o qual promoveu circulação de água aquecida, mantendo constante a temperatura do sistema reacional. Para evitar possíveis perdas térmicas isolou-se o reator com poliuretano.

A fim de permitir que a temperatura do ensaio após a adição do reagente fosse atingida rapidamente, adicionou-se inicialmente 45 mL de água no reator

vazio, o que representava 90% do volume reacional total, mantendo-se este fluido sob agitação até o estabelecimento do equilíbrio térmico. Na seqüência acrescentou-se no reator 5 mL de solução de 5-CQA com concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Uma barra e agitador magnéticos foram utilizados para promover agitação constante da solução, evitando gradientes de concentração e de temperatura no meio reacional. Um termopar do tipo K foi utilizado para monitorar a temperatura em intervalos de 5 minutos. Durante todo o experimento, o reator permaneceu tampado. Na FIGURA 3.1 está representado o sistema utilizado para realização dos experimentos.

A partir do instante em que a solução contendo 5-CQA foi adicionada ao reator, alíquotas de 1 mL de solução reacional foram retiradas em duplicata em intervalos de 20 minutos por um período de 2 horas. As amostras obtidas foram colocadas em microtubos e imediatamente refrigeradas a $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenadas a $-7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise, as quais foram realizadas no dia seguinte aos experimentos. Duas alíquotas de 1 mL também foram retiradas do reator logo após a adição da solução contendo o 5-CQA, as quais foram consideradas amostras obtidas no tempo zero.

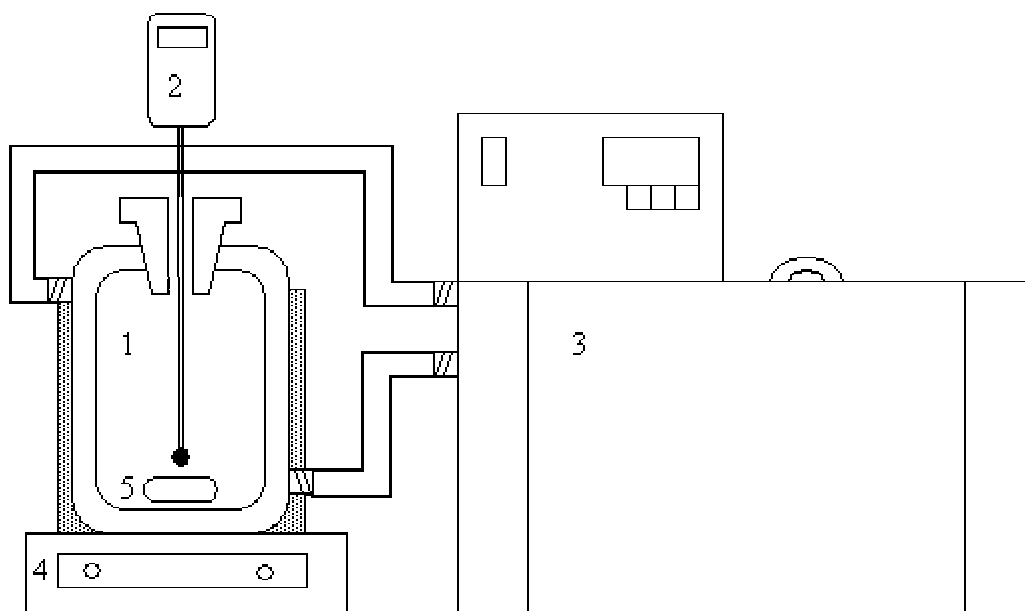


FIGURA 3.1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REATOR (1), TERMOPAR (2), BANHO ULTRATERMOSTÁTICO (3), AGITADOR MAGNÉTICO (4) E BARRA MAGNÉTICA (5).

Preparação da curva padrão e análise das alíquotas por CLAE-UV

Visto que no presente trabalho utilizou-se o próprio padrão do 5-CQA, adquirido comercialmente, não foi necessário extraí-lo de fonte vegetal e, portanto neste experimento não foi utilizado metanol ou etanol como solvente na preparação da curva padrão (MATTILA; HELSTROM, 2007; TAKENAKA *et al.*, 2006; RIVELLI *et al.*, 2007). Basicamente, para construção da curva de calibração, a fim de permitir a posterior quantificação do 5-CQA, partiu-se de uma solução inicial de 10 mg de 5-CQA em 10 mL de água, ou seja, 1 mg mL⁻¹. Com esta solução-mãe foram preparadas as seguintes diluições na faixa de 0,25 a 0,025 mg mL⁻¹, sendo que as alíquotas removidas da solução-mãe foram diluídas em uma solução composta de água Milli-Q + ácido acético glacial (99.5:0.5 v/v) que é a mesma solução que compõe a fase móvel A utilizada nas análises cromatográficas, conforme descrito na seqüência. Cada solução preparada foi injetada em duplicata no equipamento de cromatografia líquida.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram conduzidas utilizando-se dois tipos de equipamentos. Inicialmente utilizou-se um cromatógrafo SHIMADZU, equipado com bomba quaternária LC-10Atpv, com degaseificador DGU-14A-SHIMADZU, e com sistema binário de bombeamento para operação com fluxo isocrático. Um sistema de controle SCL-10Avp-SHIMADZU com válvula de injeção manual Rheodyne com 20 µL de loop foi empregado para injeção da amostra, enquanto que um detector de arranjo de diodos SPD-M10Avp SHIMADZU foi utilizado para quantificação do 5-CQA. Todos os módulos do equipamento foram operados por um computador pessoal através do código computacional CLASS-VP. Durante as corridas cromatográficas manteve-se registrada uma faixa ampla de comprimento de onda (190 a 370 nm) para monitorar a detecção do pico em diferentes comprimentos de onda, embora os dados do espectro do composto tenham sido obtidos unicamente a 323 nm. Nesta condição cromatográfica, o pico referente ao 5-CQA apresentou um tempo de retenção de 16 minutos.

Em um segundo momento foi utilizado um cromatógrafo Varian ProStar, consistindo de bomba ternária 230 SDM, auto-amostrador ProStar 410 e detector de arranjo de fotodiodos ProStar 335 PDA. Todos os módulos do equipamento foram operados por computador pessoal com o programa computacional comercial Varian

Star LC Workstation, versão 6.2. A detecção do 5-CQA foi realizada à 323 nm, monitorando-se as corridas nos comprimentos de onda de 190 a 340nm, com fluxo de 0,7 mL min⁻¹ e injeção de 20 µL de amostras. Neste equipamento, no qual foi utilizado uma fase móvel diferente da empregado no cromatógrafo anterior, o tempo de retenção do 5-CQA foi igual a 6 minutos.

No sistema Shimadzu a eluição em regime isocrático teve como fase móvel uma composição dos solventes A, envolvendo água Milli-Q e ácido acético glacial 99.5:0.5 v/v, e solvente B constituído de metanol. No regime isocrático trabalhou-se com 75% da fase A e 25% da fase B com fluxo de 1 mL min⁻¹. A adoção desta condição cromatográfica foi baseada no trabalho realizado por Bastos *et al.* (2006), sendo que também o equipamento utilizado no estudo do referido autor foi similar ao empregado na presente investigação. Em ambos os casos o registro do espectro do 5-CQA ocorreu a 323 nm, com monitoramento durante tempo de 23 minutos.

No sistema Varian a eluição ocorreu em regime gradiente empregando como fase móvel A uma mistura do solvente (água Milli-Q a 50 mM de ácido fosfórico 85%) e fase móvel B (acetonitrila) nas seguintes proporções: (Condição inicial) 80% de A + 20% B; (0 – 2 min) eluição isocrática 80% de A + 20% B; (2 – 15 min) gradiente linear de 80% A e 20% B até atingir 50% A e 50% B; (15 - 17 min) eluição isocrática 50% A e 50% B; (17 - 19 min) gradiente linear de 50% A e 50% B até 80% A e 20% B; (19 - 21 min) para operação de limpeza e equilíbrio do sistema 80% A e 20% B.

A metodologia aplicada neste segundo equipamento de cromatografia é similar a condições utilizadas em vários trabalhos reportados na literatura (TAKENAKA *et al.*, 2006; RIVELLI *et al.*, 2007; MATTILA; HELSTROM, 2007). Por exemplo, Mattila; Hellstrom (2007) utilizaram eluição gradiente com solução A de 50 mM de H₃PO₄ e solução B de acetonitrila monitorando o 5-CQA a 329 nm. Takenaka *et al.* (2006) utilizaram gradiente linear de 0–50% de acetonitrila em solução aquosa de ácido fosfórico 10 mM com leitura a 326 nm, enquanto Rivelli *et al.* (2007) testaram diferentes fases móveis sendo que a composição que resultou no menor tempo de retenção e melhor resolução foi a que empregou solução aquosa de 0,2% de ácido metafosfórico e acetonitrila (90:20 v/v) com leitura a 330 nm.

As soluções aquosas acidificadas utilizadas na fase móvel foram filtradas a vácuo com uso de sistema filtrante (Sartorius) e filtro de membrana de celulose (Millipore). Após a filtração, estas soluções eram submetidas a um banho ultra-

sônico para remoção de oxigênio e conseqüente eliminação de bolhas, cuja presença sabidamente podem causar interferência nas análises cromatográficas.

A coluna utilizada nos dois equipamentos foi a C18 da Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 μ m).

3.2.2 Ensaio em Atmosferas de vapor de água e oxigênio

Ensaio com vapor de água

Nos ensaios realizados na presença de vapor d'água, 0,5 mL de solução reagente com 0,1 mg mL⁻¹ de concentração foram adicionados em pequenos reatores de vidro de aproximadamente 2 mL. A FIGURA 3.2 representa o esquema do sistema reacional. Os recipientes contendo a solução reacional foram inseridos em uma estufa com controle de temperatura on-off e submetidos a aquecimento, nas temperaturas de 125, 155, 188 e 226 °C. O tempo de reação foi computado somente a partir do instante em que as temperaturas desejadas foram atingidas no reator, o qual foi determinado pelo monitoramento contínuo desta variável com um termopar do tipo K inserido em um dos recipientes. As concentrações de 5-CQA em diferentes tempos de reação foram determinadas através da remoção periódica dos reatores de dentro da estufa, os quais eram imediatamente refrigerados a 0 °C e armazenados a -7°C, para posterior análise em HPLC. Visto que toda a água inicialmente contida nos reatores havia evaporado, à análise cromatográfica somente foi possível através da solubilização do resíduo sólido contido no reator. Em particular, foram adicionados 2,5 mL de água em cada reator, de forma que na inexistência de reação uma concentração de 5-CQA de 0,02 mg mL⁻¹ deveria ser encontrada.

Devido à impossibilidade de utilização dos dois equipamentos de cromatografia líquida especificados na seção anterior, houve a necessidade de envolver um terceiro cromatógrafo para análise das alíquotas de 5-CQA submetidas a aquecimento na presença de vapor. Em especial, estas análises foram conduzidas no cromatógrafo AGILENT HP 1100, equipado com bomba quaternária QualPump G1311A, degaseificador G1322A AGILENT, e sistema binário de bombeamento para operação com fluxo gradiente. Utilizou-se uma válvula de injeção manual Rheodyne com 20 μ L de loop para amostragem, e um detector de arranjo de diodos G1315A AGILENT para quantificação do 5-CQA.

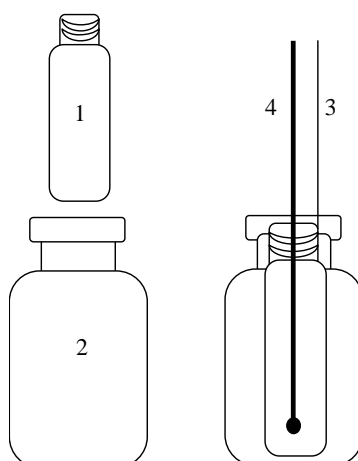


FIGURA 3.2 – ESQUEMA DO SISTEMA CONTENDO AMOSTRA REACIONAL: (1) VIAL, (2) VIDRO DE PENICILINA, (3) ALÇA PARA REMOVER O VIAL, (4) TERMOPAR

O fluxo da fase móvel foi programado para $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. A mesma fase móvel descrita para o regime de eluição gradiente empregado no cromatógrafo Varian foi utilizada neste equipamento, a qual consistia de água Milli-Q a 50 mM de ácido fosfórico 85% e acetonitrila. A coluna utilizada também foi C-18, modelo Zorbax ODS ($4,6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm} \times 5 \mu\text{m}$). Todos os módulos do equipamento foram operados por um computador pessoal através do programa comercial ChemStation A.0901 AGILENT. Durante as corridas cromatográficas manteve-se registrada uma faixa ampla de comprimento de onda (190 a 400nm) para monitorar a detecção do pico em diferentes comprimentos de onda, mas os dados do espectro do composto foram novamente obtidos a 323 nm, sendo que o pico referente ao 5-CQA apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 5 minutos.

Uma nova curva padrão para posterior quantificação do 5-CQA foi obtida partindo-se de uma solução inicial de 5-CQA de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. As áreas dos picos do 5-CQA relativas a concentrações inferiores foram obtidas por preparação e injeção de soluções nas concentrações de 0,03; 0,02; 0,01 e $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$. Cada solução preparada foi injetada em duplicata no equipamento de cromatografia líquida.

Ensaio em atmosfera oxidante

Nestes experimentos pesou-se inicialmente 1 mg de 5-CQA diretamente em pequenos reatores de vidro com volume de aproximadamente 10 mL, como mostra o item 2 da FIGURA 3.2. Os recipientes foram inseridos em uma estufa com circulação

de ar equipada com controlador PID, onde foram expostos a temperaturas de 96, 125, 155 e 188 °C, respectivamente. Após a remoção de cada vaso de reação e subsequente resfriamento, os mesmos receberam 5 mL de água e permaneceram em banho ultra-sônico durante 15 minutos para promover a completa solubilização da amostra em água. Esta solução sofreu agitação vigorosa e então foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água Milli-Q, obtendo-se uma concentração de 0,02 mg mL⁻¹ de 5-CQA na ausência de reação. Na seqüência fez-se a leitura da absorbância das soluções no comprimento de onda de 323nm em espectrofotômetro, utilizando uma cubeta de quartzo de 1×1×2,5 cm³.

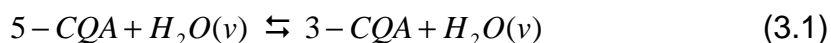
Uma curva de calibração correlacionando a concentração de soluções padrão a absorbância foi obtida a partir de soluções aquosas de 0,02, 0,01, 0,005, 0,003 e 0,002 mg de 5-CQA por mL, a fim de que as concentrações das alíquotas relativas aos ensaios cinéticos com ar pudessem ser determinadas.

3.3 MODELAGEM CINÉTICA

3.3.1 Cinética de Decomposição Térmica do 5-CQA na Presença de Vapor d'Água

Nesta investigação, foi adotada a hipótese que o consumo de 5-CQA na presença de vapor d'água envolve uma reação de transesterificação, na qual o isômero 3-CQA é produzido. Esta hipótese é baseada nos resultados experimentais obtidos, os quais serão apresentados a seguir, e em evidências reportadas na literatura, que serão discutidas no capítulo 4.

Para o propósito do trabalho foi investigada a equação cinética de uma reação reversível e elementar (Reação 3.1), da decomposição térmica do 5-CQA na presença de vapor de água, da forma:



Assumindo excesso de vapor d'água, têm-se uma reação reversível de pseudo-primeira ordem. Neste caso, a variação da concentração do 5-CQA com o tempo é descrita pela Equação (3.2):

$$\frac{d[5-CQA]}{dt} = -k_1[5-CQA] + k_2[3-CQA] \quad (3.2)$$

sendo que k_1 e k_2 são as constantes direta e inversa da reação multiplicadas pela concentração de água no reator, respectivamente:

$$k_1 = k_1^*[H_2O] \quad (3.3)$$

e

$$k_2 = k_2^*[H_2O] \quad (3.4)$$

A fim de que seja possível resolver a Equação (3.2) é necessário inicialmente encontrar uma expressão que correlaciona a variação da concentração do 3-CQA com a concentração do 5-CQA, a qual pode ser obtida pela definição do grau de avanço:

$$\xi = \frac{n_{5-CQA}^o - n_{5-CQA}}{-1} = \frac{n_{3-CQA}^o - n_{3-CQA}}{1} \quad (3.5)$$

Dividindo-se a expressão acima pelo volume e rearranjando-a de forma a obter uma expressão explícita na concentração de 3-CQA têm-se:

$$[3-CQA] = [3-CQA]^o + [5-CQA]^o - [5-CQA] \quad (3.6)$$

a qual substituída em (3.2) resulta:

$$\frac{d[5-CQA]}{dt} = -k_1[5-CQA] + k_2\{[3-CQA]^o + [5-CQA]^o - [5-CQA]\} \quad (3.7)$$

Da definição de equilíbrio, o qual é caracterizado por um estado de inalteração das concentrações de produtos e reagentes, obtém-se uma expressão de k_2 em função da constante direta de velocidade e da constante de equilíbrio, ou seja:

$$K_C = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[3 - CQA]}{[5 - CQA]} \quad (3.8)$$

$$k_2 = \frac{k_1}{K_C} \quad (3.9)$$

Finalmente, definindo-se a razão entre as concentrações iniciais de produto e reagente como $M = [3 - CQA]^0 / [5 - CQA]^0$ e substituindo-se a Equação (3.9) na (3.7) obtém-se a equação diferencial que caracteriza a variação da concentração de 5-CQA em função do tempo de reação:

$$\frac{d[5 - CQA]}{dt} = -k_1[5 - CQA] + \frac{k_1}{K_C} \{M[5 - CQA]^0 + [5 - CQA]^0 - [5 - CQA]\} \quad (3.10)$$

A equação diferencial ordinária representada pela expressão acima é separável e, portanto pode ser facilmente resolvida por integração por substituição, que em função da conversão de 5-CQA resulta em:

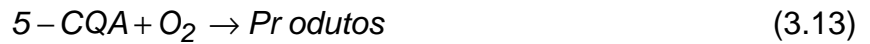
$$\ln \left[\frac{(K_C + 1)(1 - X_{5-CQA}) - (M + 1)}{(K_C + 1) - (M + 1)} \right] = -\frac{k_1(K_C + 1)t}{K_C} \quad (3.11)$$

De modo a gerar uma expressão algébrica simplificada análoga a Equação (3.11), como freqüentemente indicado na literatura (LEVENSPIEL, 2000), da Equação (3.8) é possível definir a constante de equilíbrio (K_C) em função da conversão de 5-CQA no equilíbrio ($X_{e_{5-CQA}}$).

$$-\ln \left[1 - \frac{X_{5-CQA}}{X_{e_{5-CQA}}} \right] = \frac{k_1(M + 1)t}{M + X_{e_{5-CQA}}} \quad (3.12)$$

3.3.2 Cinética de Oxidação do 5-CQA em Atmosfera Oxidante

A possível redução na concentração do 5-CQA em atmosfera oxidante será investigada através de uma reação irreversível de pseudo-primeira ordem, visto o excesso de oxigênio no meio reacional (reação 3.13).



A taxa de oxidação do 5-CQA é representada por uma equação diferencial ordinária separável. A aplicação do método integral para interpretação de dados cinéticos sugere a utilização da equação integrada da taxa para cálculo das constantes de velocidade. Neste sentido, ocorre a necessidade de solução da referida EDO (Equação 3.14), a qual é prontamente obtida por integração da concentração (ou conversão) do 5-CQA no tempo de reação. A Equação (3.16) e (3.17) são as equações algébricas que representam a solução da Equação (3.14) em termos de concentração e conversão do 5-CQA, respectivamente.

$$\frac{d[5 - CQA]}{dt} = -k_3[5 - CQA] \quad (3.14)$$

$$k_3 = k_3^*[O_2] \quad (3.15)$$

$$- \ln \left\{ \frac{[5 - CQA]}{[5 - CQA]^0} \right\} = k_3 t \quad (3.16)$$

$$- \ln(1 - X_{5-CQA}) = k_3 t \quad (3.17)$$

3.3.3 Interpretação de Dados Cinéticos

Para todas as reações elementares a velocidade da reação é correlacionada à temperatura pela lei de Arrhenius (Equação 3.18). Neste sentido, neste trabalho, o efeito da temperatura sobre as constantes de velocidade de reação também será estimado desta forma:

$$k_i = A_i \exp\left[\frac{Ea_i}{R(T + 273)}\right] \quad (3.18)$$

Na Equação (3.12), além da determinação da constante de velocidade através da Equação (3.18), a conversão no equilíbrio, a qual é função de K_c , também depende da temperatura, podendo ser obtida a partir da forma integrada da expressão de van't Hoff, apresentada na Equação (3.19).

$$Xe_{5-CQA} = \frac{K_c}{1 + K_c} = \frac{K_{298} \exp\left[\frac{-\Delta H_{298}}{R} \left(\frac{1}{T + 273} - \frac{1}{298}\right)\right]}{1 + K_{298} \exp\left[\frac{-\Delta H_{298}}{R} \left(\frac{1}{T + 273} - \frac{1}{298}\right)\right]} \quad (3.19)$$

Em resumo, o modelo cinético da degradação térmica do 5-CQA na presença de vapor d'água (Equação 3.12) envolve quatro parâmetros ajustáveis (A_1 , Ea_1 , K_{298} , ΔH_{298}), enquanto que o modelo apresentado nesta dissertação para descrever a oxidação do ácido 5-CQA (Equação 3.17) envolve apenas dois parâmetros (A_3 e Ea_3).

No caso da Equação (3.17) apenas o método integral será utilizado para ajuste dos parâmetros. Neste procedimento, se a reação for de fato de pseudo-primeira ordem, dados de k_3 a diferentes temperaturas serão obtidos através de diagramas de $-\ln(1-X_{5-CQA})$ versus t , os quais serão bem representados por retas que passam pela origem do sistema de coordenadas com coeficiente angular igual a constante de velocidade (k_3). Os valores de k_3 serão correlacionados a temperatura a partir da equação linearizada de Arrhenius para obtenção de A_3 e Ea_3 .

Os parâmetros A_1 e Ea_1 do modelo cinético que caracteriza a degradação térmica do 5-CQA (reação na presença de vapor d'água) serão estimados através de dados da constante de velocidade k_1 a diferentes temperaturas empregando também a expressão de Arrhenius. Entretanto, neste caso as constantes de velocidade correspondem aos coeficientes angulares em diagramas de $-\ln[1-(X_{5-CQA}/Xe_{5-CQA})]$ versus t . As conversões de equilíbrio, necessárias para construção destas retas no intervalo de temperaturas investigado, serão determinadas através dos resultados experimentais para tempos maiores ou iguais a 30 minutos. De fato, será observado que atingido este tempo de reação, não ocorre mais variação das concentrações de

5-CQA e, portanto um estado de equilíbrio é atingido. Estimativas de K_{298} e ΔH_{298} serão encontradas através do cálculo da constante K_c para diferentes conversões no equilíbrio (Equação 3.20) e posterior utilização da equação integrada de van't Hoff.

$$K_c = \frac{X_{e_{5-CQA}}}{1 - X_{e_{5-CQA}}} \quad (3.20)$$

4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo os resultados são apresentados e discutidos na mesma seqüência em que os diferentes ensaios cinéticos foram reportados no capítulo anterior, porém incluindo a descrição das evidências experimentais através dos modelos cinéticos propostos, quando obviamente algum efeito significativo dos fatores tempo e temperatura tiver sido observado. A validação das técnicas analíticas de detecção e quantificação do 5-CQA e os perfis de temperatura ao longo do tempo nos diferentes meios reacionais são inicialmente apresentados.

4.1 VALIDAÇÃO DA CLAE-UV E ESPECTROFOTOMETRIA

Em ambos as técnicas de quantificação empregadas neste estudo, medidas do espectro de absorção de luz do 5-CQA foram necessárias. Neste sentido, inicialmente convém apresentar os resultados de absorbância de uma solução de 5-CQA em diferentes comprimentos de onda. Esta informação é fundamental para corroborar evidências experimentais reportadas na literatura que atestam absorbância máxima dos CGA e 5-CQA na faixa de 320-330 nm (CLIFFORD; WIGHT, 1976; DAO; FRIEDMAN 1992; MURATA; KUROKAMI; HOMMA, 1992; FRIEDMAN, 1997; LOWOR; AMOAH, 2008; NEVES; DA SILVA, 2007). A definição do comprimento de onda de máxima absorbância é fundamental para quantificar o composto investigado em misturas envolvendo puramente espectrofotometria, pois nesta situação as incertezas decorrentes da possível presença de outros compostos são minimizadas. Mesmo no caso em que ocorra uma separação prévia através da passagem da mistura investigada por uma coluna cromatográfica, o registro da absorbância máxima minimiza a interferência de ruídos.

Uma análise rápida dos resultados apresentados na FIGURA 4.1 prontamente evidencia uma máxima absorbância do 5-CQA a 323 nm. Em função destes resultados todas as análises cromatográficas por CLAE-UV e espectrofotométricas realizadas nesta investigação foram conduzidas no comprimento de onda acima especificado.

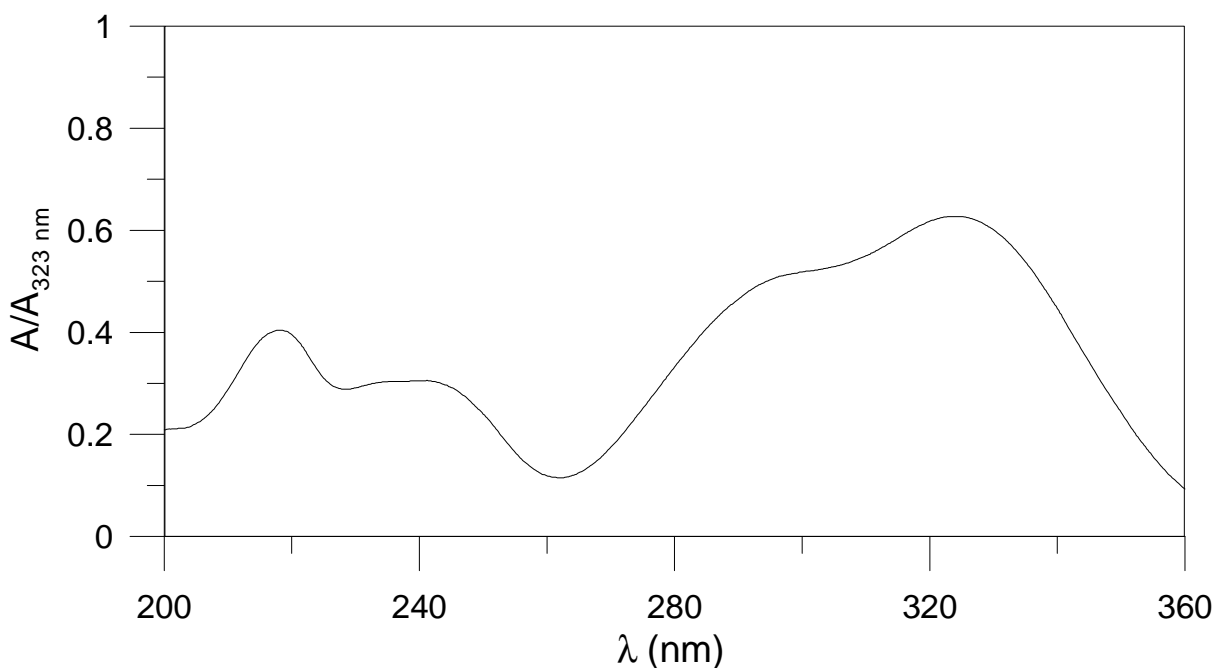


FIGURA 4.1 – ABSORBÂNCIA RELATIVA DO 5-CQA EM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA.

Definido o comprimento de onda de máxima absorvância do 5-CQA, curvas padrão, construídas conforme metodologia já apresentada, foram obtidas nos três cromatógrafos utilizados, e também em um espectrofotômetro. Convém, lembrar que CLAE-UV foi utilizada para obtenção das curvas cinéticas de consumo de 5-CQA em solução aquosa e na presença de vapor, enquanto que análises puramente espectrofotométricas foram utilizadas para quantificação da [5-CQA] quando o mesmo foi submetido a aquecimento em atmosfera oxidativa (O₂). A razão para aplicação de métodos diferentes de análise tem relação íntima com a absorvância dos produtos das reações em diferentes meios reacionais e será analisada somente após a apresentação dos resultados cinéticos.

As FIGURAS 4.2A, 4.2B e 4.3 reportam as curvas padrão obtidas por injeção das soluções com concentrações conhecidas de 5-CQA nos equipamentos Shimadzu, Varian e Agilent, respectivamente. Em todos os casos foi observada uma relação linear entre a concentração e a área dos picos cromatográficos relativos ao 5-CQA (únicos presentes), como já esperado. Os coeficientes de determinação referentes a cada curva são apresentados na Tabela 4.1 e evidenciam a correta descrição dos resultados experimentais através de um modelo linear com origem no sistema de coordenadas. As áreas referentes ao tempo de retenção do 5-CQA obtidas nos ensaios cinéticos foram utilizadas nas expressões ajustadas aos

resultados experimentais das FIGURAS 4.2 e 4.3 para estimativa das concentrações de 5-CQA em solução aquosa e na presença de vapor, respectivamente.

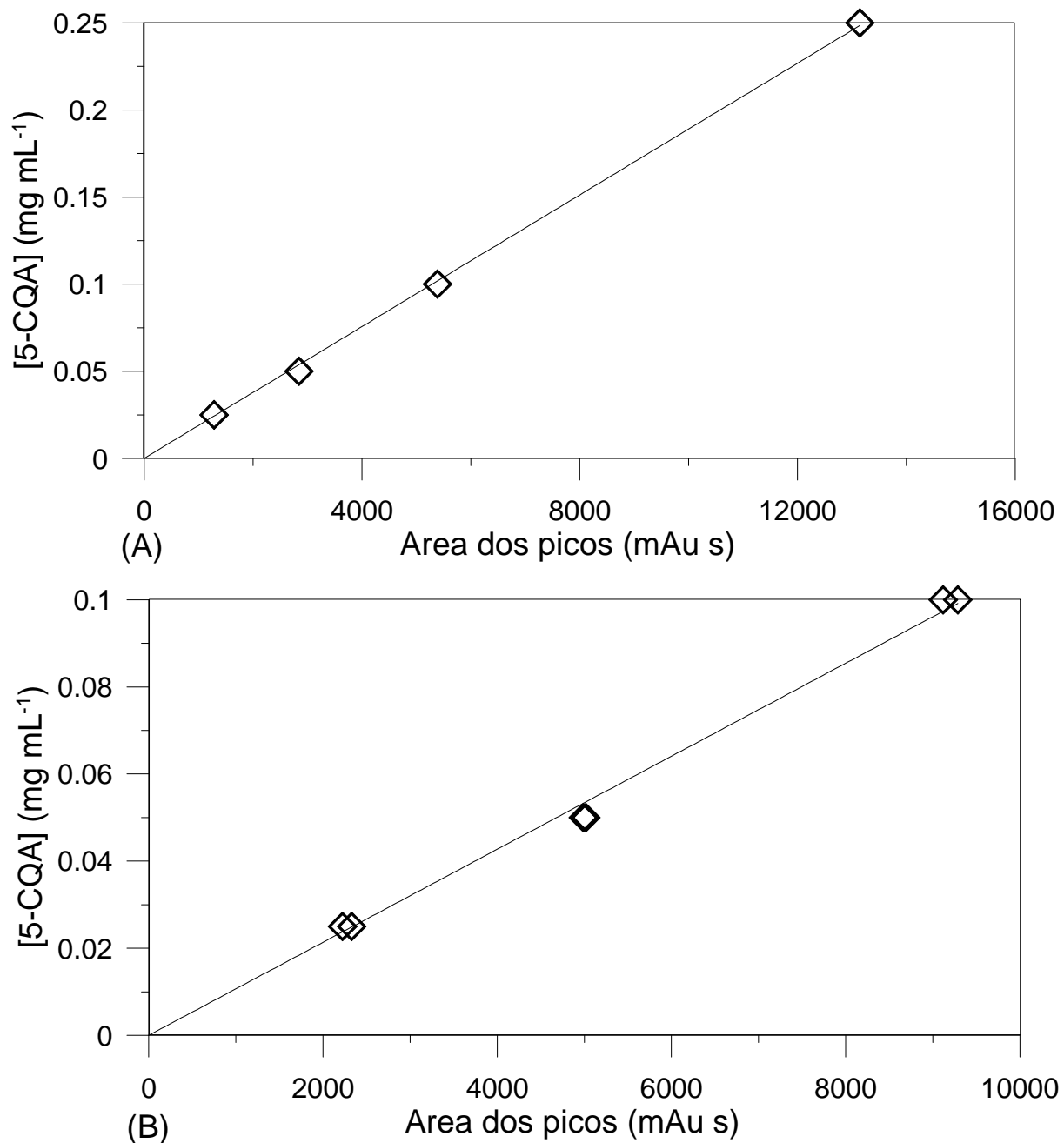


FIGURA 4.2 – CURVAS PADRÃO NOS CROMATÓGRAFOS SHIMADZU (A) E VARIAN (B) A 323 NM.

A curva padrão obtida no espectrofotômetro e representada na FIGURA 4.4 pode ser utilizada com um propósito mais interessante do que as curvas similares obtidas nos cromatógrafos. Por esta razão, que será agora entendida, as concentrações de 5-CQA são reportadas em unidades diferentes das utilizadas nas

FIGURAS 4.2 e 4.3. Na realidade, os dados reportados na FIGURA 4.4 podem ser empregados para calcular o coeficiente de absorvidade molar do 5-CQA, cujo valor é um indicativo da idoneidade, senão da pureza, do padrão de 5-CQA adquirido no comércio. De acordo com a Equação (4.1) o coeficiente de absorvidade molar pode ser prontamente obtido a partir dos resultados experimentais de concentração molar de 5-CQA em função da absorbância apresentados na FIGURA 4.4.

$$[5-CQA] = \frac{1}{\epsilon l} A \quad (4.1)$$

TABELA 4.1 – PROPRIEDADES DAS CURVAS PADRÃO PARA O 5-CQA

Regime de eluição	Equipamento	Concentração (mg mL ⁻¹)	R ²
Isocrático	HPLC Shimadzu	0,25 – 0,025	0,9996
Gradiente	HPLC Varian	0,1 – 0,025	0,9987
Gradiente	HPLC Agilent	0,03 – 0,005	0,9979
-	Espectrofotômetro	0,01 – 0,002	0,9999

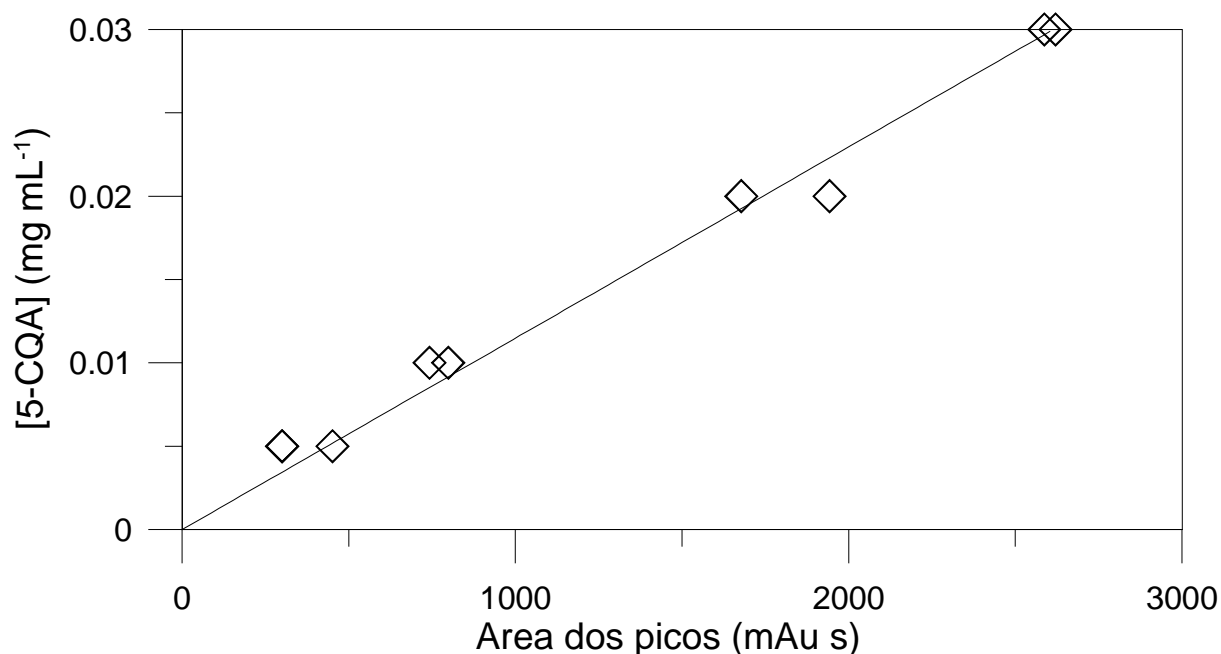


FIGURA 4.3 – CURVA PADRÃO NO CROMATÓGRAFO AGILENT A 323 NM.

Como esperado, a reta representada na FIGURA 4.4 revela que o modelo de Beer-Lambert (Equação 4.1) adequadamente descreve a absorção de luz pelo

composto investigado em diferentes concentrações no comprimento de onda de 323 nm. A validade deste resultado é atestada pelo coeficiente de determinação próximo a unidade, apresentado na Tabela 4.1. O coeficiente angular da referida reta, no presente caso determinado por mínimos quadrados, é simplesmente igual a ϵ^{-1} , dado que a cubeta de quartzo utilizada nos ensaios espectrofotométricas apresentava uma largura de 1 cm (l). Uma comparação entre o coeficiente de absorvidade molar do 5-CQA calculado nesta investigação ($\epsilon=2,7\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e reportado na literatura ($\epsilon=2,0\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (TRUGO, MACRAE, 1984) indica a validade do produto e da metodologia utilizada na obtenção da curva padrão para o 5-CQA no espectrofotômetro. As diferenças residuais são atribuídas as incertezas no cálculo do parâmetro ϵ e as pequenas diferenças de comprimento de ondas adotados para obtenção dos valores acima reportados.

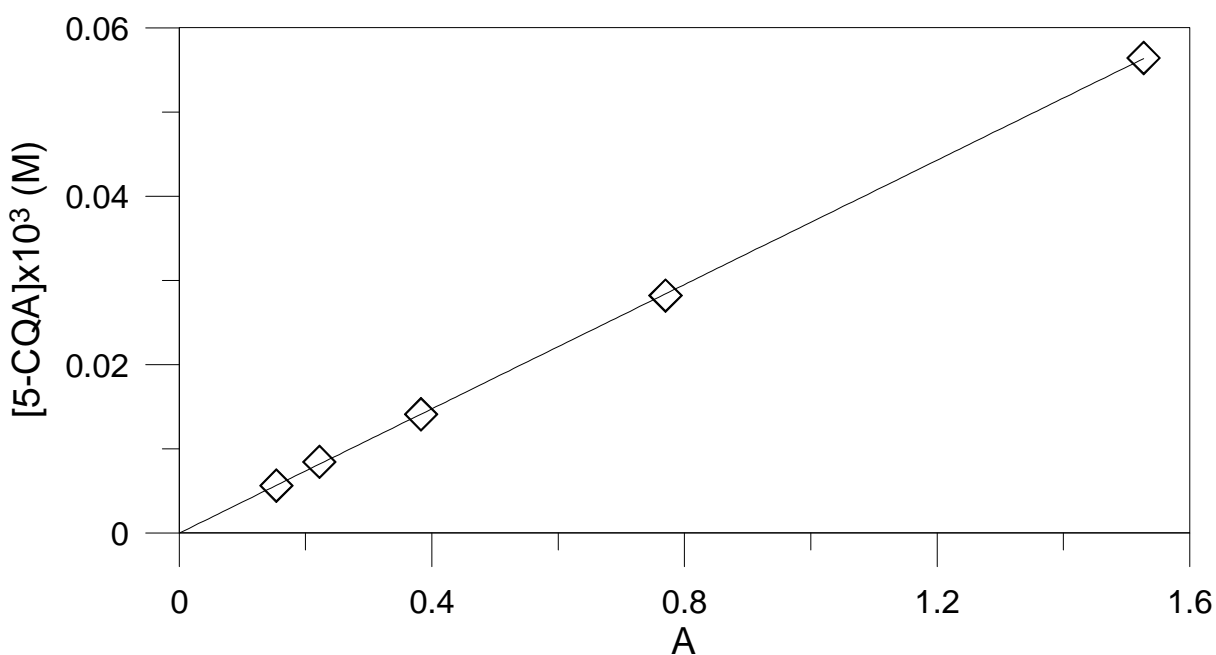


FIGURA 4.4 – CURVA PADRÃO NO ESPECTROFOTÔMETRO A 323 NM.

4.2 PERFIS DE TEMPERATURA NO SISTEMA REACIONAL

As FIGURAS 4.5, 4.6 e 4.7 reproduzem os históricos de temperatura durante os ensaios cinéticos em solução aquosa, na presença de vapor d'água e oxigênio, respectivamente. As medidas de temperatura evidenciam que todos os experimentos foram conduzidos em condições aproximadamente isotérmicas.

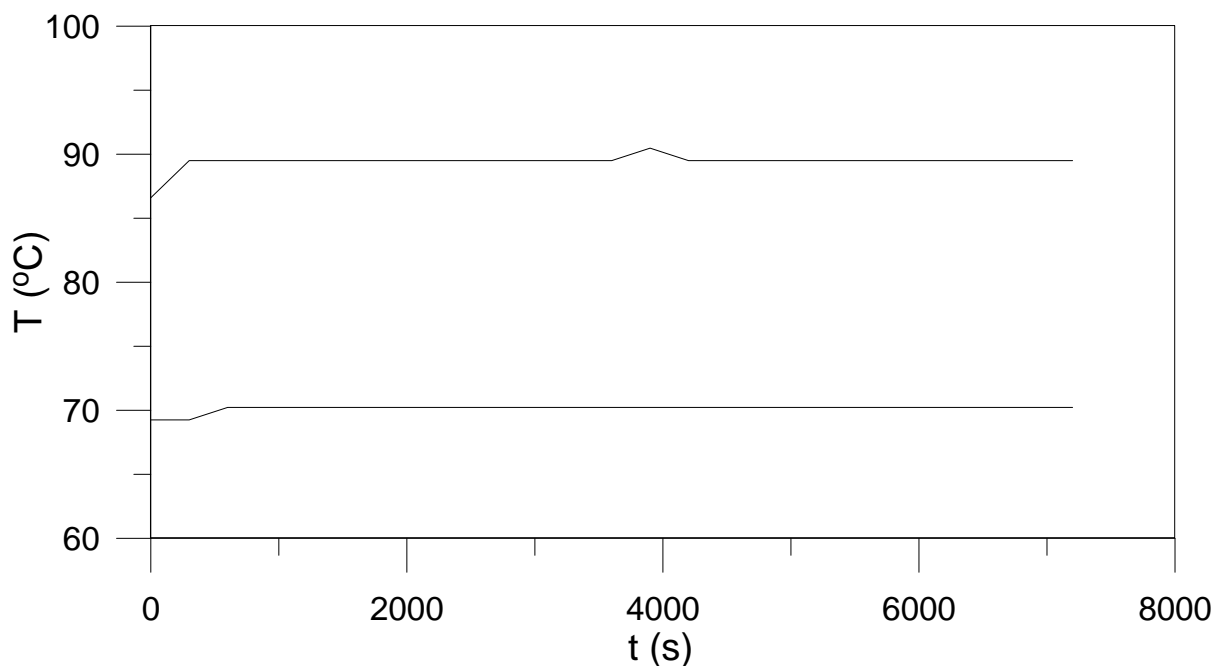


FIGURA 4.5 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM SOLUÇÃO AQUOSA

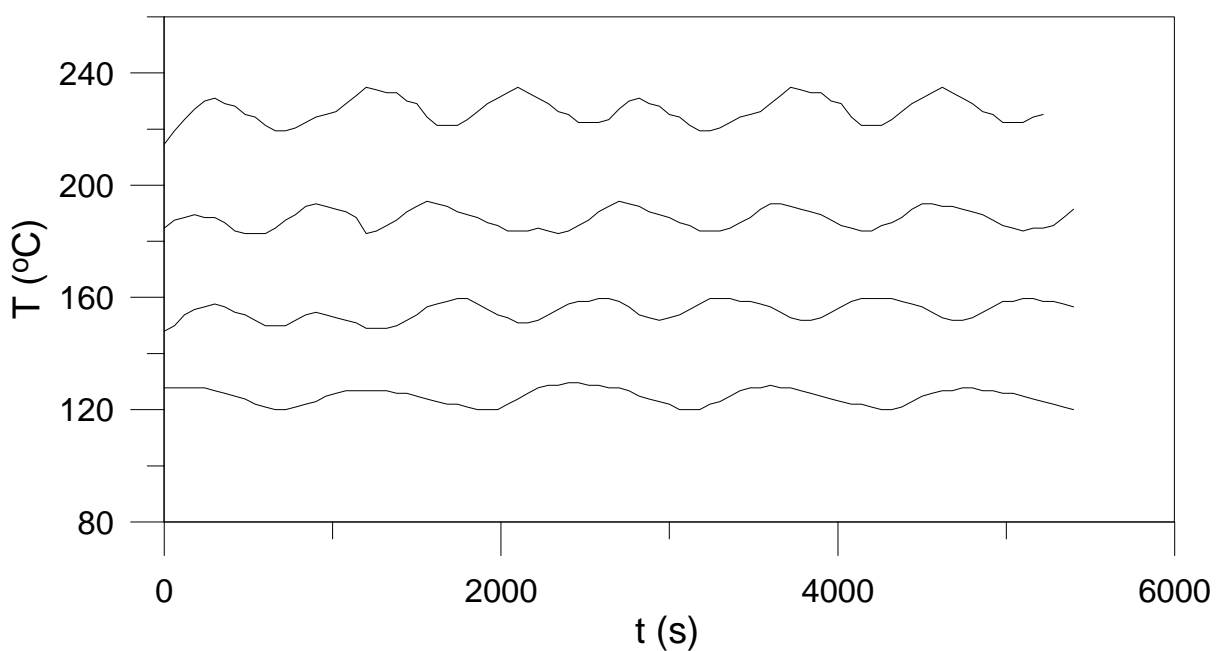


FIGURA 4.6 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM ATMOSFERA COM VAPOR

Apesar do controle adequado de temperatura, uma comparação dos perfis das FIGURAS 4.5 e 4.7 com os dados reportados na FIGURA 4.6 indica a maior eficiência do sistema de controle de aquecimento adotado nos experimentos em solução aquosa e na presença de oxigênio. Este comportamento é atribuído a

utilização de um controlador *on-off* nos experimentos conduzidos em atmosfera com vapor.

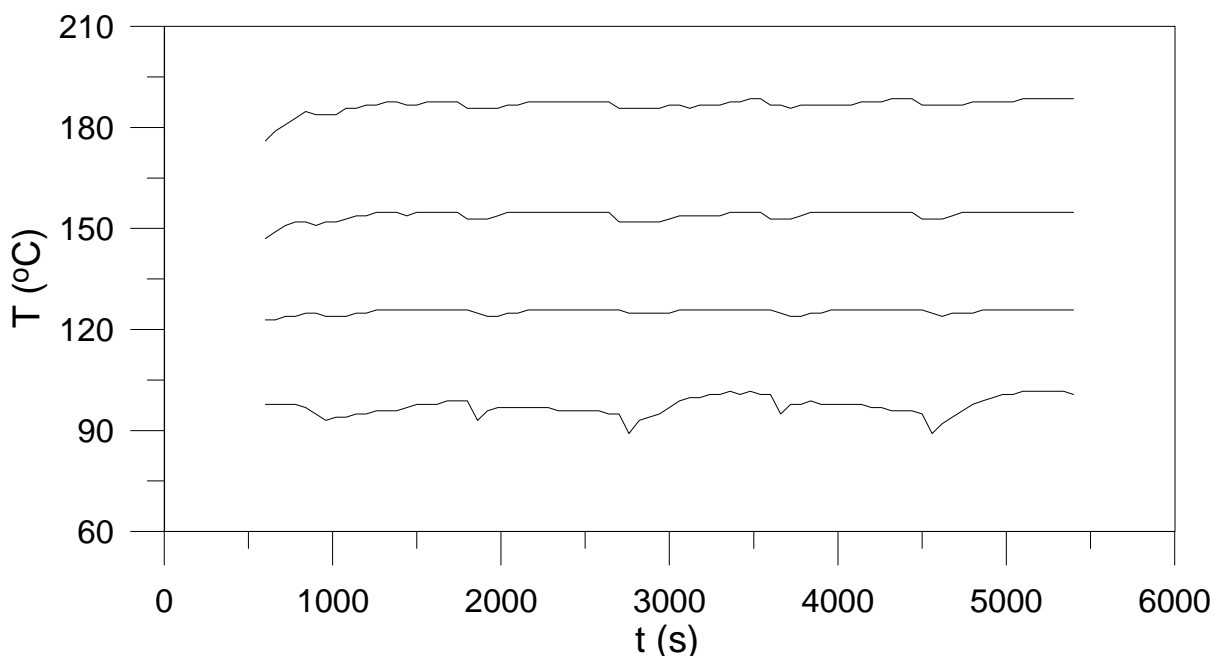


FIGURA 4.7 – PERFIS DE TEMPERATURA NOS ENSAIOS CINÉTICOS EM ATMOSFERA COM O₂

Em relação aos perfis indicados na FIGURA 4.7, convém notar que em todas as temperaturas investigadas, o ar contido nos recipientes com 5-CQA foi elevado ao *set-point* somente após transcorridos aproximadamente 600 s. Antes disso, um crescimento hiperbólico de temperatura, o qual não está reportado na FIGURA 4.7, havia sido observado. É possível também distinguir nitidamente as oscilações de temperatura provocadas pela abertura da câmara para retirada de amostras, o que somente é possível devido ao controle eficiente de temperatura utilizado nestes experimentos.

4.3 COMPORTAMENTO DO 5-CQA EM SOLUÇÃO AQUOSA

Os resultados dos ensaios conduzidos nas temperaturas de 70°C e 90°C empregando os cromatógrafos da marca Shimadzu (regime isocrático) e Varian (regime gradiente) são reportados na FIGURA 4.8A e 4.8B, respectivamente. Observa-se que não houve decréscimo da concentração do 5-CQA no intervalo investigado, o que indica estabilidade térmica do 5-CQA em solução aquosa com

baixa concentração de oxigênio, ausência de enzimas e em pH aproximadamente igual a 4,0.

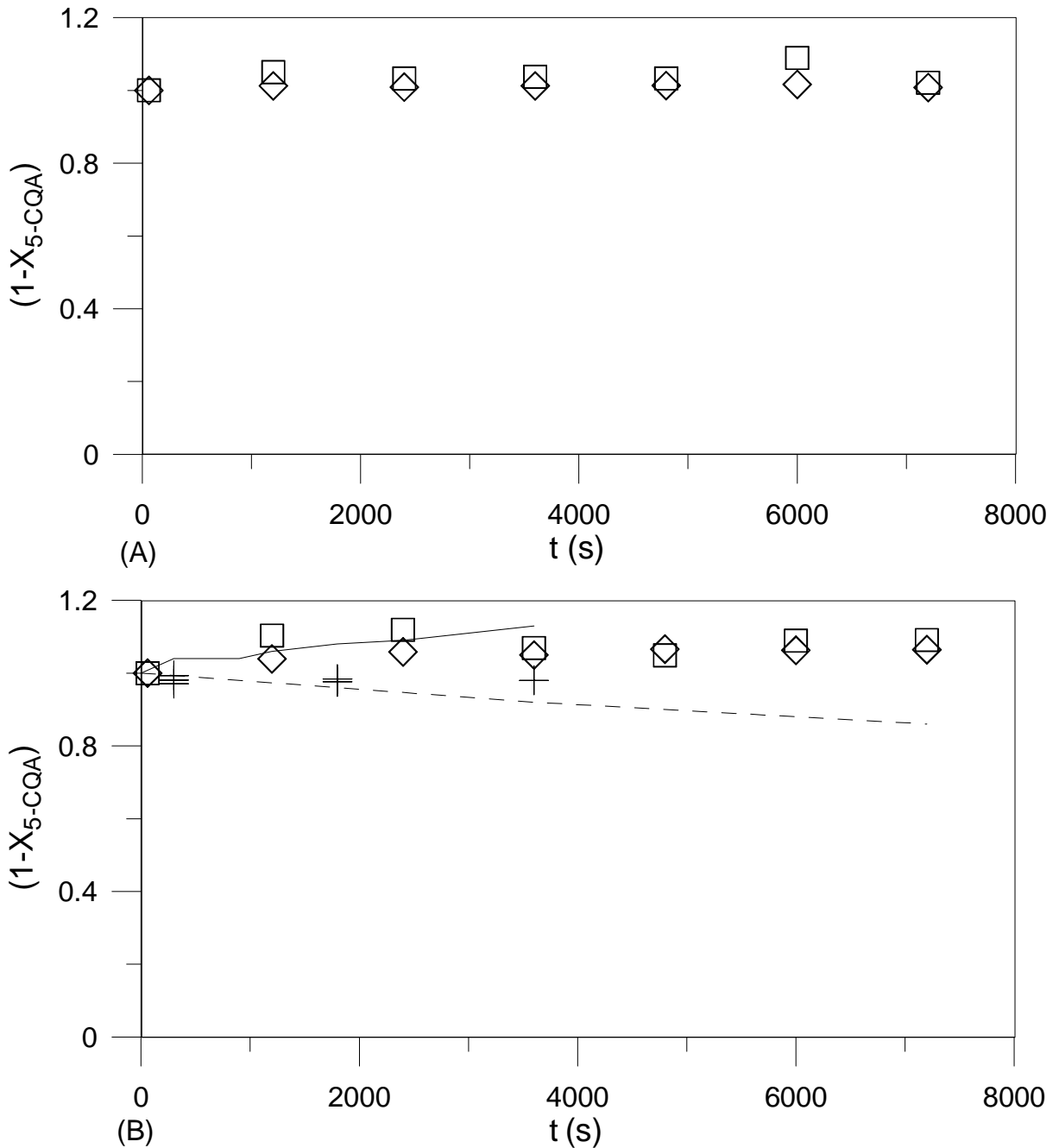


FIGURA 4.8 – CONCENTRAÇÕES ADIMENSIONAIS DE 5-CQA. (A) ESTE TRABALHO A 70°C COM CROMATÓGRAFO SHIMADZU () E VARIAN (◇). (B) ESTE TRABALHO A 90°C COM CROMATÓGRAFO SHIMADZU () E VARIAN (◇). LINHA CONTÍNUA: EXPERIMENTO 6 DA TABELA 2.3; LINHA TRACEJADA: EXPERIMENTO 4 DA TABELA 2.3. CRUZES: RESULTADOS DA TABELA 4.2

Visto que pelo menos uma investigação reportada na literatura (MURAKAMI *et al.*, 2004) apresenta resultados que indicavam redução da concentração de 5-

CQA puro a 100 °C (experimento 6 da Tabela 2.3), optou-se por uma segunda alternativa de quantificação do composto de interesse. Esta segunda metodologia também foi utilizada no intuito de verificar a hipótese de que outros produtos resultantes da degradação do 5-CQA teriam sido formados no reator, porém a separação não estaria ocorrendo, o que ocasionaria sobreposição de picos cromatográficos. Neste sentido, nesta metodologia alternativa de análise, basicamente foram alterados a fase móvel e o regime de eluição, visto que sabidamente os mesmos interferem na separação cromatográfica.

Considerando que a literatura apresenta trabalhos de otimização de métodos validados para separar e quantificar simultaneamente o 5-CQA de outros ácidos fenólicos (MATTILA; HELLSTROM, 2007; RIVELLI *et al.*, 2007; TAKENAKA *et al.*, 2006), optou-se por adotar o método de quantificação utilizado no cromatógrafo Varian. Embora já mencionado no capítulo anterior, convém lembrar que as análises com o equipamento da marca Shimadzu foram realizadas utilizando metanol como fase móvel e regime isocrático de eluição, enquanto que na metodologia alternativa, com cromatógrafo Varian, empregou-se acetonitrila e regime gradiente.

Com a repetição dos ensaios no reator e a mudança do método cromatográfico verificou-se que a estabilidade térmica do 5-CQA a 70°C e a 90°C permaneceu inalterada durante as 2 horas de tratamento, sendo que, além de não ocorrer degradação, não foi detectada a formação de qualquer outro composto no decorrer das análises. Os resultados dos experimentos utilizando esta metodologia alternativa de análise são também apresentados na FIGURA 4.8.

Ressalta-se que na FIGURA 4.8 a ordenada representa a concentração adimensional, calculada como a razão entre a concentração de 5-CQA em diferentes tempos de reação e a concentração após 1 minuto de reação, quando foi retirada e analisada a primeira alíquota. O bom acordo entre os resultados experimentais obtidos em diferentes equipamentos de cromatografia líquida, com eluições em regime isocrático e gradiente, e com diferentes fases móveis, corrobora a validade dos procedimentos de análise empregados.

O conjunto de valores da concentração adimensional de 5-CQA obtido por Takenaka *et al.* (2006) (FIGURA 4.8B) em condições experimentais análogas (Experimento 4 da Tabela 2.3) as utilizadas nesta investigação validam os resultados encontrados neste estudo. Entretanto, ensaios conduzidos por Murakami *et al.*

(2004) (FIGURA 4.8B) com 5-CQA puro, a 100 °C e por 3600 s, em solução etanol/água, contrariam esta tendência, pois indicam um pequeno decréscimo da concentração deste composto com o tempo de reação. Apesar disto, mesmo neste segundo caso, aproximadamente 91% do composto permaneceu estável frente ao tratamento empregado.

Os resultados reportados na literatura referentes à estabilidade do 5-CQA em alimentos submetidos a cocção em água a 100 °C (Experimentos 1, 4-6 da Tabela 2.4) apresentam um rápido desaparecimento do 5-CQA em função do tempo e, portanto aparentemente não reproduzem o comportamento demonstrado nesta investigação. Embora inúmeras razões tenham sido já apresentadas para justificar este aparente desacordo, é importante destacar que naqueles estudos os dados reportam as quantidades de 5-CQA encontradas no sólido que já havia sido tratado termicamente. Assim sendo, devido a alta solubilidade do 5-CQA em água, a redução reportada é provavelmente causada pela extração do 5-CQA pela água utilizada no tratamento térmico. De fato, segundo De Maria *et al.* (1998) 96% do 5-CQA aparentemente consumido foi encontrado na água de cocção. Se for considerado que os vegetais utilizados por De Maria *et al.* (1998) foram tratados termicamente por somente 300 s, então pode-se imaginar que um percentual no mínimo da mesma magnitude seria encontrado na água de cocção dos demais estudos reportados na Tabela 2.4. Desta forma, uma correção destes valores seria importante para o propósito de comparação com os dados experimentais obtidos nesta investigação. A Equação (4.2) resume o procedimento de correção e a Tabela 4.2 os valores corrigidos.

$$\left(\frac{[5-CQA]}{[5-CQA]^0} \right)_{T4.2} = 0,96 \left\{ 1 - \left(\frac{[5-CQA]}{[5-CQA]^0} \right)_{T2.4} \right\} + \left(\frac{[5-CQA]}{[5-CQA]^0} \right)_{T2.4} \quad (4.2)$$

Como pode-se observar na FIGURA 4.8B, os resultados corrigidos segundo a Equação (4.2) corroboram os valores experimentais de estabilidade do 5-CQA obtidos nesta investigação em solução aquosa.

TABELA 4.2 – CORREÇÃO DOS VALORES DE DEGRADAÇÃO DO 5-CQA EM ALIMENTOS SUBMETIDOS A COCCÃO A 100 °C.

Experimento da Tabela 2.4	T (°C)	t (s)	[5-CQA]/[5-CQA] ₀	Referência
1	100	1800	0,98	DAO; FRIEDMAN (1992)
4	100	300	0,97	DE MARIA <i>et al</i> , (1998)
5	100	300	0,98	
6	100	300	0,99	TAKENAKA <i>et al</i> , (2006)
		1800	0,98	
		3600	0,98	

4.4 COMPORTAMENTO DO 5-CQA EM ATMOSFERA, COM VAPOR

Partindo-se dos dados de conversão do 5-CQA no equilíbrio apresentados nas FIGURAS 4.11 e 4.12, os quais foram estimados a partir da média dos valores da conversão para tempos maiores ou iguais a 30 minutos, obteve-se a constante de equilíbrio para cada temperatura de acordo com a Equação (3.20). Com os dados de K_c a cada temperatura, e considerando a equação integrada e linearizada de van't Hoff (ver Equação 3.19), pode-se fazer um diagrama como indicado na FIGURA 4.9. Observa-se prontamente que o modelo linear representado pelo numerador do último termo à direita da Equação (3.19) representa corretamente os resultados obtidos. Nesta reta ajustada, a inclinação representa a entalpia da Reação (3.1) dividida pela constante universal dos gases ($\Delta H_{298}/R = -1013,4$ K), enquanto o coeficiente linear é a constante de equilíbrio a 298 K. ($K_{298} = 1,68$). Estes dados indicam uma reação ligeiramente exotérmica que favorece a formação do 3-CQA a medida que a temperatura diminui. Aparentemente, os resultados parecem indicar uma maior possibilidade de existência do 3-CQA do que o 5-CQA em condições ambientes, o que contraria uma evidência experimental constatada na literatura. Entretanto, deve-se considerar que os resultados em questão envolvem uma reação do 5-CQA em estado sólido na presença de excesso de vapor d'água e, portanto não configuram um ambiente onde o mesmo é tipicamente encontrado.

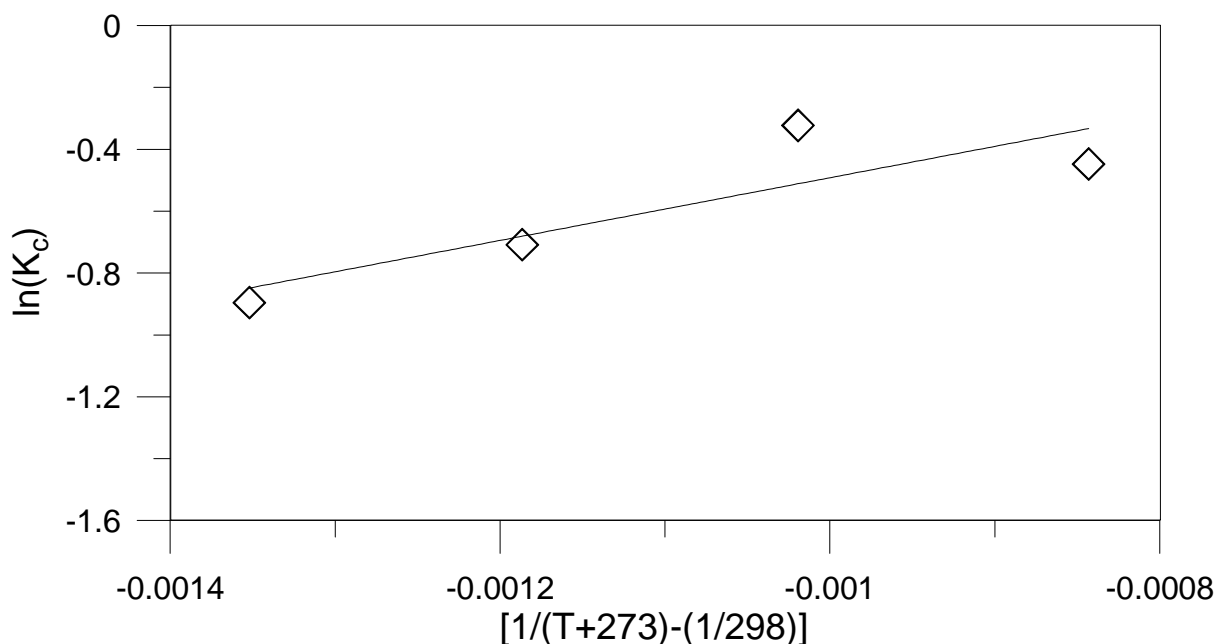


FIGURA 4.9 – DETERMINAÇÃO DE K_{298} E $\Delta H/R$ DA EQUAÇÃO DE VAN'T HOFF INTEGRADA E LINEARIZADA A PARTIR DE DADOS DE CONVERSÃO DE EQUILÍBRIO A DIFERENTES TEMPERATURAS, $R^2=0,74$.

A fim de que se possa estimar a variação da concentração de 5-CQA em função do tempo e temperatura de reação, além do calor de reação ($\Delta H_{298}/R$) e constante de equilíbrio (K_{298}) a 298 K, é necessário obter os parâmetros A_1 e Ea_1 do modelo cinético que caracteriza a degradação térmica do 5-CQA. O procedimento necessário para o cálculo destes coeficientes foi detalhado no capítulo anterior e aqui se resume à apresentação da FIGURA 4.10, onde o logaritmo natural da constante direta de velocidade da Reação (3.1) é traçado em função do inverso da temperatura. Observa-se que a Equação (3.18) reproduz adequadamente a dependência de k_1 com a temperatura. Dos resultados reportados na FIGURA 4.10 emergem os valores de $-Ea_1/R=2283,5$ K e $A_1=4,88 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$.

Os resultados reportados acima indicam que o aumento da temperatura parece reduzir a constante de velocidade direta da reação de transesterificação proposta. Provavelmente, este fenômeno decorre de um efeito conjugado da temperatura e da concentração de oxigênio e não unicamente da temperatura. Sabe-se que o aumento da temperatura aumenta a pressão do vapor contido no reator e por esta razão imagina-se que a concentração de oxigênio, a qual de alguma forma contribui para o aumento da velocidade de consumo do 5-CQA, foi reduzida devido à expulsão do O_2 residual do meio reacional. Desta forma, os efeitos combinados destas variáveis provocaram uma redução da constante de velocidade.

Estes efeitos combinados de temperatura e outra variável envolvendo a equação de Arrhenius não são estranhos na literatura (DORAN, 1995). Em estudos de cinética enzimática, o aumento de temperatura é associado à desativação enzimática e, portanto, inclinações positivas em diagramas de Arrhenius podem ser obtidas em determinadas faixas de temperatura (DORAN, 1995).

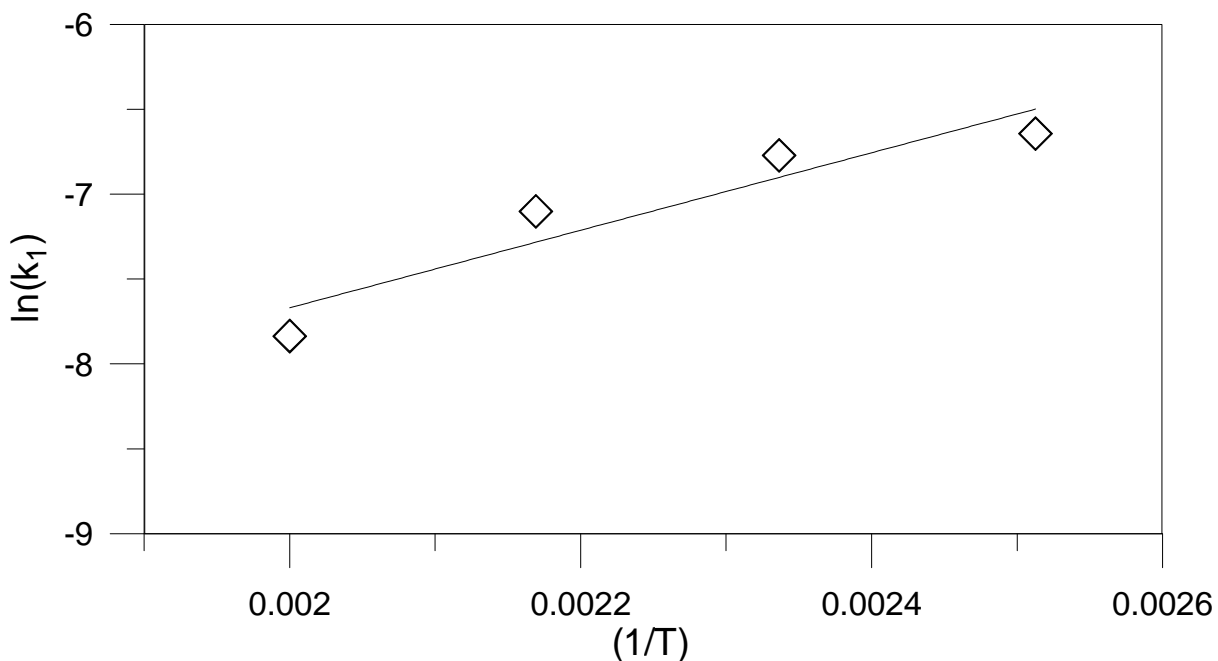


FIGURA 4.10 – RELAÇÃO ENTRE A TEMPERATURA E A CONSTANTE DE VELOCIDADE DA EQUAÇÃO (3.12) NAS DIFERENTES TEMPERATURAS INVESTIGADAS, $R^2=0,89$.

Os dados cinéticos de consumo de 5-CQA na presença de vapor d'água são apresentados resumidamente nas FIGURAS 4.11 e 4.12 em todas as temperaturas investigadas. Os resultados calculados foram obtidos por substituição dos valores de A_1 , E_{a1} na Equação (3.18), a qual foi inserida na Equação (3.12). As conversões no equilíbrio envolvidas nesta última expressão foram estimadas através da Equação (3.19), empregando valores dos parâmetros K_{298} e $\Delta H_{298}/R$ anteriormente reportados.

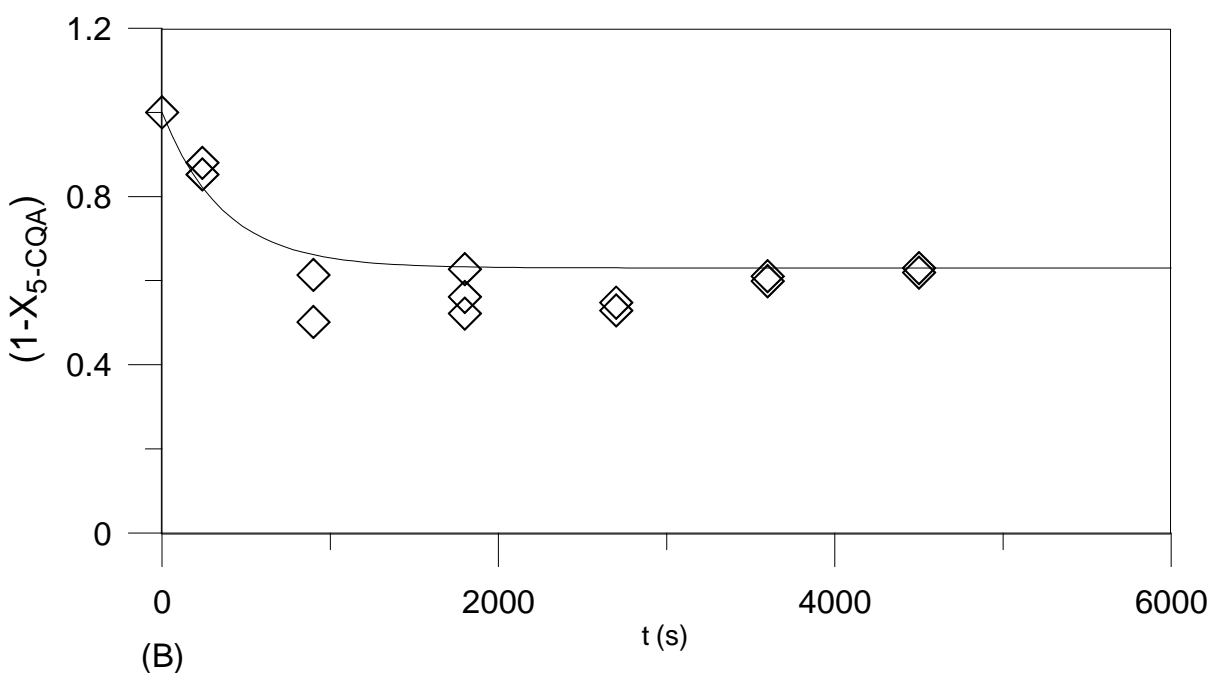
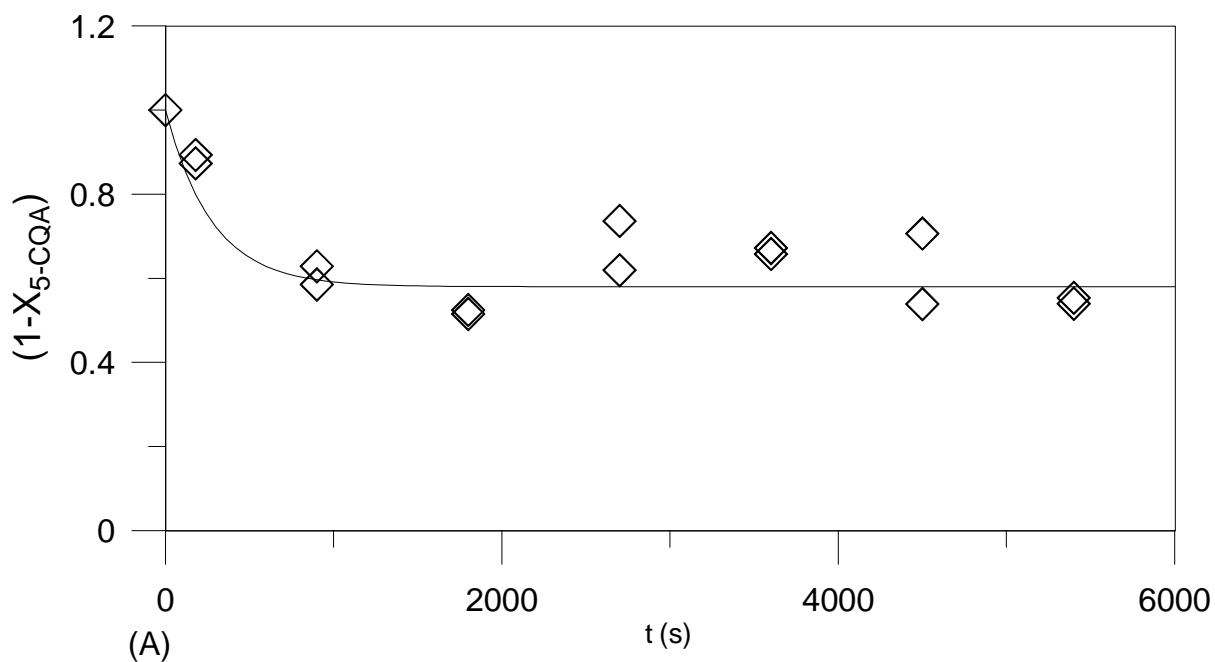


FIGURA 4.11 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 125 °C (A) E 155 °C (B).

As FIGURAS 4.11 e 4.12 demonstram que o mecanismo cinético simplificado sugerido reproduz os resultados experimentais obtidos nesta investigação na presença de H₂O em estado vapor. A validade do procedimento de modelagem cinético também é atestada por evidências experimentais reportadas na literatura (TRUGO, MACRAE, 1984; VILLEGAS; SHIMOKAWA; OKUYAMA KOJIMA, 1987; DING *et al.*, 1999; CLIFFORD, 2000; SIMÕES, *et al.*, 2004) que indicam possibilidade de transesterificação ou isomerização envolvendo o 5-CQA.

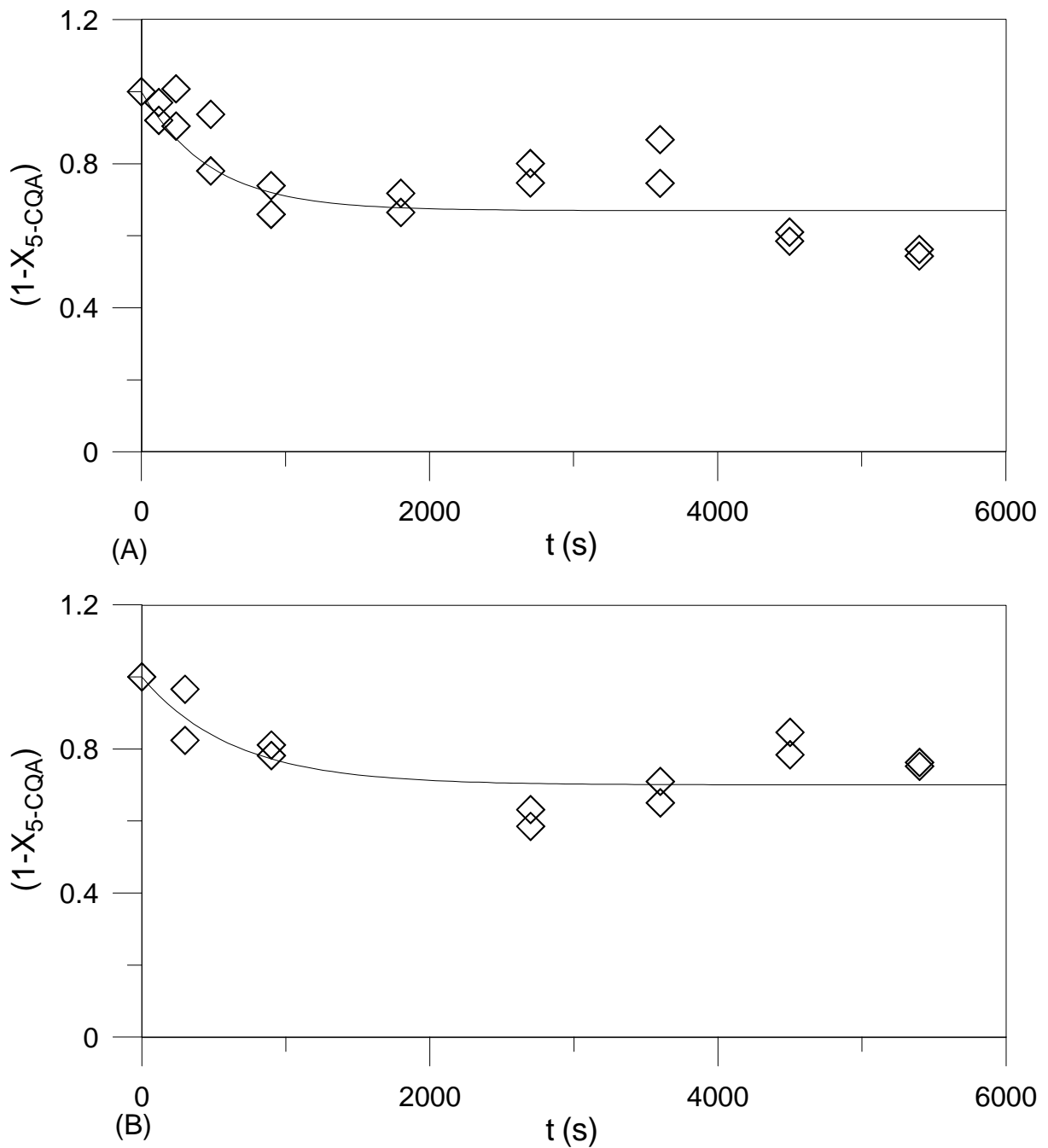


FIGURA 4.12 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 188 °C (A) E 226 °C (B).

A suposta formação do 3-CQA é baseada no tempo de retenção deste composto em relação ao 5-CQA e em dados similares de cromatografia reportados na literatura. Um cromatograma típico para os ensaios cinéticos em presença de vapor d'água é apresentado na FIGURA 4.13. Observa-se que o composto que foi identificado como 3-CQA apresenta um tempo de retenção na coluna aproximadamente meio minuto inferior ao do 5-CQA. Esta maior afinidade do 3-CQA

com a fase móvel tem sido evidenciada com freqüência na literatura envolvendo misturas de monoésteres do ácido caféico (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA) (DING *et al.*, 1999; BRAVO *et al.*, 2007) em condições análogas de separação.

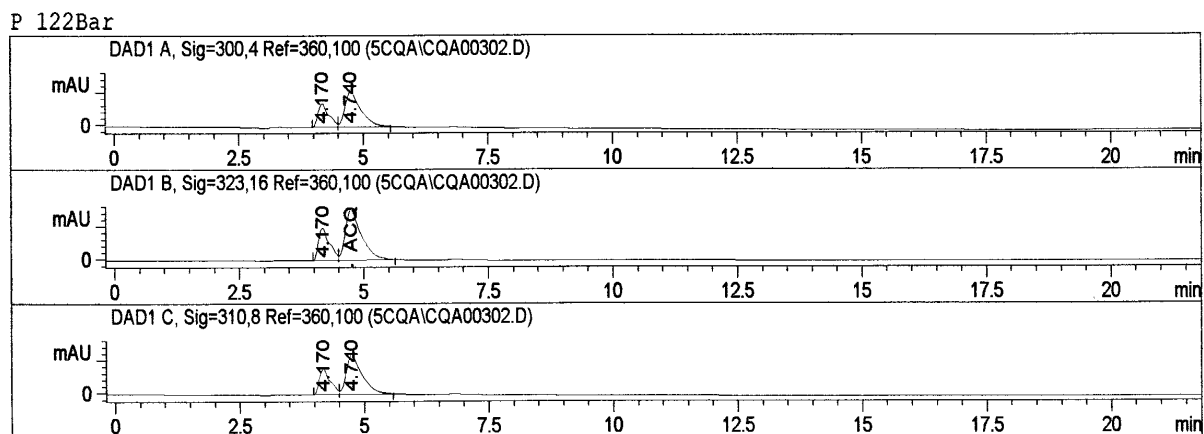


FIGURA 4.13. CROMATOGRAMA TÍPICO OBTIDO EM UM EQUIPAMENTO DE CLAE-UV (AGILENT) EM TRÊS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA

4.5 COMPORTAMENTO DO 5-CQA EM ATMOSFERA, COM AR

O primeiro aspecto importante na análise de dados cinéticos com o método integral é verificar se o termo esquerdo da igualdade na Equação (3.16) ou (3.17) é linear com o tempo. Baseado nos resultados experimentais, linhas retas com coeficientes de determinação entre 0,94 e 0,99 foram obtidos para todas as temperaturas investigadas. Isto implica que as expressões acima mencionadas reproduzem corretamente mais do que 96% da variância na concentração adimensional de 5-CQA devido à variação do tempo de reação. Este comportamento confirma a consistência das constantes de velocidade ajustadas aos resultados experimentais no intervalo de temperatura de 96 a 188 °C através da utilização do modelo cinético simplificado representado pelas Equações (3.16) ou (3.17).

A FIGURA 4.14 também valida os resultados obtidos visto que o efeito esperado da temperatura sobre a constante de velocidade (k_3) foi descrito através da expressão de Arrhenius (Equação 3.18). Uma energia de ativação igual a 42185 J mol⁻¹ K⁻¹ foi encontrada para a Reação (3.13) utilizando os dados da FIGURA 4.14. Obviamente é bem compreendido que o coeficiente linear neste tipo de diagrama representa o logaritmo natural do fator de freqüência, a partir do qual foi estimado um valor de A_3 próximo a 20,9 s⁻¹.

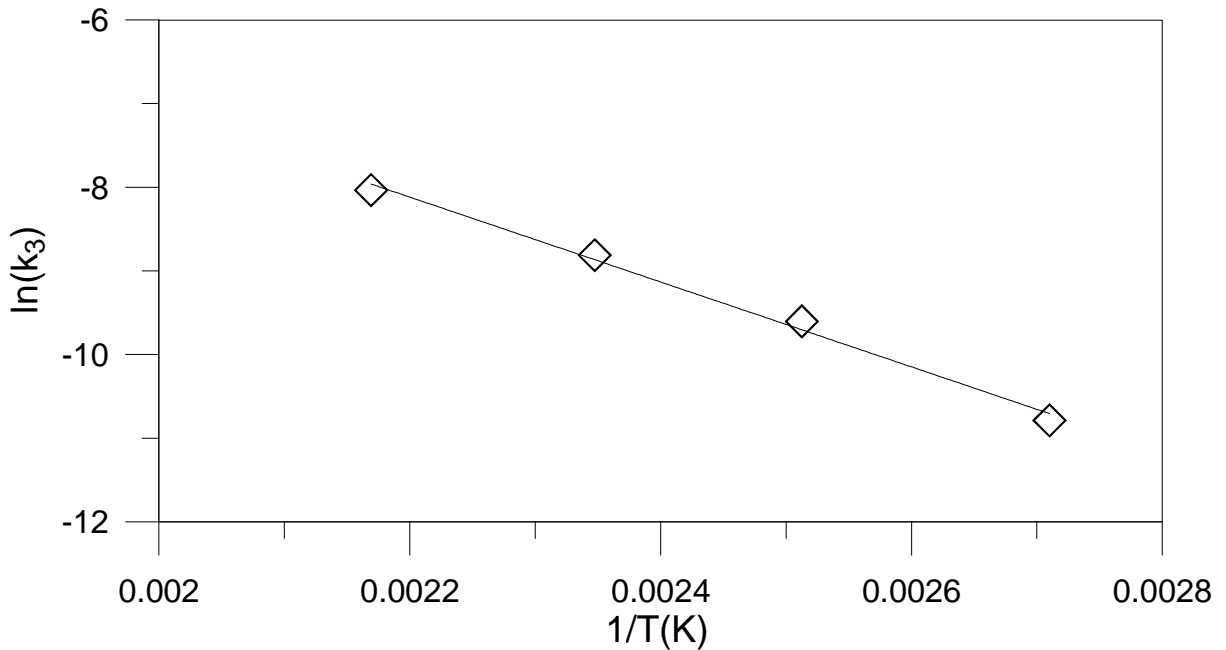


FIGURA 4.14 – VARIÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO 3.13 COM A TEMPERATURA. SÍMBOLOS: CONSTANTES DE VELOCIDADE DA EQUAÇÃO (3.16) DETERMINADAS A PARTIR DE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE CONVERSÃO DE 5-CQA EM FUNÇÃO DO TEMPO A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURVA: AJUSTE DA CONSTANTE DE VELOCIDADE COM A EXPRESSÃO DE ARRHENIUS.

As FIGURAS 4.15 e 4.16 apresentam comparações entre os resultados experimentais e calculados de concentração adimensional do 5-CQA na presença de O₂ a 96, 125, 153 e 188 °C. Em todos os casos o consumo de 5-CQA ao longo do tempo de reação e a influência da temperatura sobre o observado decréscimo foi estimado através do modelo representado pela Equação (3.17), a qual apresenta-se na forma da Equação (4.3) após substituídos os parâmetros A₃ e Ea₃/R pelos seus valores correspondentes.

$$1 - X_{5-CQA} = \exp \left[-2,09 \times 10^1 (t) \exp \left(\frac{-5074}{T + 273} \right) \right] \quad (4.3)$$

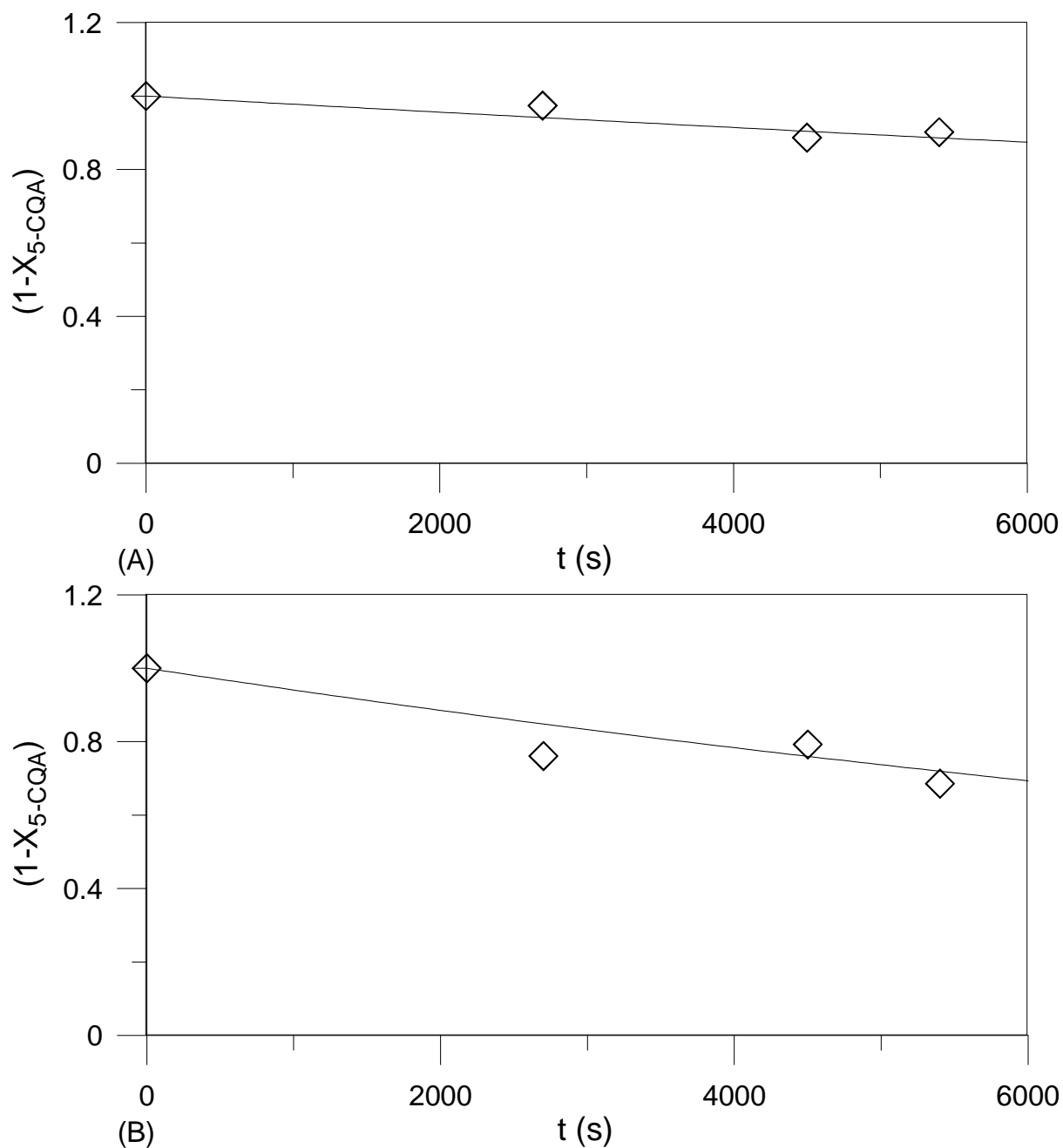


FIGURA 4.15 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 96°C (A) E 125°C (B).

Dados experimentais de oxidação do 5-CQA obtidos por De Maria *et al.* (1998) e Murakami *et al.* (2004) (Experimentos 2-3 e 5 da Tabela 2.3) são representados nas FIGURAS 4.17 e 4.18, respectivamente. Estes resultados validam a tendência de oxidação do composto investigado e confirmam a consistência do modelo cinético sugerido para predição da oxidação do 5-CQA.

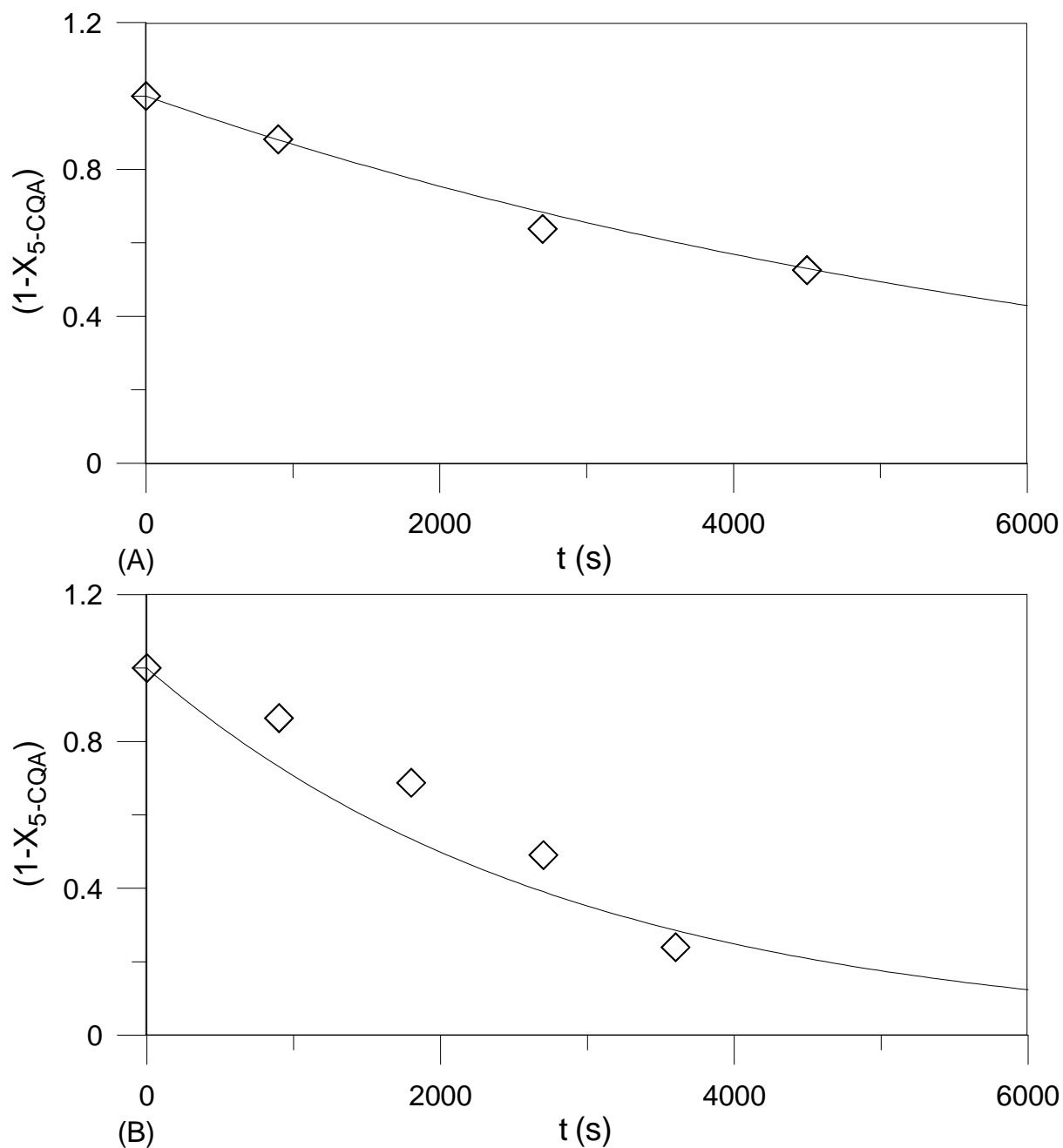


FIGURA 4.16 – PERFIS EXPERIMENTAIS (SÍMBOLOS) E CALCULADOS (CURVAS) DE 5-CQA NAS TEMPERATURAS DE 153°C (A) E 188°C (B)

A substituição da análise em equipamento de CLAE-UV nos ensaios em $H_2O(g)$ por medidas unicamente espectrofotométricas nos experimentos em O_2 é um ponto importante, o qual merece ser discutido em detalhe. Sobre esta questão, convém inicialmente mencionar que análises espectrofotométricas foram realizadas para monitorar o consumo de 5-CQA na presença de vapor d'água, porém nenhuma diminuição da absorbância foi observada. Este fato corrobora a hipótese de transesterificação do 5-CQA na presença de vapor visto que os coeficientes de

absortividade molar dos monoésteres do ácido caféico são muito próximos (FRIEDMAN, 1997) e, portanto o desaparecimento do 5-CQA para formação do isômero 3-CQA ou 5-CQA não seria evidenciado.

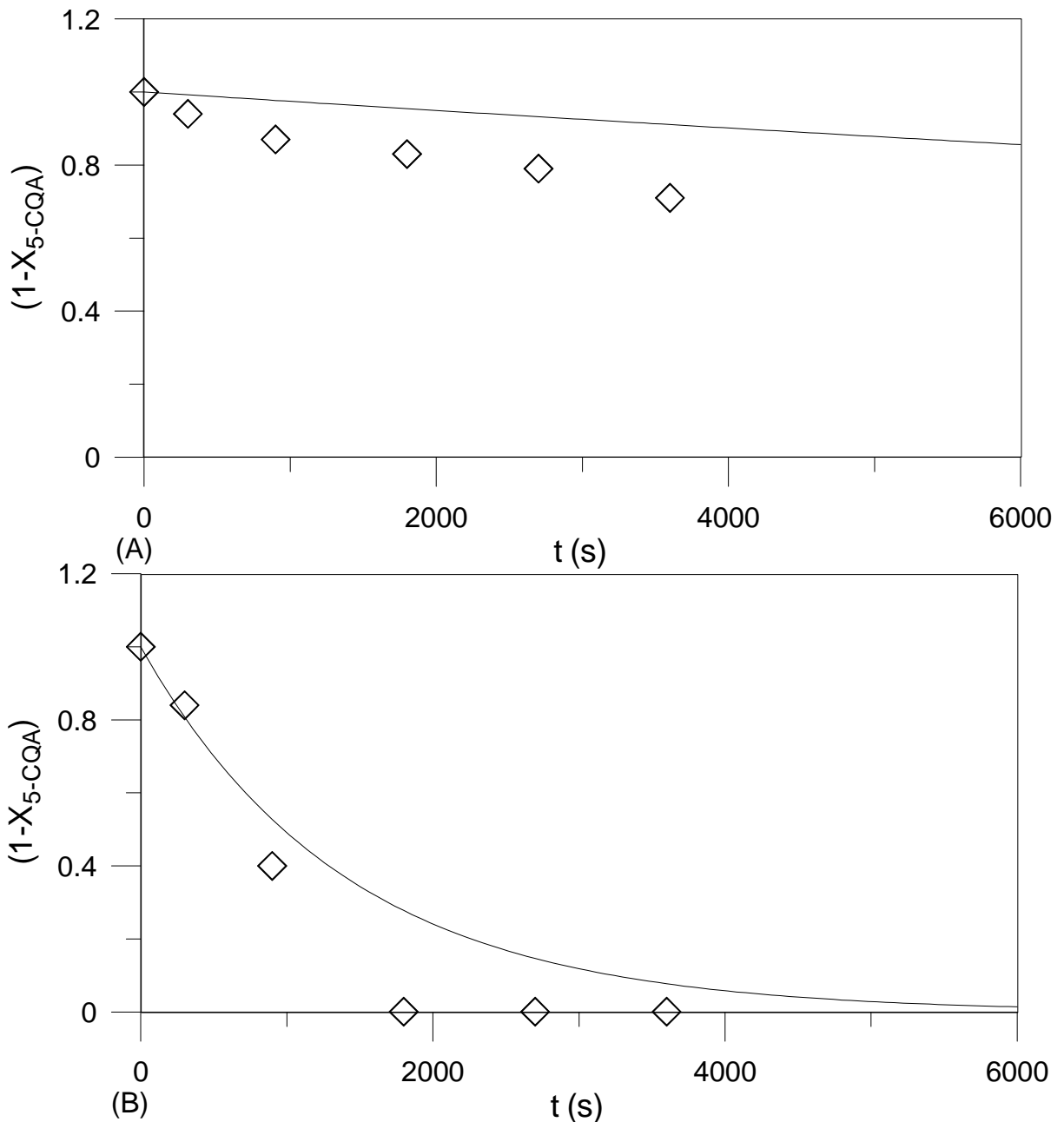


FIGURA 4.17 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE OXIDAÇÃO DO 5-CQA (SÍMBOLOS) REPORTADOS NA LITERATURA (DE MARIA *et al.*, 1998) E CALCULADOS (CURVAS) COM OS PARÂMETROS CINÉTICOS ENCONTRADOS NESTA INVESTIGAÇÃO NAS TEMPERATURAS DE 100°C (A) E 200°C (B)

Entretanto, ao analisar o composto após o tratamento térmico na presença de oxigênio pelo método espectrofotométrico, verificou-se que as leituras de

absorbância decresciam ao longo do tempo de reação. Esta evidência gera a especulação de que isômeros do 5-CQA não foram formados neste ambiente reacional, como de fato confirmado por análises das mesmas alíquotas em equipamento de CLAE-UV. Uma possibilidade para o decréscimo na absorção do composto nesta situação poderia ser a formação de quinonas intermediárias instáveis, como clorogenoquinonas (VILLEGAS; SHIMOKAWA; OKUYAMA KOJIMA, 1987), porém os resultados de cromatografia líquida não confirmam esta possibilidade, embora algumas hipóteses possam ser formuladas para justificar a ausência de picos referentes à possível formação destes compostos.

Como as análises cromatográficas em CLAE-UV não identificaram a formação de nenhum pico adicional ao 5-CQA é provável que compostos voláteis tenham sido produzidos durante a oxidação, como por exemplo evidenciado por Sharma et al. (2002) em estudo de pirólise do 5-CQA.

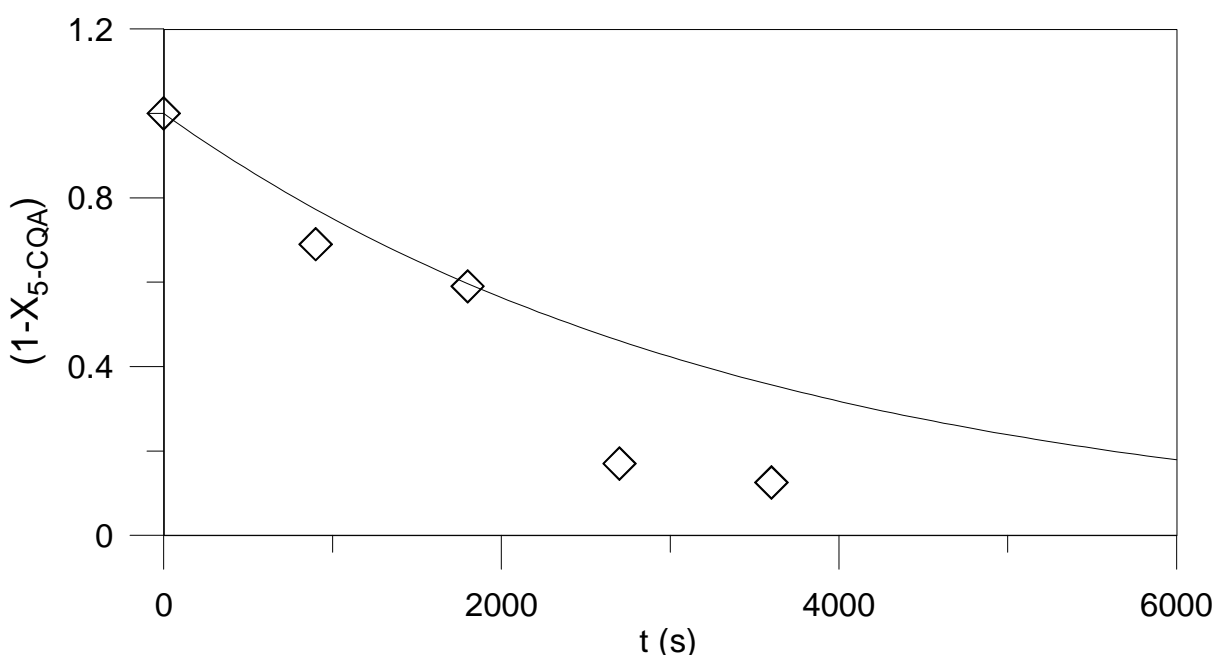


FIGURA 4.18 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE OXIDAÇÃO DO 5-CQA (SÍMBOLOS) REPORTADOS NA LITERATURA (MURAKAMI *et al.*, 2004) E CALCULADOS (CURVAS) COM OS PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS NESTA INVESTIGAÇÃO NA TEMPERATURA DE 180°C.

4.6 SIMULAÇÃO DO CONSUMO DE 5-CQA POR OXIDAÇÃO QUÍMICA NAS ETAPAS DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA E SECAGEM DE ERVA-MATE

Um objetivo importante do trabalho, especificado inicialmente, é estimar os níveis de oxidação ou degradação do 5-CQA contido na erva durante os estágios de desativação enzimática e secagem. Visto que o produto da transesterificação do 5-CQA também é um CGA, o qual também apresenta atividades terapêuticas, a simulação da reação de transesterificação deste composto nestas etapas de processamento da erva-mate deixa de ser importante.

Nesta secção somente a reação de oxidação envolvendo a Equação (4.3) e condições operacionais reportadas na Tabela 2.1 será investigada. As FIGURAS 4.19 e 4.20 apresentam a variação calculada de 5-CQA na faixa de temperatura definida na Tabela 2.1 para a desativação enzimática e secagem de erva-mate, respectivamente.

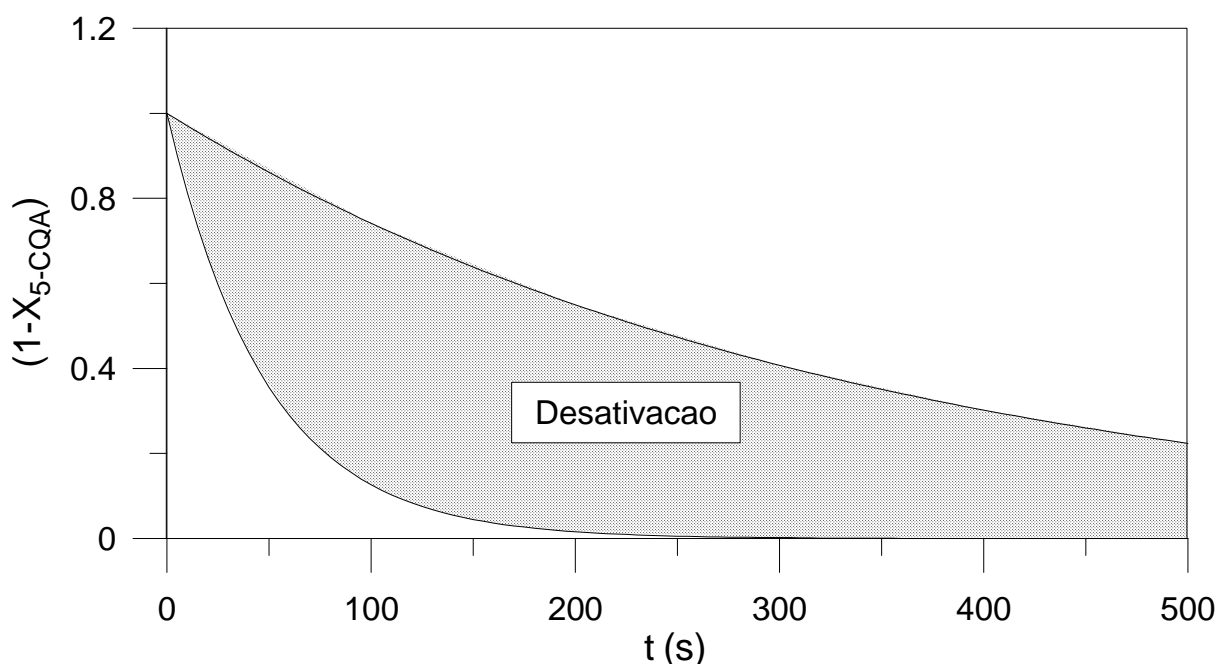


FIGURA 4.19 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE DURANTE A DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 300 °C A 460 °C

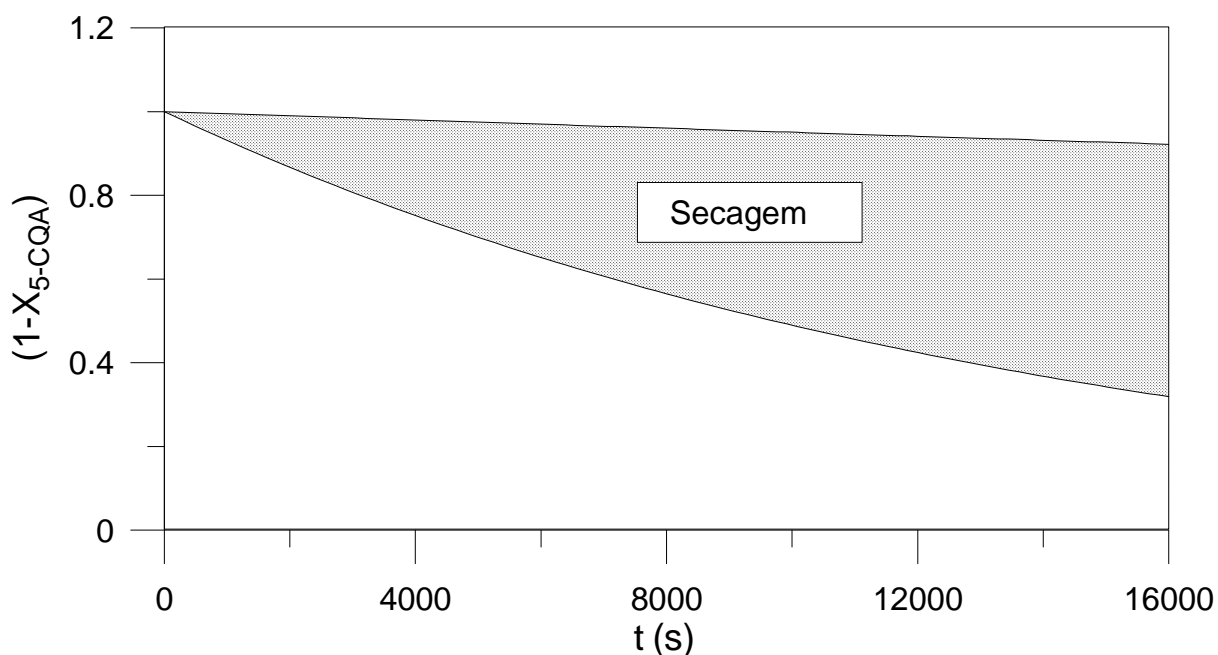


FIGURA 4.20 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE DURANTE A SECAGEM NA FAIXA DE TEMPERATURA DE 60°C A 130 °C

Antes da análise dos resultados apresentados nas FIGURAS 4.19 e 4.20 é importante mencionar que os mesmos foram obtidos assumindo temperaturas constantes ao longo de ambos os equipamentos de desativação enzimática e secagem. Durante a desativação, apesar dos curtos tempos de residência, conversões que variam entre 80 e 100% foram observadas a 480 s, enquanto que na secagem, devido a temperaturas inferiores, conversões da ordem de 8 a 70% são evidenciadas após aproximadamente 16000 s de operação.

Em ambas as situações existe um efeito significativo da temperatura sobre a taxa de consumo de 5-CQA. No caso da secagem, o intervalo de variação de temperatura é menor e é causado pela utilização de secadores multiestágios. Portanto, as temperaturas de fato variam entre aproximadamente 60 e 130°C neste estágio de processamento. Entretanto, existe uma maior incerteza no que se refere à faixa de temperatura adotada para simulação da oxidação do 5-CQA na desativação. Além disso, as temperaturas na saída do equipamento são tipicamente da ordem de 65 °C (ESMELINDRO *et al.*, 2002), o que indica um perfil de temperatura ao longo do tempo de residência.

As FIGURAS 4.21 e 4.22 simulam a oxidação do 5-CQA durante a desativação enzimática com perfis lineares e exponenciais de decréscimo de temperatura ao longo do equipamento, respectivamente. Nestes casos, devido a

redução da temperatura média na câmara de desativação, as conversões a 480 s são portadas para valores inferiores aos evidenciados na FIGURA 4.19, quando assumiram-se temperaturas constantes de 300 e 460 °C através do equipamento.

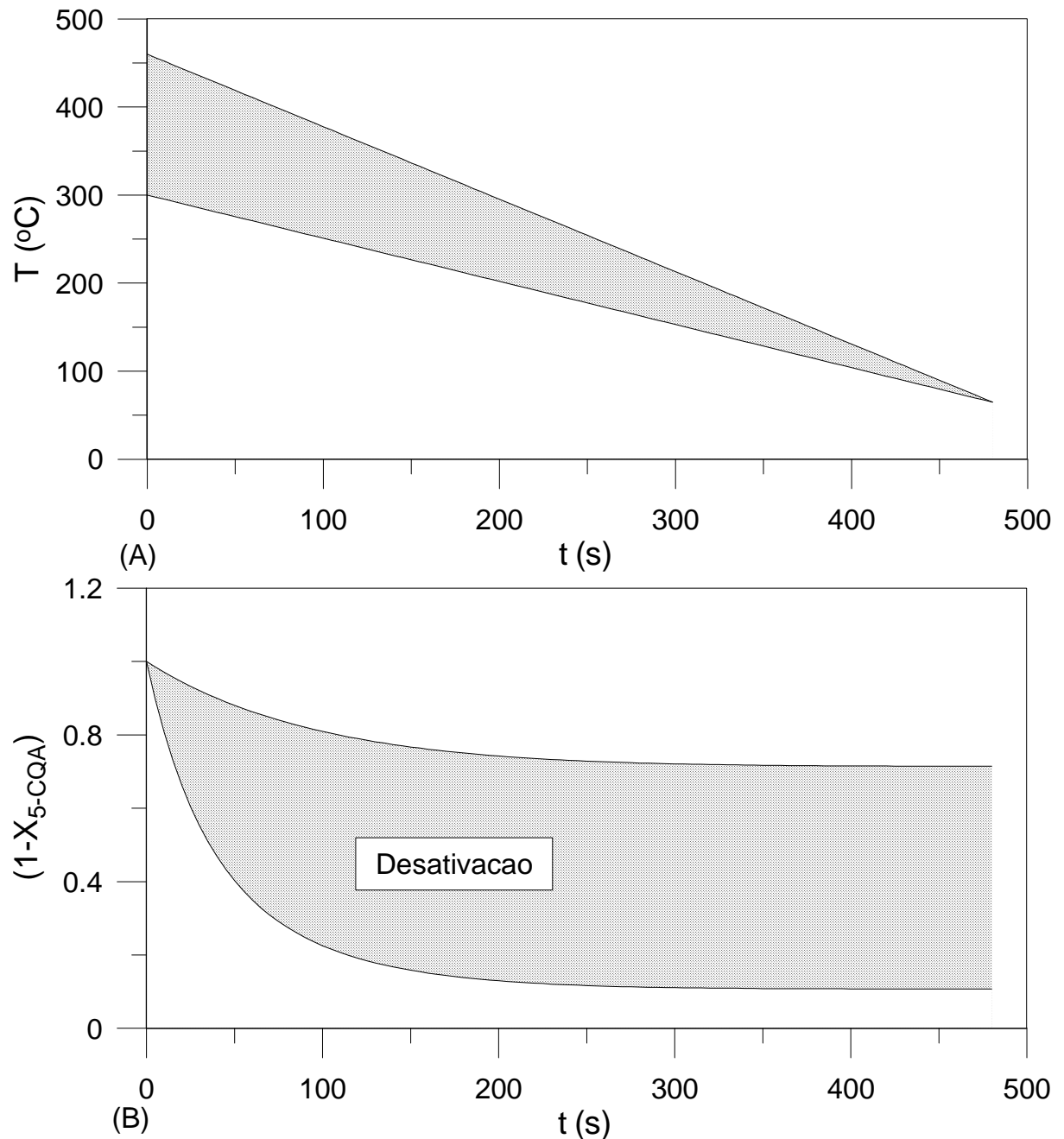


FIGURA 4.21 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE ASSUMINDO VARIAÇÃO LINEAR DE TEMPERATURA NO EQUIPAMENTO DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

A FIGURA 4.22 provavelmente envolve uma simulação mais realística pois decréscimos exponenciais de temperatura são mais frequentes em processos

industriais. Nesta condição, 20 a 70% do 5-CQA inicialmente contido na erva-mate é oxidado.

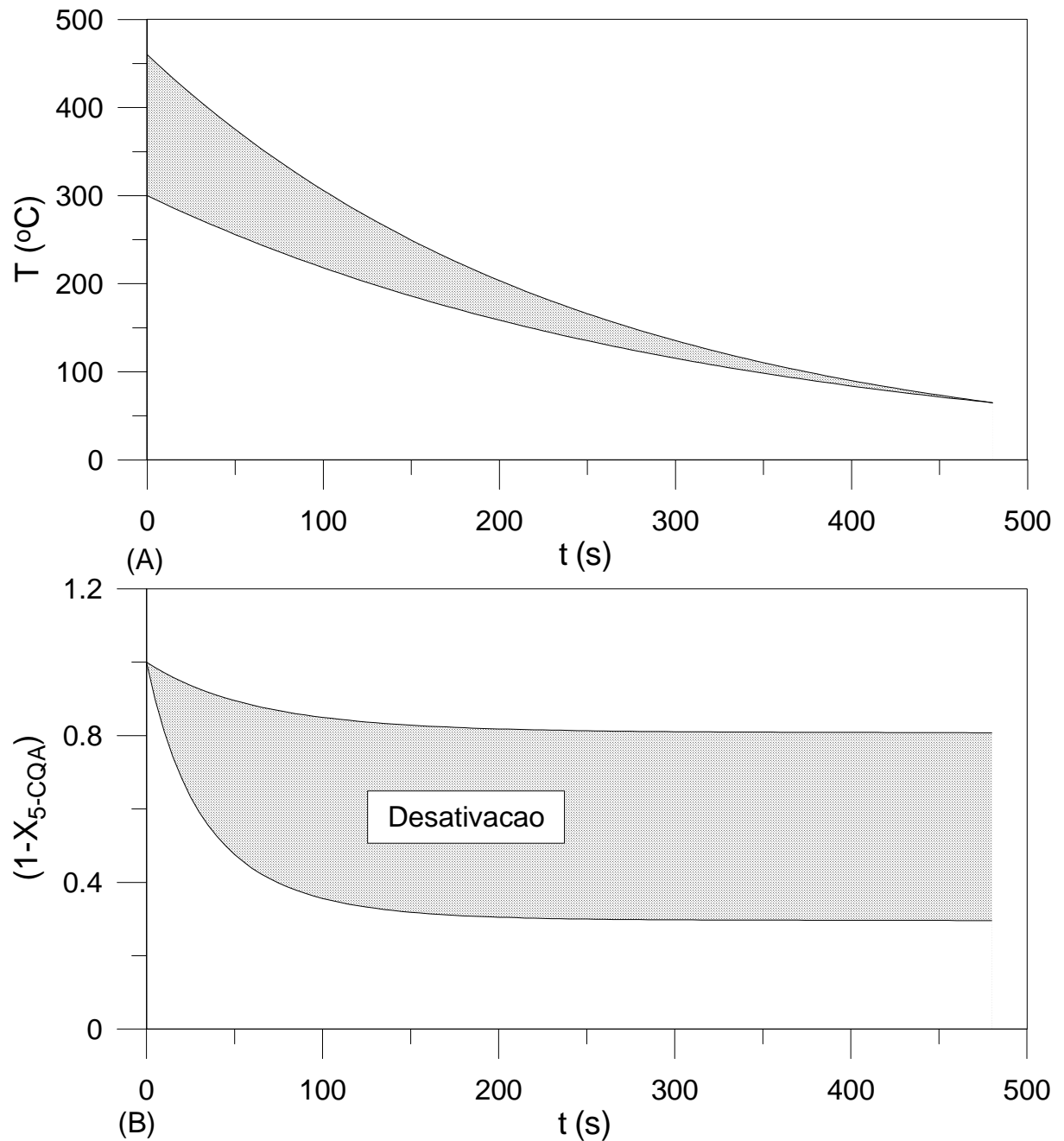


FIGURA 4.22 – SIMULAÇÃO DA OXIDAÇÃO QUÍMICA DO 5-CQA NA ERVA-MATE ASSUMINDO VARIAÇÃO EXPONENCIAL DE TEMPERATURA NO EQUIPAMENTO DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

É importante salientar que nas condições em que foram obtidos os resultados reportados nas Figuras 4.21 e 4.22, além da variação da concentração de 5-CQA, existe uma variação da temperatura com o tempo. Portanto, a Equação (4.3),

utilizada para obter os resultados apresentados nas Figuras 4.19 e 4.20 não é mais adequada e uma nova solução da Equação (3.14) foi requerida empregando o método numérico de Euler.

5 - CONCLUSÕES

A estabilidade do 5-CQA foi experimentalmente investigada em solução aquosa, na presença de vapor d'água e oxigênio. A concentração de 5-CQA foi monitorada com equipamento de cromatografia líquida equipado com detectores de arranjo de diodos e por espectrofotometria. Os ensaios cinéticos indicam estabilidade do 5-CQA em solução aquosa, transesterificação na presença de vapor da água e oxidação a compostos voláteis em atmosfera oxidativa. Modelos cinéticos simplificados envolvendo duas reações elementares de pseudo-primeira ordem, reversíveis e irreversíveis, descreveram corretamente os resultados de transesterificação e oxidação do 5-CQA, respectivamente. Os procedimentos e resultados obtidos nesta investigação foram validados por comparação com dados experimentais reportados na literatura, os quais foram obtidos em diferentes condições cinéticas. A simulação do consumo do 5-CQA nas etapas de desativação enzimática e de secagem da erva-mate em atmosfera oxidativa indica conversões de até 70% do reagente investigado. De um ponto-de-vista prático, os resultados experimentais e de modelagem revelam que o 5-CQA e provavelmente todos os membros da família dos CGA encontrados na erva-mate apresentam altas taxas de oxidação quando em contato com ar ou oxigênio. Estes resultados indicam a necessidade de técnicas alternativas de processamento deste produto. Por exemplo, a operação de secagem com ar quente, tipicamente encontrada na indústria ervateira, poderia ser substituída por um processo análogo envolvendo vapor superaquecido. Da mesma forma, a fragmentação poderia ser um estágio final da manufatura visto que teoricamente incrementa o contato dos CGA com oxigênio devido à redução do tamanho das folhas.

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar experimentos no reator para verificar o comportamento do 5-CQA em solução aquosa, com tratamentos térmicos a 70°C e a 90°C com injeção constante de oxigênio na solução reacional.

Realizar experimentos semelhantes utilizando erva-mate de diferentes estágios de secagem para acompanhar a degradação do 5-CQA.

REFERÊNCIAS

ABITANTE, A. L. **Modelagem Dinâmica e Análise de um Sistema de Controle de Umidade de Folhas de Erva-Mate em Secadores Contínuos de Esteira**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia – PIPE, Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

AL-FARSI, M. A.; LEE, C. Y. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. **Food Chemistry**. v. 108, n. 03, 2008, p. 977–985.

ANDJELKOVIC, M.; CAMP, J. V.; DE MEULENAER, B.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**. v. 98, 2006, p. 23-31.

ANTONI, V. L. A estrutura competitiva da indústria ervateira do Rio Grande do Sul. **Teoria e Evidência Econômica**. v. 7, n. 12, 1999, p. 49-68.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex Paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 3, 2006, p. 399-404.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**. v. 77, n. 3, 2005, p. 345–358.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**. v. 68, n. 22-24, 2007, p. 2722-2735.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**. v. 40, n. 03, 2007, p. 393–405.

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

CHUDA, Y.; SUZUKI, M.; NAGATA, T.; TSUSHIDA, T. Contents and Cooking Loss of Three Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, n. 4, 1998, p. 1437-1439.

CLIFFORD, M. N.; WIGHT, J. The measurements of feruloylquinic acids and caffeoylquinic acids in coffee beans. Development of the technique and its preliminary application to green coffee beans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 27, 1976, p. 73–84.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate leaf and beverage. **Food Chemistry**. n. 35, v. 1, 1990, p. 13-21.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, n. 3, 1999, p. 362-372.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, 2000, p. 1033-1042.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 10, 2003, p. 2900-2911.

CLIFFORD, M. N.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N.; ROOZENDAAL, H.; SALGADO, P. R. LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**. v. 106, 2008, p. 379-385.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 384 pag., 2006.

DAO, L.; FRIEDMAN, M. Chlorogenic Acid Content of Fresh and Processed Potatoes Determined by Ultraviolet Spectrophotometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 40, 1992, p. 2152-2150.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C; De MARIZ e MIRANDA, L. S.; SALVADO, E. Stability of 5-caffeoylquinic acid under different conditions of heating. **Food Research International**. v. 31, n. 6-7, 1998, p. 475-477.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; De MARIZ e MIRANDA L. S. The Content of Individual Caffeoylquinic Acids in Edible Vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 12, n. 4, 1999, p. 289-292.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**. v. 27, n. 04, 2004, p. 586-592.

DECKER, E. A. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrrolquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. **Nutritional Review**. v. 53, n. 03, 1995, p. 49-58.

DING, C-K.; CHACHIN, K.; UEDA Y.; IMAHORI, Y.; KUROOKA, H. Effects of High CO₂ Concentration on Browning Injury and Phenolic Metabolism in Loquat Fruits. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**. v. 68, n. 2, 1999, p. 275-282.

DORAN, P.M. Bioprocess Engineering Principles. Academic Press, 1995.

EIBL, B.; FERNANDEZ, R.; KOZARIK, J.; LUPI, A.; MONTAGNINI, F.; NOZZI, D. Agroforestry systems with *Ilex paraguariensis* (American holly or yerba mate) and native timber trees on small farms in Misiones, Argentina. **Agroforestry Systems**. v. 48, n. 1, 2000, p. 1–8.

ESMELINDRO M.C.; TONIAZZO G.; WACZUK A.; DARIVA C.; OLIVEIRA D. Caracterização Físico-Química da Erva-Mate: Influência das Etapas do Processamento Industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 22, n. 2, 2002, 193-204.

FAO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Mate Imports, Exports and Production.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **The European Journal of Cancer Prevention**. v. 8, n. 1, 1999, p.17-25.

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

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

FORSYTH, W.G.C. Physiological Aspects of Curing Plant Products. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 15, 1964, p. 443-450.

FRIEDMAN, M. Chemistry, Biochemistry, and Dietary Role of Potato Polyphenols. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, n. 5, 1997, p.1523-1540.

GOLDENBERG D. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**. v. 38, 2002, p. 646-649.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 35, n. 1, 1995, p. 47–56.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in Vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 224, n. 2, 1996, p. 338–344.

HALLOY, S. R. P.; REID, J. B. Growing yerba mate. In: Use of Climate, Soil and Crop Information for Identifying Potential Land Use Change in the Hokianga and Western Kaipara Region, (Wratt, D. ed.), Chap. 11, 2003, pp. 88-97.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Review: Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 8, 2007, p. 950-988.

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

HERTOG, M. G. L.; KROUMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**. v. 155, n. 4, 1995, p. 381-386.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. v. 51, IARC, Lyon: Who Press, 1991. 513p.

IUPAC (1976). Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal*, v.153, 1976, p. 23–31.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de Cromatografia*, COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Ed Unicamp. Campinas, 2006, 445 p.

KIKUGAWA, K.; HAKAMADA, T.; HASUNUMA, M.; KURECHI, T. Reaction of p-hydroxycinnamic acid derivatives with nitrite and its relevance to nitrosamine formation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. v. 31, n. 4, 1983, p. 780-785.

KAWAKAMI M., KOBAYASHI A. Volatile constituents of green mate and roasted mate. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. v. 39, 1991, p. 1275-1279.

LARANJINHA, J.; ALMEIDA, L.; MADEIRA, V. Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid. ***Free Radical Biology & Medicine***. v. 19, n. 03, 1995, p. 329–337.

LEVENSPIEL, O. *Engenharia das Reações Químicas*, 3ª. Edição, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2.000.

LI, H.; XIA, N.;BRAUSCH, I.; YAO, Y.; FÖRSTERMANN, U. Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. ***Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics***. v. 310, n. 03, 2004, p. 926-932.

LOURENÇO, R. S.; MEDRADO, M. J. S.; FOWLER, J. A P.; MOSELE, S. H. Influência do substrato no desenvolvimento de mudas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). ***Perspectiva***. v. 24, n. 88, 2000, p. 81–99.

LOWOR, S. T.; AMOAH, F. M. Effect of Drying Pre-Treatment and Drying Density on Ghanaian Robusta Green Coffee Quality. ***Journal of Biological sciences***. v. 8, n. 7, 2008, p. 1255-1257.

MACCARI JÚNIOR, A.; REISSMANN, C.B.; SANTOS, K.A.; RONCATO-MACCARI, L.; QUEIROZ, M.R.; FERNANDES, J.S.C.; OLISZESKI, A.; NEIVERTH, D.D. **Características da erva-mate para chimarrão elaborada com plantas de *Ilex paraguariensis* de três diferentes morfotipos**. In: 3º Congresso Sul-Americano da Erva-Mate, 2003, Chapecó. Anais Chapecó-SC: Organizadores, 2003, p. 1-9.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, n. 5, 2004, p.727-747.

MATTILA, P.; HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their product. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 20, n. 3-4, 2007, p 152-160.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RUCKER, N. G. de A. Diagnóstico e alternativas para a erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Curitiba: Seab/Deral, 1993. 141 p.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**. v. 60, n. 1, 1997, p. 67-71.

MENDES, R. M. de O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no Estado de Santa Catarina**. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

MOORES, R. G.; MCDERMOTT, D. L.; WOOD, T. R. Determination of Chlorogenic Acid in Coffee. **Analytical Chemistry**. v. 20, n. 7, 1948, p. 620-624.

MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. Effects of Thermal Treatment on Radical-scavenging Activity of Single and Mixed Polyphenolic Compounds. **Journal of Food Science**. v. 69, n. 1, 2004, p. 7-10.

MURATA, M.; KUROKAMI, C.; HOMMA, S. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 56, 1992, p. 1705-1710.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Review: Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. v. 1054, n. 1-2, 2004, p. 95-111.

NEGISHI, O.; NEGISHI, Y; YAMAGUCHI, F.; SUGAHARA, T. Deodorization with Kuding-cha Containing a Large Amount of Caffeoyl Quinic Acid Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 17, 2004, p. 5513-5518.

NEVES, V.A.; DA SILVA, M.A. Polyphenol Oxidase from Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 6, 2007, p. 2424-2430.

NUÑEZ, J. C.; KÄNZIG, R.G. **Secanza de yerba mate**. In: Winge, H.; Ferreira, A. G.; Mariath, J. E. A.; Tarasconi, L. C. Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul. PortoAlegre: UFRGS, 1995, p. 175-180.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10, 1983, Curitiba. **Anais**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p.17-36.

PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. **Journal of Food Science**. v. 44, n. 6, 1979, p. 1720-1722.

RHODES, M. J. C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**. v. 24, 1994, p. 1-20.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**. v. 22, n. 4, 1995, p. 5375-383.

RIVELLI, D. P.; SILVA, V. V. da; ROPKE, C. D.; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R. L. A.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n.2, 2007, p. 215-222.

SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 03, 2003, p. 571-581.

SALDAÑA, M. D. A., MOHAMED, R. S., BAER, M. G., MAZZAFERA, P. Extraction of purine alkaloids from mate (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 47, 1999, p. 3804-3808.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S.M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition.** v. 24, n. 3, 2005, p. 360–366.

SCHMALKO M.E.; MORAWICKI R.O.; RAMALLO, L.A. Simultaneous Determination of Specific Heat Capacity and Thermal Conductivity Using the Finite-difference Method. **Journal of Food Engineering.** v. 31, 1997, p. 531-540.

SCHMALKO, M. E.; MACIEL, S.; DELFEDERICO, L. E. Estudio de la Eficiencia Energética de un Secadero de Yerba Mate. In: 3º Congresso Sul-Americano da Erva-Mate. Chapecó, 2003.

SCHMALKO, M. E.; SCIPIONI, P. G.; FERREYRA, D. J. Effect of Water Activity and Temperature in Color and Chlorophylls Changes in Yerba Mate Leaves. **International Journal of Food Properties.** v. 8, n. 2, 2005, 313 – 322.

SEAB Paraná. Erva-mate – Prospecção Tecnológica da Cadeia Produtiva. Documento Executivo. Curitiba, 1997, 27 p.

SHARMA, R. K.; FISHER, T. S.; HAJALIGOL, M. R. Effect of reaction conditions on pyrolysis of chlorogenic acid. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.** v. 62, 2002, p. 281-296.

SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; MARTINS, R. C.; SEABRA, R. M.; FERREIRA, M. A. Principal component analysis as tool of characterization of quince (*Cydonia oblonga* Miller) jam. **Food Chemistry.** v. 94, n. 4, 2006, p. 504–512.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFSC / UFRGS, 1102p. 2004.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology.** v. 18, n. 1, 2006, p. 253-262.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Naturally occurring phenolics as antimutagenic and anticarcinogenic agents. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*, Friedman, M., Ed.; Plenum: New York, 1984; p 1–29.

STREIT, N. M.; HECKTHEUER, L. H. R.; CANTO, M. W. do; MALLMANN, C. A.; STRECK, L.; PARODI, T. V.; CANTERLE, L. P.; Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food chemistry**. v. 102, n. 3, 2007, p. 560-564.

TAKAHAMA, U. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. **Phytochemistry Reviews**. v. 3, 2004, p. 207–219.

TANAKA, T.; MORI, H. Prevention of experimental tumorigenesis in colon, liver and oral cavity by dietary chlorogenic and caffeic acids. *Seizième Colloque Scientifique International sur le Café*, ASIC, Paris, p. 79-87, 1995.

TAKENAKA, M.; KAZUKO, N.; ISOBE, S.; MURATA, M. Changes in Caffeic Acid Derivatives in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) during Cooking and Processing. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.70, n. 1, 2006, p. 172-177 .

TAMASI, O.P.; FILIP, R.; FERRARO, G.; CALVIÑO, A.M. Total Polyphenol Content and Perceived Astringency of Yerba Mate "*Ilex paraguariensis*" Infusions. **Journal of Sensory Studies**. v. 22, 2007, p. 653–664.

TRUGO, L. C; MACRAE, R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. **Analyst**, 109, 1984, p. 263–266.

TSAO, R.; DENG, Z., Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**. v. 812, n. 1-2, 2004, p. 85–99.

VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VANDERJAGT, T. J.; GHATTAS, R.; VANDERJAGT, D. J.; CROSSEY, M.; GLEW, R. H. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, 2002, p. 1035–1040.

VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P. Studies on mate drinking. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 18, n. 3, 1986, p. 267–272.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Variabilidade genética em um ensaio de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciencia Rural**. Santa Maria, v. 32, n. 4, 2002, p. 583-587.

VILCAHUAMAN, L. J. M. **Caracterización y evaluación económica del sistema agroflorestal yerba mate en el sur de Brasil: un enfoque financeiro, de optimización y de riesgo**. 140 f. Thesis Doctor, Institucion de Ensenanza e Investigaciomen Ciencias Agrícolas, México, 1999.

VILLEGAS, R.J.A.; SHIMOKAWA, T.; OKUYAMA, H.; KOJIMA, M. Purification and characterization of chlorogenic acid: chlorogenate coffeoyl transferase in sweet potato roots. **Phytochemistry**. v. 26, n. 6, 1987, p. 1577–1581.

VINSON, J.; DABBAGH, Y.; SERRY, M. M.; JANG, J. Plant polyphenols, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43, 1995, p. 2800-2802.

ZAMPIER, A. C.; **Avaliação dos níveis de nutrientes, cafeína e taninos após adubação mineral e orgânica, e sua relação com a produtividade na erva-mate (*Ilex paraguariensis st hil.*)**. Dissertação de mestrado- Universidade Federal do Paraná; 2001.

ZANOELO, E. F.; DI CELSO G. M.; KASKANTZIS, G. Drying kinetics of Mate Leaves in a Packed Bed Dryer. **Biosystems Engineering**. v. 96, n. 4, 2007, p. 487-494.

ZANOELO, E. F., CARDOZO FILHO, L., NASCIMENTO FILHO, I., CARDOZO JÚNIOR, E. L. Um Novo Conceito de Processo para a Indústria Ervateira. 3º CONGRESSO SUL AMERICANO DE ERVA-MATE, Chapecó, v. 6, 2003, p. 1-6.

ZANOELO, E. F. Equilibrium Moisture Isotherms for Mate Leaves. **Biosystems Engineering**. v. 92, n. 4, 2005, p. 445-452.

ZANOELO, E. V.; CARDOZO-FILHO, L.; CARDOZO-JÚNIOR, E. L. Superheated Steam-Drying of Mate Leaves and Effect of Drying Conditions on the Phenol Content. **Journal of Food Process Engineering**. v. 29, n. 03, 2006, p. 253–268.

WEDWORTH, S.; LYNCH, S. Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention. **The Annals of Pharmacotherapy**. v. 29, n. 6, 1995, p. 627-628.

WENDT, S. N. **Genética de Populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

WILDMAN, R. E. C. Classifying nutraceuticals. In: Handbook of nutraceuticals and functional foods. Boca Raton, FL: CRC Press. 2001, p. 13–30.