

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

Coproduto de *Ilex paraguariensis*: extração de ácidos clorogênicos,
encapsulamento, estabilidade e aplicação em bolos

Bruna Trindade Paim

Pelotas, 2023.

Bruna Trindade Paim

Coproduto de *Ilex paraguariensis*: extração de ácidos clorogênicos,
encapsulamento, estabilidade e aplicação em bolos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Dillenburg Meinhart

Co-orientadores: Prof^a Dr^a Vanessa Galli e Prof^a Dr^a Vania Zanella Pinto

Pelotas, 2023.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

P142c Paim, Bruna Trindade

Coproduto de *Ilex paraguariensis* [recurso eletrônico] : extração de ácidos clorogênicos, encapsulamento, estabilidade e aplicação em bolos / Bruna Trindade Paim ; Adriana Dillenburg Meinhart, orientadora ; Vanessa Galli, Vania Zanella Pinto, coorientadoras. — Pelotas, 2023.
75 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Análise multivariada. 2. Eficiência de encapsulamento. 3. Ervamate. 4. Preipitação. 5. Bolos. I. Meinhart, Adriana Dillenburg, orient. II. Galli, Vanessa, coorient. III. Pinto, Vania Zanella, coorient. IV. Título.

CDD 633.77

Bruna Trindade Paim

Coproduto de *Ilex paraguariensis*: extração de ácidos clorogênicos,
encapsulamento, estabilidade e aplicação em bolos

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel Universidade
Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/12/2023.

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Adriana Dillenburg Meinhart. Doutora em Ciência de Alimentos pela
Universidade Estadual de Campinas.

Prof^a Dr^a Vania Zanella Pinto. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela
Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a Dr^a Elessandra da Rosa Zavareze. Doutadora em Engenharia e Ciência de
Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

Prof. Dr Alexandre Lorini. . Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela
Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr Milton de Jesus Filho. Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade
Estadual de Campinas.

Dr^a Sílvia Leticia Rivero Meza. Doutora em Ciências dos Alimentos pela
Universidade de São Paulo.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Profª Drª Adriana Dillenburg Meinhart, pelos ensinamentos e contribuições que foram fundamentais para que esse caminho fosse trilhado. Agradeço a orientação e atenção durante todas as etapas de execução do projeto, fazendo com que eu me tornasse uma profissional e pesquisadora melhor. Além de me receber em sua casa com a sua família.

À Profª Drª Vanessa Galli, por todos ensinamentos compartilhados.

À Profª Drª Vania Zanella Pinto, por me abrir as portas da sua casa, por disponibilizar seu conhecimento e laboratório para o desenvolvimento da pesquisa, tornando a jornada incrível.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar, sugerir e contribuir para o engrandecimento desse trabalho.

Aos meus pais, em especial minha mãe Jaqueline e meu padrasto Nelcy, por estarem sempre ao meu lado, dando apoio e suporte para que eu conquiste meus sonhos. Obrigada pelo amor, carinho e dedicação para comigo. Amo vocês!

Aos meus irmãos Renan e Dimitri, por sempre me incentivar e vibrar junto com minhas conquistas.

Ao meu marido Pedro, pelo carinho e compreensão nos momentos mais difíceis da jornada, obrigada por entender minhas ausências e por me encorajar a seguir, mesmo distante se fazendo presente todos os dias, te amo!

À toda minha querida família, em especial *In memoriam* a minha amada avó Branca.

Aos colegas e amigos de laboratório, em especial Laura, Yasmin e Thamyres, por me ajudarem sempre que necessário e por tornarem os dias na bancada melhores.

Aos meus colegas de grupo, por cada meme, cada risada no dia, por casa louça lavada, por compartilhar os momentos de trabalho comigo, minha gratidão.

À CAPES, pelo apoio financeiro à pesquisa (Fonte de recursos 01) e bolsa de doutorado, à Associação dos Produtores de Erva Mate de Machadinho (APROMATE), à Barão Comércio e Indústria de Erva Mate LTDA pelo fornecimento de amostras à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (PQ Gaúcho 192551-0001637-9). A Universidade Federal da Fronteira Sul (Campos Laranjeiras do Sul), bem como a Universidade de São Paulo (Campus Piracicaba), pelas parcerias durante a realização do trabalho.

Esse trabalho aconteceu em grupo e com ajuda de diversas pessoas as quais eu tenho imenso agradecimento, laboratórios das universidades parceiras, familiares dos professores, amigos, me auxiliaram de diversas formas a chegar aqui.

Obrigada a todos que, de alguma forma, fizeram parte deste caminho percorrido e torceram por mim.

*“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente”- **Henfil***

Resumo

PAIM, Bruna Trindade. Coproduto de *Ilex paraguariensis*: extração de ácidos clorogênicos, encapsulamento, estabilidade e aplicação em bolos. Orientadora: Adriana Dillenburg Meinhart. 2023. 75f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Na colheita de *Ilex paraguariensis* são gerados resíduos agrícolas (talos grossos descartados durante a poda de colheita), os quais atualmente são depositados no solo. A parte externa deste resíduo (aqui denominado de coproduto de *Ilex paraguariensis* - IPC) tem elevada concentração de ácidos clorogênicos, mas ainda não é explorado comercialmente. Mostramos que é possível otimizar a extração de ácidos clorogênicos (17 min (-0,46), 82 °C (1,47) e 0,58 g de coproduto de *Ilex paraguariensis* (-0,09),) de IPC e encapsular o mesmo, pela técnica de precipitação antissolvente (zeína (1,36 g) gotejada (18,14mL/h) sobre água sob agitação (4 rpm)) e spray-drying (10,1 vazão de alimentação (mL/h); 118,1 temperatura de entrada (°C); 86,8 quantidade de extrato adicionadas no polímero carreador (v/v)), obtendo extratos encapsulados com elevada eficiência de encapsulamento e melhor resistência térmica quando comparado ao extrato livre. Para tanto, três planejamentos multivariados 2³ completos foram utilizados para encontrar as condições ótimas de extração e de encapsulamento. Os extratos apresentaram concentração de 10,16 g ácidos clorogênicos por 100 g de IPC e baixa toxicidade em modelos *in vivo* de *Galleria mellonella*. Os mesmos foram encapsulados por precipitação antissolvente com 94% de eficiência de encapsulamento e estabilidade térmica até 357,5 °C. Através da técnica de spray-drying foram obtidos encapsulados com 75,2% de eficiência de encapsulamento e estabilidade térmica até 338,1°C. A eficiência de carregamento foi superior pela técnica de spray-drying, enquanto o tempo para obtenção dos encapsulados foi menor. Por isso, os encapsulados obtidos por spray-drying foram escolhidos para aplicação em produtos forneados. Quando as cápsulas foram aplicadas em produtos forneados foram preservados 94% dos ácidos clorogênicos. Os métodos de extração e encapsulamento são simples e de fácil ampliação para escala industrial. Considerando a quantidade de ácidos clorogênicos extraídos do IPC e a resistência térmica das cápsulas em temperaturas de forneamento, os resultados do presente estudo evidenciam alta viabilidade para a incorporação do extrato de

IPC em alimentos e melhorar a qualidade funcional da dieta.

Palavras-chave: Análise multivariada, eficiência de encapsulamento, erva-mate, precipitação, bolos.

Abstract

PAIM, Bruna Trindade. *Ilex paraguariensis* co-product: extraction of chlorogenic acids, encapsulation, stability and application in cakes. Advisor: Adriana Dillenburg Meinhart. 2023. 75f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) – Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

When harvesting *Ilex paraguariensis*, agricultural residues are generated (thick stalks discarded during harvest pruning), which are currently deposited in the soil. The external part of this residue (here called *Ilex paraguariensis* co-product - IPC) has a high concentration of chlorogenic acids, but it is not yet commercially exploited. We show that it is possible to optimize the extraction of chlorogenic acids (17 min (-0.46), 82 °C (1.47) and 0.58 g of *Ilex paraguariensis* coproduct (-0.09),) from IPC and encapsulate the same, using the anti-solvent precipitation technique (zein (1.36 g) dripped (18.14mL/h) onto water under stirring (4 rpm)) and spray-drying (10.1 feed flow rate (mL/h); 118.1 inlet temperature (°C); 86.8 amount of extract added to the carrier polymer (v/v)), obtaining encapsulated extracts with high encapsulation efficiency and better thermal resistance when compared to the free extract. To this end, three complete 2³ multivariate plans were used to find the optimal extraction and encapsulation conditions. The extracts had a concentration of 10.16 g chlorogenic acids per 100 g of IPC and low toxicity in *in vivo* models of *Galleria mellonella*. They were encapsulated by anti-solvent precipitation with 94% encapsulation efficiency and thermal stability up to 357.5 °C. Using the spray-drying technique, encapsulates were obtained with 75.2% encapsulation efficiency and thermal stability up to 338.1°C. The loading efficiency was higher using the spray-drying technique, while the time to obtain the encapsulates was shorter. Therefore, the encapsulates obtained by spray-drying were chosen for application in baked products. When the capsules were applied to baked products, 94% of the chlorogenic acids were preserved. The extraction and encapsulation methods are simple and easy to scale up to an industrial scale. Considering the amount of chlorogenic acids extracted from IPC and the thermal resistance of the capsules at baking temperatures, the results of the present study show high feasibility for incorporating the IPC extract into foods and improving the functional quality of the diet.

Keywords: Multivariate analysis, encapsulation efficiency, yerba mate, precipitation, cakes.

Sumário

1.INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1.Coproducto de <i>Ilex paraguariensis</i>	16
2.2 Ácidos clorogênicos	17
2.3 Estabilidade e Encapsulamento	18
3.HIPÓTESES	22
4.OBJETIVOS	22
4.1.Objetivo geral	22
4.2.Objetivos específicos	22
5 CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	23
6 CAPÍTULO 2 – ARTIGO 2	33
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	69

1 Introdução

Ilex paraguariensis é rica em ácidos clorogênicos, compostos fenólicos encontrados tanto em suas folhas como nos talos da planta (PAGLIOSA et al, 2009; LORINI et al, 2021). A planta é comumente consumida em bebidas como chá, chimarrão e tererê, especialmente nos países da América do Sul. Os ácidos clorogênicos são reconhecidos por possuírem propriedades bioativas (MEINHART et al, 2017). Seu consumo está associado a diversos benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, redução do risco de tumores, propriedades antimicrobianas, diuréticas e hipocolesterolêmicas (PO et al., 2012; PRADO MARTIN et al., 2013; KIM et al., 2015; LOBO et al., 2020; KALTBACH et al., 2022).

Durante a colheita do herval para utilização das folhas e talos finos (menor que 10 mm) pela indústria ervateira, são realizadas podas nas árvores para redução da altura das mesmas, o que gera de 2 à 5 toneladas de talos grossos (diâmetro superior a 10 mm) por colheita, que ocorre a cada 12-18 meses. Recentemente, esse resíduo foi objeto de estudo, e foram identificados os compostos (ácidos clorogênicos, flavonoides, saponinas e outros não identificados) presentes na parte externa do material na concentração de 12,9 g/100 g (LORINI et al, 2021). O teor de compostos fenólicos totais e o potencial antioxidante presentes no resíduo foram maiores do que os encontrados nas folhas da planta (LORINI et al, 2022). No entanto, esse resíduo ainda é pouco explorado, e seus compostos bioativos podem ser transformados ou preservados para diversas aplicações dado o potencial funcional dos compostos presentes.

A extração dos ácidos clorogênicos é influenciada por diversos fatores, como a técnica de extração, a polaridade, seletividade, presença ou não de agitação, temperatura, saturação do meio extrator, tempo e tipo de solvente extrator (STREIT et al., 2007; MERCADO et al., 2018; FENOGLIO et al., 2021). Para ácidos clorogênicos, os quais são instáveis à presença de luz, calor, oxigênio e temperaturas brandas ou aquecimento, preservar os mesmos e incorporá-los em produtos para conferir funcionalidades à um produto alimentício é um aspecto desafiador (FENOGLIO et al., 2021; KAMALI et al., 2021; LOPES; SANTOS; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2021).

Existem várias técnicas para preservar compostos sensíveis à temperatura,

fotosensíveis e de fácil degradação (KAMALI et al., 2021). Uma delas é a microencapsulação, que envolve a incorporação de compostos por outro material mais resistente, resultando na formação de micropartículas capazes de liberar seu conteúdo sob condições específicas. A qualidade e as propriedades das micropartículas geradas durante o processo de encapsulação são influenciadas pelas condições experimentais empregadas no processo (KALTBACH et al., 2022).

A técnica de precipitação antissolvente se destaca como um método promissor e simples para a produção de nanopartículas (KRINGEL et al, 2020). Além dessa o método por spray-drying é uma abordagem tradicionalmente usada na produção de partículas em setores como alimentos, indústria química, bioquímica e farmacêutica (JIE et al., 2020; ELHAM; KALAJAHI; GHANDIHA, 2022).

A escolha do material de parede para a produção de cápsulas é de suma importância para garantir aplicações futuras bem-sucedidas. Nesse contexto, a zeína, uma prolamina derivada do milho, se destaca como uma matriz solúvel em solução aquosa de etanol 55% a 90% (v/v). Devido ao seu alto teor de aminoácidos hidrofóbicos, a zeína possui baixa solubilidade em água, o que torna possível utilizá-la como agente encapsulante, além de apresentar propriedades anfífilas e força motriz para automontagem em micro e nanopartículas (JIE et al., 2020; LIU et al., 2020; COELHO et al., 2021). Essas características tornam a zeína promissora para a aplicação em revestimentos na indústria de alimentos e medicamentos.

O tipo de extrato (aquoso, hidroalcoólico, alcoólico) para aplicação em cápsulas pode interferir na eficiência do encapsulamento, afetando a formação das cápsulas de maneira positiva ou negativa. A opção por solventes considerados verdes, como água e etanol de baixa toxicidade ao consumo humano, oferece benefícios adicionais (PILATTI et al, 2019; LORINI et al, 2021; FENOGLIO et al., 2021).

A otimização das extrações para aplicações futuras é fundamental para estimar os efeitos de interações entre variáveis, permitindo estabelecer modelos matemáticos que descrevam o comportamento das variáveis analisadas e empregá-los para a predição de condições ótimas. Derringer e Suich desenvolveram um método para combinar modelos de diversas variáveis dependentes (como diversos compostos ou características dos encapsulados) que

permite prever as condições ideais para atender a desejabilidade global de todas as respostas e extrair o máximo de informação acerca das variáveis independentes. Esse método facilita a otimização de métodos ou processos que tenham muitas variáveis independentes e dependentes (BUNS et al, 1997).

Com esse propósito, este trabalho foi dividido em dois estudos. O primeiro tem como objetivo otimizar a obtenção do extrato rico em ácidos clorogênicos a partir do coproduto de *Ilex paraguariensis* e encapsular os mesmos por precipitação antissolvente. O segundo estudo encapsulou os ácidos clorogênicos por outra técnica de spray drying, e sua aplicação do em produto forneado.

2 Revisão de Literatura

2.1 Coproduto de *Ilex paraguariensis*

Para produzir erva mate, erva para tererê, chá mate e outros produtos que contenham *Ilex paraguariensis*, as folhas e talos finos (talos com menos de 10 mm de diâmetro) são colhidos dos hervaís a cada 12-18 meses. No entanto, durante essa colheita, os agricultores realizam a poda das plantas com o intuito de controlar a altura para viabilizar a próxima colheita. Dessa forma, ocorre uma poda durante a colheita, que resulta em talos com diâmetros superiores a 10 mm (talos que não são utilizados nos produtos comerciais) como subproduto agrícola (PAGLIOSA, 2009).

O resíduo resultante da poda de colheita é constituído por uma porção interna (xilema) e uma porção externa (floema), composta por uma camada de epiderme que continua crescendo juntamente com a planta (TAIZ et al., 2017). A Figura 1 mostra o processo da poda, resultando no resíduo da colheita da erva-mate.



Figura 1. Colheita da *Ilex paraguariensis*. Fonte: Autor, 2023.

PAGLIOSA (2009) foi o primeiro autor a realizar estudos e constatou que são geradas entre 2 e 5 toneladas de talos grossos (com diâmetro superior a 10 mm), os quais não são aproveitados pela indústria ervateira como produto comercial. Este subproduto ainda é pouco explorado pela indústria de erva-mate, pois não é viável para queima em caldeiras devido à sua baixa capacidade calorífica (valorização térmica) e não é utilizado como biomassa para produção de biocombustíveis, restando apenas a possibilidade de aproveitamento químico e biológico.

Outro autor que investigou o coproduto foi LORINI et al. (2021), que analisou os compostos presentes nesse resíduo agrícola, avaliou a diferença dos compostos em diferentes sistemas de cultivo (pleno sol e sombreado), além de analisar individualmente a parte interna e externa do material. Lorini e colaboradores constataram que a parte externa contém 35 compostos bioativos, que correspondem a 12,9 g 100 g⁻¹, sendo que o cultivo em pleno sol apresentou maior teor de compostos fenólicos que o cultivo em ambiente sombreado. Constataram ainda, que a parte externa do coproduto é rica em ácidos fenólicos como o quínico, 3-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-ácidos dicafeoilquínicos.

Em um novo estudo realizado por LORINI et al. (2022), otimizou-se o processo de extração dos compostos do coproduto, na condição ótima foram extraídos 55 compostos, sendo descobertos 8 compostos que não haviam sido identificados anteriormente. Por um método considerado verde de extração (à base de etanol:água), foi possível extrair 15,07 g de compostos fenólicos por 100 g de coproduto. Além disso, demonstrou capacidade de inibição de *Staphylococcus aureus*. HECK et al. (2021) utilizaram o coproduto de *Ilex paraguariensis* liofilizado na produção de seus hambúrgueres, apresentando um potencial antioxidante de um extrato natural em produtos cárneos, trazendo uma aplicação diferenciada ao coproduto.

Diante dos relatos dos poucos trabalhos realizados com coproduto de *Ilex paraguariensis*, novos estudos são necessários para uma aplicação do produto para uma comercialização.

2.2 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos são os mais abundantes no coproduto de *Ilex paraguariensis*, constituindo mais de 70% da concentração total de compostos bioativos (LORINI et al, 2022). Em sua estrutura, os ácidos clorogênicos contêm ácido cafeico e ácido quínico, unidos por uma reação de esterificação (Figura 2). Existem vários isômeros desses ácidos, dependendo da posição em que a reação entre os dois ácidos ocorre. Além disso, mais de um ácido cafeico pode ser incorporado à molécula, formando assim os ácidos di-cafeoilquínicos ou tri-cafeoilquínicos, que também pertencem à classe dos ácidos clorogênicos. Ele é formado por grupos alifáticos e aromáticos e é um dos principais componentes polifenólicos que existem em muitas culturas frutíferas, como maçãs, (BOYER & LIU, 2004) pêssegos, (ANDREOTTI et al., 2008) abacaxis, (CAMPOS et al., 2020) mirtilos, (RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2012) sementes de café e folhas de tabaco (YONEYAMA et al., 2008).

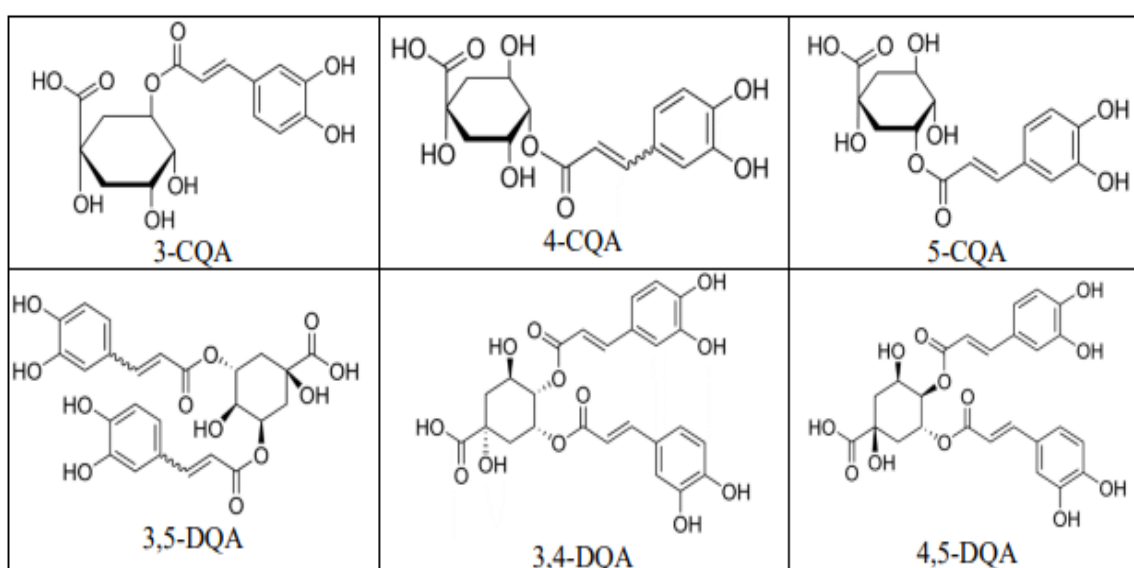


Figura 2. Estrutura geral da classe dos ácidos clorogênicos, 3-cafeiolquímico (3-CQA), 4- cafeiolquímico (4-CQA), 5-cafeiolquímico (5-CQA), 3,5-dicafeiolquímico (3,5-DQA), 3,4- dicafeiolquímico (3,4-DQA) e 4,5- dicafeiolquímico (4,5-DQA). Fonte: Autor, 2023.

Esses ácidos clorogênicos principais (Figura 2) o cafeiolquímico com os isômeros 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA) dicafeiolquímico, com os isômeros 3,5-DQA, 3,4-DQA e 4,5- DQA (Figura 1) e menos frequentes, o ferruloilquimico com 3 isomeros 3-FQA, 4-FQA e 5- FQA, o p-coumaroilquinico com 3 isomeros 3-pCoQA,

4-pCoQA e 5-pCoQA, além de 6 mixes de di-ésteres de ferruloilquímico (CFAQ) (CLIFFORD et al., 2003).

2.3 Encapsulamento

A estabilidade dos ácidos clorogênicos é diminuída pela presença de luz, temperatura branda ou aquecimento, presença de oxigênio e outras substâncias catalisadoras que podem estar na planta ou no método de extração (LÓPEZ-CÓRDOBA et al., 2014; NIU et al., 2022). Técnicas como a encapsulação consistem no aprisionamento de um determinado composto com o objetivo de protegê-lo contra condições de degradação, ou para manter as características sensoriais da substância encapsulada, ou permitir uma liberação controlada desse composto no trato gastrointestinal (DELADINO; NAVARRO; MARTINO, 2013; LIU et al., 2020; ESPEJO-CARPIO; GUADIX; GUADIX, 2023).

As cápsulas podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho: macro ($\geq 5000 \mu\text{m}$), micro (entre $0,2\text{-}5000 \mu\text{m}$) ou nanocápsulas (menos de $0,2 \mu\text{m}$). Se o núcleo estiver claramente ligado ao centro da cápsula, rodeado por uma película contínua de material de parede, é considerada uma microcápsula, enquanto que se o núcleo estiver uniformemente disperso na matriz, é denominada microesfera. São utilizados materiais de revestimento específicos, que incluem uma variedade de carboidratos, lipídios e proteínas (NUNES et al., 2015; PILATTI-RICCIO et al., 2019; TCHABO et al., 2019).

Inúmeras técnicas podem ser empregadas para o encapsulamento. A principal diferença entre elas está no tipo de aprisionamento do material a ser encapsulado pelo agente encapsulante, seja pela natureza física, química ou físico-química (CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2014; FENOGLIO et al., 2021; OIKONOMOPOULOU et al., 2022). A escolha do método de encapsulamento depende das propriedades do material a ser encapsulado (principalmente solubilidade) e do tipo de partícula, além da finalidade desejada (proteção e/ou liberação) e aplicação, se houver (JIE et al., 2020; HUANG; LI; LI, 2023).

A precipitação antissolvente (Figura 3) torna a zeína insolúvel e precipita para formar nanopartículas quando a concentração de etanol diminui, formando estruturas menos ordenadas (KRINGEL et al, 2020). A zeína contém propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas que podem ser convertidas em nanopartículas coloidais

esféricas. O encapsulamento por precipitação antissolvente é bem descrito para compostos apolares, utilizando zeína como carreador ou material encapsulante.(SHUKLA; CHERYAN, 2001; LIU et al., 2020; YUAN et al., 2022).



Figura 3. Figura do processo de encapsulamento por precipitação antissolvente. Fonte: Autor, 2023.

O rspray-drying (Figura 4) é uma técnica amplamente utilizada na indústria de alimentos para a produção de pós e partículas secas a partir de soluções ou suspensões líquidas. Esse processo é essencial para a encapsulação de compostos bioativos, como ácidos clorogênicos, visando preservar suas propriedades funcionais e protegê-los de condições adversas. Por meio do spray-drying, as soluções são atomizadas em uma câmara de secagem com ar quente, resultando na rápida evaporação do solvente e na formação de partículas secas. Esse método oferece vantagens significativas, incluindo alta eficiência de encapsulamento, além da preservação das propriedades funcionais dos compostos encapsulados (RIBEIRO et al, 2019).

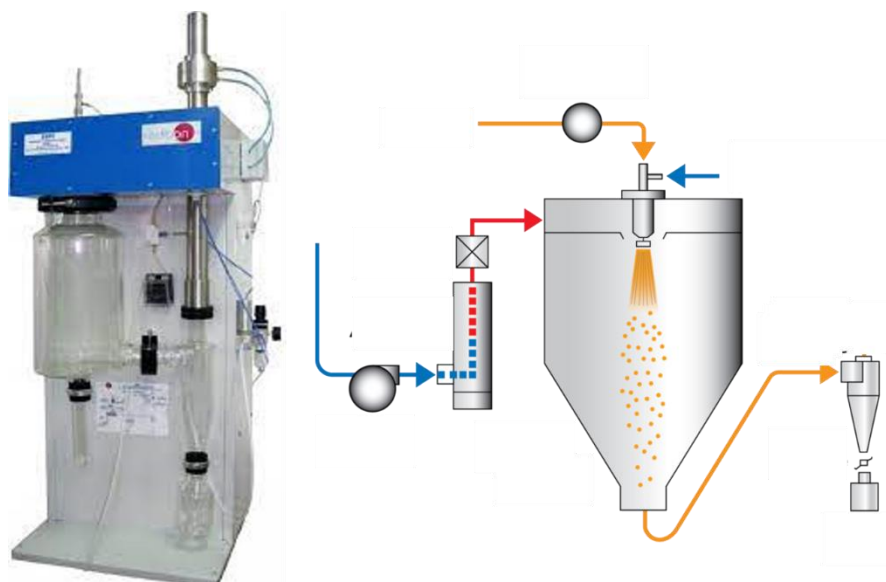


Figura 4. Spray-drying. Fonte: Autor, 2023.

A técnica de spray-drying tem sido investigada e aplicada com sucesso para a produção de cápsulas contendo bioativos. ELHAM; KALAJAHI; GHANDIHA, (2022) otimizar as condições de secagem do spray drying em extrato de urtiga, aumentando a estabilidade quando encapsulamento. O emprego da técnica de atomização em extrato de noz pecã, apresentou grande potencial para conservação dos compostos (KURECK et al., 2018). Para preservar os compostos presentes no cupuaçu, uma otimização da técnica foi empregada, resultando em microesferas com em condições simuladas de fluido intestinal 76,7 %, promissor na preservação e liberação controlada após o encapsulamento (FRANCIS et al., 2023). Esta abordagem é promissora na indústria de alimentos, pois permite a incorporação controlada de compostos bioativos em uma variedade de produtos alimentícios, oferecendo benefícios funcionais e nutricionais aos consumidores.

Diante do exposto, nessa pesquisa se destaca a importância dos ácidos clorogênicos para a saúde humana, o que gera perspectivas promissoras para a indústria alimentícia, especialmente no desenvolvimento de produtos funcionais. Adicionalmente, através da extração, encapsulamento e aplicação é enfatizado o potencial social de valorização de produtos oriundos de pequenos agricultores por meio da exploração desse coproduto, o qual ainda não foi explorado pela indústria alimentícia.

3. Hipóteses

O coproduto de *Ilex paraguariensis* é uma fonte para extração de alto teor de ácidos clorogênicos que, após encapsulados, podem ser incorporados em produtos forneados como em bolos, o que resultará em alimentos com elevada preservação dos ácidos clorogênicos em relação aos ácidos clorogênicos não encapsulado, tal como a melhor qualidade funcional desses produtos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo Geral

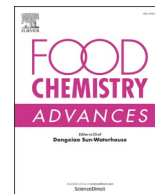
Avaliar o processo de extração dos ácidos clorogênicos, bem como aos processos de encapsulamentos por técnicas diferentes, com o propósito de preservar os ácidos e investigar sua estabilidade, assim como uma aplicação.

4.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a extração de um extrato rico em ácidos clorogênicos, a partir do coproduto de *Ilex paraguariensis*, utilizando técnicas multivariadas.
- Obter a melhor condição de extração para encapsular os ácidos clorogênicos do coproduto de *Ilex paraguariensis*.
- Avaliar o extrato encapsulado em relação a quantidade de ácidos clorogênicos totais presentes no coproduto de *Ilex paraguariensis*.
- Encapsular o extrato do coproduto de *Ilex paraguariensis* por precipitação antissolvente, por técnicas multivariadas.
- Encapsular por spray drying o extrato do coproduto de *Ilex paraguariensis*, por técnicas multivariadas
- Aplicar os encapsulados e o extrato de coproduto de *Ilex paraguariensis* ricos de ácidos clorogênicos por spray drying e avaliar em bolos.

5 Capítulo 1 Artigo 1

PAIM, B. T. et al. Exploring the Potential of *Ilex Paraguariensis* Coproduct: High Concentration of Chlorogenic Acids and Enhanced Thermal Stability. **Food Chemistry Advances**, v. 3, tn. September, p. 100524, 2023.



Exploring the potential of *Ilex paraguariensis* coproduct: High concentration of chlorogenic acids and enhanced thermal stability

Bruna Trindade Paim^a, Alexandra Lizandra Gomes Rosas^a, Alexandre Lorini^a, Vania Zanella Pinto^b, Gisele Louro Peres^b, Elessandra da Rosa Zavareze^a, Vanessa Galli^a, Helen Cristina dos Santos Hackbart^a, Dianini Hüttner Kringel^c, Adriana Dillenburg Meinhart^{a,*}

^a Department of Food Science and Agrotechnology, Federal University of Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS 96105-900, Brazil

^b Federal University of Federal da Fronteira Sul (UFFS), Laranjeiras do Sul, PR 85301-970, Brazil

^c University of Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS 99001-970, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Multivariate analysis
Encapsulation efficiency
Yerba mate
Precipitation
Carrier material

ABSTRACT

Five tons, per hectare, of thick stems of *Ilex paraguariensis* are generated each harvest the external part of these (IPC) has a high concentration of chlorogenic acids but is not yet commercially exploited. Thus, it is hypothesized that the coproduct of *I. paraguariensis* when submitted to optimized extraction conditions will result in extracts rich in chlorogenic acids. Furthermore, optimized encapsulation by anti-solvent precipitation with zein ensures improved thermal stability. Multivariate strategies were successfully employed to obtain extraction of 10.16 g chlorogenic acids per 100 g IPC in 75 % ethanol. The mixture of IPC extract (15 mL) and zein (1.36 g) dripped (18.14 mL h⁻¹) on the water under stirring (4 rpm) results in encapsulated with 94 % efficiency and thermal stability of up to 357.5 °C. We show that it is possible to optimize the extraction of chlorogenic acids and encapsulate them in a fast and efficient way for easy industrial expansion. The high amount of chlorogenic acids and the thermal resistance of the encapsulates indicate that applications in foods exposed to heat are highly promising for the valorization of this natural resource not commercially exploited, in line with the concepts of the circular economy.

1. Introduction

The production of *Ilex paraguariensis* in South America has economic and cultural importance, with 506 thousand tons produced, only in Brazil, in 2021 (IBGE, 2021). *I. paraguariensis* has several compounds of interest in its chemical composition, with an outstanding concentration of chlorogenic acids in the leaves (~10 % w/w) (Lorini et al., 2021). During the harvest of leaves and fine stems (<10 mm), which are raw materials to produce yerba mate for *chimarrão*, mate tea and yerba mate for *tererê*, are generated about 5 tons per hectare of stems thicker than 10 mm. These wastes have no commercial use and are left on the harvest ground. The epidermis of these branches represents about 30 % of the total weight and has chlorogenic acid concentration similar to that found in the leaves, which makes this epidermis an unexplored coproduct source of bioactive compounds. Among the major compounds of this coproduct, between 11.1 and 11.8 % are chlorogenic acids (m/m), in addition to the presence of other acids, sugars, saponins,

alkaloids and others (Lorini et al., 2021, 2022).

Chlorogenic acids (3-caffeoylquinic Acid (3-CQA), 4-caffeoylquinic Acid (4-CQA), 5-caffeoylquinic Acid (5-CQA), 3,4-dicaffeoylquinic Acid, 3,5-dicaffeoylquinic (3,4-DQA), 3,5- dicaffeoylquinic (4-CQA)) present in *I. paraguariensis* have several properties ranging from antioxidant activity by free radical scavenging (DPPH and ABTS), *in vitro* antiviral, antibacterial activities, inhibition of tumor cells, blood glycemic control and dyslipidemia, and anti-inflammatory action (Pinto et al., 2023). Thus, maximizing and optimizing the extraction of these compounds from different residues or agroindustrial coproducts promotes the recovery, and diversification of products and applications (Jovanović et al., 2022) and ensures the rational use of natural resources in the context of the circular economy. However, chlorogenic acids are extremely unstable when in solutions even upon refrigeration and room temperature storage (Luo et al., 2023). So, the encapsulation is a promising alternative for increase their stability allowing applications in food and drugs (Chacon et al., 2023).

* Corresponding author.

E-mail address: adrianadille@gmail.com (A.D. Meinhart).

<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100524>

Received 29 June 2023; Received in revised form 23 September 2023; Accepted 8 November 2023

Available online 9 November 2023

2772-753X/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Table 1Coded and decoded variables and responses of the multivariate design to obtain an extract from the coproduct of *I. paraguariensis* (IPC).

Coded variables and levels ⁽¹⁾			Decoded variables and levels			Concentration of compounds (g 100 ⁻¹) ⁽²⁾						
A	B	C	Time (min)	Temperature (°C)	IPC Weight (g)	5-CQA	3-CQA	4-CQA	3,4-DQA	3,5-DQA	4,5-DQA	Sum
-1	-1	-1	12.1	41.1	0.3	0.99	1.81	0.85	0.25	1.87	2.21	7.98
1	-1	-1	32.9	41.1	0.3	1.22	2.21	1.07	0.37	2.32	2.71	9.90
-1	1	-1	12.1	73.9	0.3	1.26	2.35	1.14	0.58	2.71	2.95	10.99
1	1	-1	32.9	73.9	0.3	1.32	2.54	1.18	0.36	2.19	2.92	10.53
-1	-1	1	12.1	41.1	0.8	0.91	1.64	0.77	0.20	1.51	1.88	6.91
1	-1	1	32.9	41.1	0.8	1.10	2.00	0.99	0.29	1.86	2.35	8.59
-1	1	1	12.1	73.9	0.8	1.14	2.16	1.00	0.30	2.03	2.64	9.28
1	1	1	32.9	73.9	0.8	1.22	2.33	1.07	0.34	1.99	2.76	9.72
-1.68	0	0	5	57.5	0.6	1.11	2.00	0.93	0.27	2.11	2.52	8.94
1.68	0	0	40	57.5	0.6	1.22	2.30	1.07	0.54	2.26	2.58	9.98
0	-1.68	0	22.5	30	0.6	1.03	1.85	0.91	0.45	2.10	2.25	8.59
0	1.68	0	22.5	85	0.6	1.19	2.28	1.02	0.32	1.82	2.59	9.23
0	0	-1.68	22.5	57.5	0.1	1.26	2.49	1.09	0.56	2.61	2.75	10.75
0	0	1.68	22.5	57.5	1	1.10	2.03	0.99	0.51	2.04	2.37	9.05
0	0	0	22.5	57.5	0.6	1.15	2.11	1.03	0.54	2.54	2.63	10.01
0	0	0	22.5	57.5	0.6	1.23	2.30	1.13	0.57	2.70	2.91	10.84
0	0	0	22.5	57.5	0.6	1.13	2.22	1.02	0.54	2.46	2.64	10.00
0	0	0	22.5	57.5	0.6	1.20	2.28	1.07	0.34	2.38	2.91	10.17

⁽¹⁾ A: Time (min), B: Temperature (°C); C: IPC weight (g); ⁽²⁾ 5-CQA: 5-caffeoylquinic acid; 3-CQA: 3-caffeoylquinic acid; 4-CQA: 4-caffeoylquinic acid; 3,4-DQA: 3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-DQA: 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-DQA: 4,5 dicaffeoylquinic acid.

The encapsulation by anti-solvent precipitation is well described for non-polar compounds using zein as the carrier or encapsulating material. The encapsulation of orange essential oil in zein resulted in 35 % encapsulation efficiency (%EE) and thermal stability of up to 180 °C (Kringel et al., 2020). Zein is a prolamine with good solubility in binary solutions of water and ethanol (70–90 %) (Calliari et al., 2020; Chacon et al., 2023; Kasaai, 2018) which, when in contact with water, precipitates and traps some compounds. The anti-solvent precipitation of zein and gliadin was used for the encapsulation of resveratrol and resulted in particles of average diameters of 120–260 nm. The process using the mixture of the biopolymers improved the %EE by 50 times (Davidov-Pardo et al., 2015). Nanoparticles of *Hibiscus Sadbariffa* extract by anti-solvent precipitation with zein as carrier material with high stability, an average diameter of 137.9 nm and efficiency between 66.1–100 % (Calliari et al., 2020).

The %EE of chlorogenic acids in chitosan nanoparticles (210 nm) obtained by ionic gelling was 59 % and increased thermal stability (Nallamuthu et al., 2015). The chlorogenic acid-loaded on micro-emulsion for delivery system shown >98 % of self-emulsifying rate and good stability and delivering (Chen et al., 2017). Liposomes-chlorogenic acid complex reveals an increased thermal stability and reduced releasing in water, acid solution (pH 1.0) and phosphate buffer saline (pH 6.8) (Li et al., 2018). Encapsulation offers several advantages, especially enhanced stability through the isolation of active ingredients, precise and targeted release of these components, while preserving the fundamental bioactivity and bioavailability of the active ingredients upon different food and drug processing (Chacon et al., 2023).

The simplicity of application and ease of industrial expansion of anti-solvent precipitation are relevant objects of study. The ellagic acid encapsulated by anti-solvent precipitation presented a %EE of 96.6 and a total yield of 75 % (Li et al., 2022). Anti-solvent processing can give economic importance and functional potential for extracts with high content of chlorogenic acids such as those from *I. paraguariensis*. Thus, our hypothesis is that the coproduct of *I. paraguariensis* when submitted to optimized extraction conditions will result in extracts rich in chlorogenic acids. Thus, when using adequate and optimized conditions of encapsulation with zein by anti-solvent precipitation, the process will present high encapsulation efficiency, which results in improved thermal stability. Therefore, the challenge of this work was to employ multivariate optimization techniques for efficient encapsulation in order to increase the stability of bioactive compounds of a commercially unexplored matrix: the *I. paraguariensis* coproduct (IPC).

2. Material and methods

2.1. Obtaining plant material (IPC)

The IPC from cultivar Cambona 4 was collected in Machadinho/RS (Brazil) (27° 32' 35.5" S and 51° 39' 46.9" W), in the area of one hectare (100 plants, randomly), in herbal cultivated in full sun system, with 13 years of age. The botanical identification was carried out, for verification purposes, through the deposit in the herbarium of the Institute of Biology of the Federal University of Pelotas, under # 26.978 (SISGEN).

Ten kg of thick branches were collected in January 2020. The skin (epidermis) and the internal part (cortex and medulla) of the thick branches (>10 mm) were manually separated using a knife. Only the epidermis (bark), here called *I. paraguariensis* harvest coproduct - IPC, was dried in a tea dryer (Schifel, Erechim, Brazil) at 135 °C to 5 % moisture. Then, it was ground (50 mesh) and stored (-18 °C) until use.

2.2. Reagents

The reagents used ethanol (Neon, Suzano, Brazil), hexane and trichloroacetic acid (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) were analytical grade P; formic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and methanol (Honeywell, Wabash, USA) were chromatographic grade. The standards of chlorogenic acids (3-caffeoylquinic acid (3-CQA), 4-caffeoylquinic acid (4-CQA), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), 3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-DQA), 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DQA), 4,5-dicaffeoylquinic acid (4,5-CQA)) were obtained from Biopurify (Chengu, China). The water was purified using a MegaPurity® system (MecLab, Jacareí, Brazil). The standards were diluted in methanol and stored in an ultrafreezer (-70 °C) for a maximum of two weeks. All solutions and mobile phases were filtered using nylon membranes with a porosity of 0.22 µm (Analítica, São Paulo, Brazil).

2.3. Multivariate optimization of chlorogenic acid extraction

2.3.1. Obtaining the extracts

Obtaining the extract was optimized using a central composite multivariate design 2³, with central ($n = 3$) and axial points. The experimental matrix is shown in Table 1. The effects of time (5–40 min), extraction temperature (30–85 °C) and amount of dry IPC (0.1–1.0 g) were investigated - these values corresponding to the axial points - 1.68 and 1.68 of the coded matrix variables. All experiments were performed randomly and in triplicate experimentally.

Table 2

Independent variables and multivariate design responses for encapsulation efficiency (%EE) and thermal stability.

Coded variables and levels (1)			Decoded variables and levels			Encapsulation Efficiency (%) ⁽²⁾										Thermal stability (°C)
A	B	C	Zein (g)	Stirring (rpm)	Flow (mL/h)	5- CQA	3- CQA	4-CQA	3,4- DQA	3,5- DQA	4,5- DQA	Sum CQA	Sum DQA	Total		
−1	−1	−1	0.7	5.2	14	33.00	46.38	15.47	57.71	73.95	77.49	39.05	74.83	64.88	167.20	
1	−1	−1	1.3	5.2	14	66.80	76.12	43.71	90.76	92.61	93.40	67.40	92.90	90.99	184.00	
−1	1	−1	0.7	8.8	14	32.29	56.82	−10.63	72.18	82.56	81.49	43.14	81.19	75.75	174.50	
1	1	−1	1.3	8.8	14	60.32	78.21	35.68	90.55	92.69	92.40	69.29	92.38	91.19	169.30	
−1	−1	1	0.7	5.2	26	14.51	42.44	−18.62	66.94	81.47	85.49	27.88	83.12	73.78	211.00	
1	−1	1	1.3	5.2	26	58.96	82.34	44.57	90.79	94.21	93.79	73.81	93.75	92.93	201.80	
−1	1	1	0.7	8.8	26	−2.34	52.90	−24.00	68.19	80.10	79.82	33.15	79.11	71.24	181.40	
1	1	1	1.3	8.8	26	34.90	76.35	16.65	86.75	92.45	91.78	63.13	91.69	89.92	191.60	
−1.68	0	0	0.5	7	20	51.33	70.84	15.89	85.19	89.80	90.53	59.83	89.91	87.56	170.80	
1.68	0	0	1.5	7	20	46.36	67.96	19.57	90.91	92.22	92.98	56.73	92.51	88.46	156.20	
0	−1.68	0	1	4	20	32.10	56.63	−4.43	79.96	86.74	86.10	44.17	85.90	81.12	211.70	
0	1.68	0	1	10	20	40.40	63.65	−5.90	84.50	88.92	87.77	50.29	87.93	86.12	182.10	
0	0	−1.68	1	7	10	67.04	76.57	29.60	88.37	92.02	92.61	68.21	92.14	90.09	165.70	
0	0	1.68	1	7	30	71.67	78.65	24.43	86.04	91.39	92.38	71.04	91.63	89.11	191.40	
0	0	0	1	7	20	36.61	76.95	28.25	84.51	92.39	92.39	64.26	91.89	90.24	183.50	
0	0	0	1	7	20	52.08	57.86	65.08	87.48	90.98	90.52	58.61	90.45	88.82	186.70	
0	0	0	1	7	20	66.55	71.85	28.37	83.37	89.37	91.46	63.74	90.20	86.83	185.40	

⁽¹⁾ A: Zein weight (g). B: Stirring (rpm). C: Flow rate (mL/h); ⁽²⁾ 5-CQA: 5-caffeoylquinic acid; 3-CQA: 3-caffeoylquinic acid; 4-CQA: 4-caffeoylquinic acid; 3,4-DQA: 3,4-dicafeoylquinic acid; 3,5-DQA: 3,5-dicafeoylquinic acid; 4,5-DQA: 4,5 dicafeoylquinic acid.

The IPC samples were weighed (Table 1) in an amber flask, added to 15 mL of 75 % (v/v) ethanol, and submitted to stirring (400 rpm) in a water bath (Velp Scientifica, Enzymatic Digester-GDE, Italy) at temperature and time according to the experimental design (Table 1). Then, the extracts were filtered in Whatmann® filter paper and had their volume adjusted to 100 mL and analyzed by liquid chromatography. The evaluated responses were the concentration of chlorogenic acid isomers (5-CQA, 3-CQA, 4-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA).

2.3.2. Analysis of chlorogenic acids

The analyzes were performed by high-performance liquid chromatography with a diode array detector (UFLC, Shimadzu, Japan) at 325 nm, equipped with an automatic injector, quaternary pump, Cogent 2.0 Bidentate C18 column (MicroSolv Technology Corp., Leland, NC, USA), 2.1 mm i.d., 100 mm long and 2.2 µm particle size, with an oven at 40 °C (Lorini et al., 2022).

Elution was conducted in a gradient system starting with 99 % A (acidified water with 0.1 % formic acid) and 1 % B (methanol), with linear variation until 36 % B was reached at 35 min. This composition was maintained for 2.5 min. Between 37.5 min and 40 min reached 100 % B, condition maintained for 1 min for cleaning the column. Then, the column was reconditioned with the initial mobile phase composition for 5 min. The flow rate of the mobile phase was 0.2 mL.min^{−1}, and the injection volume was 10 µL. The identification of chlorogenic acids was performed by comparison with analytical standards through retention time, absorption spectrum and co-chromatography. The mobile phases and samples were filtered through a nylon membrane 0.22 µm.

The validation of the method was performed using the parameters of the limit of detection, quantification, linearity, and accuracy (on the day and between days), following the guidelines of the International Union of Pure and Applied Chemistry (Thompson, Ellison, & Wood, 2002) presented adequate results for the analyzes in question.

2.4. Optimization of encapsulation by anti-solvent precipitation

The hydroalcoholic extract of IPC (ethanol 75 %, v/v) obtained in 2.3 was added zein and homogenized in vortex for 2 min for complete solubilization. The solution containing zein and IPC extract was packed in a 20 mL syringe with a 13 mm long, 0.45 µm thick needle. The solution was dripped into water (pH 6.7) under constant stirring with the aid of an infusion pump (K100, KD Scientific, Germany). Then, the precipitated material was filtered with Whatmann type filter paper medium

porosity and lyophilized (Wong et al., 2020).

A central composite multivariate design 2³, with central points (n = 3) and axial, was used to optimize the zein weight used as carrier component (0.5–1.5 g of zein per 15 mL of IPC extract, which corresponds to 3.33 % to 10.00 % zein (w/v)), the stirring speed of the coagulant medium (4–10 rpm) and the dripping flow rate of the solution to be precipitated (10–30 mL h^{−1}), as experimental matrix presented in Table 2.

The responses investigated were the %EE and %LC of the isomers of chlorogenic acids (5-CQA, 3-CQA, 4-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA and 4,5-DQA individually), the sum of the monocafoylquinic and the dicafoylquinic, and the sum of all compounds, the encapsulated size and thermal stability (DSC).

The results were evaluated for the possibility of adjustment to mathematical models using Analysis of Variance (ANOVA), with 95 % confidence, to perform the prediction of optimal encapsulation conditions. The optimal condition of chlorogenic acid extraction was obtained with the aid of the desirability function of Derringer and Suich (Derringer & Suich, 1980). Then the optimal condition was performed experimentally, in triplicate.

The IPC extract encapsulated in the optimum conditions was characterized as %EE, %LC, thermal stability (TG), morphology (SEM) and infrared spectroscopy with Fourier transform (ATR-FTIR).

2.5. Analysis of encapsulated IPC extracts from multivariate design

2.5.1. Encapsulation efficiency (%EE) and loading capacity (%LC)

The %EE was determined by the total chlorogenic acid concentration (TC - inner concentration + outer surface concentration) and the chlorogenic acid concentration on the surface of the encapsulates (S) (Eq. (1)).

$$\%EE = \frac{TC - S}{TC} \times 100 \quad (1)$$

To determine the TC in the encapsulates, 100 mg of sample was added 10 mL of 75 % (v/v) ethanol and vortexed for 5 min. Then 50 µL of saturated trichloroacetic acid was added, followed by gentle shaking and centrifugation for 10 min at 5000 rpm (543 R Eppendorf, Hamburg, Germany) at 20 °C. To evaluate the concentration of chlorogenic acids on the outer surface (S) of the encapsulates, 100 mg of sample was added to 10 mL of 20 % (v/v) ethanol, subjected to vortex stirring for 5 min. Next, 50 µL of saturated trichloroacetic acid was added, followed by

gentle stirring and centrifugation for 10 min at 5000 rpm at 20 °C. The TC and S supernatant was collected, filtered in 0.22 µm porosity PVDF membrane and subjected to high performance liquid chromatography analysis (item 2.3.3).

2.5.2. Loading capacity (%LC)

The %LC was determined considering the ratio of (A) weight of chlorogenic acids (mg) present in the lyophilized encapsulates, considering the internal concentration + concentration on the external surface, by the (B) weight of chlorogenic acids (mg) present in the IPC extract (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA, 4,5-DQA and sum) submitted to encapsulation (Equation 2).

$$\% LC = \frac{A}{B} \times 100 \quad (2)$$

2.5.3. Thermal stability

The thermal stability of the encapsulates obtained in the multivariate design (Section 2.4) was determined by differential scanning calorimetry (DSC) (Polyma 204, Netzsch, Selb, Germany). Approximately 2 mg of each encapsulated IPC extract was weighed into hermetically sealed aluminum crucibles. The crucibles were heated from 20 to 300 °C, with heating rate of 10 °C min⁻¹, underflow of N₂ of 40 mL min⁻¹. An empty crucible was used as a reference. The peak temperature (T_m) was determined by the maximum thermal event of the thermogram.

2.5.4. Size of the encapsulated

The size of the encapsulates was determined by dynamic light scattering (DLS) after dilution of the samples in 10 % ethanol (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Limited, UK), using water as a dispersant medium (using refractive index 1.33). The samples were shaken until complete dispersion before scanning, in triplicate. The results obtained are the average hydrodynamic radius of the lyophilized material after encapsulation.

2.6. Characterization of optimized encapsulated IPC extract

The %EE and %LC were determined according to 2.5.1 and 2.5.2, respectively. Pure zein, lyophilized IPC extract and encapsulated IPC extract were subjected to thermogravimetric (TG) analysis (SDT Q600, TA Instruments, USA). The samples were weighed (5–10 mg) in a platinum crucible and heated from 30 to 600 °C, with a heating rate of 10 °C min⁻¹, under a nitrogen flow of 50 mL min⁻¹. An empty platinum crucible was used as a reference. The weight loss (%) and degradation temperatures were recorded for each sample, and the derivative was used to determine the average temperature.

The morphology of the encapsulated IPC extract was examined using coupled scanning electron microscope (SEM) (Jeol, JSM - 6610LV, USA). The dried samples were deposited on a stub and analyzed under an accelerating voltage of 15 kV. Pure zein, lyophilized IPC extract and encapsulated IPC extract were analyzed by infrared spectroscopy with Fourier transform under attenuated total reflectance (ATR-FTIR) (IRTracer-100, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The spectra were obtained between 4000 and 800 cm⁻¹ at room temperature in transmission mode with 45 scans and a resolution of 4 cm⁻¹.

2.7. Statistical analysis

The results for chlorogenic acids were expressed as relative means and subjected to analysis of variance (ANOVA), with a confidence level of 95 %. The data were processed using the software Desing Expert 6.0 (Minneapolis, USA) and Statistica 6.0 from StatSoft (Tulsa, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Multivariate optimization of *I. paraguariensis* extract

The multivariate design used to produce extracts rich in chlorogenic acids from IPC resulted in the extraction of moncaffeoylquinic acids (CQAs: 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA) and dicaffeoylquinic acids (DQAs: 3,4-DQA, 3,5-DQA, 4,5-DQA) with a sum that varied from 6.9 to 11 g 100 g⁻¹ (Table 1). The validation of mathematical models that describe the behavior of variables (time (5–40 min), temperature (30–85 °C) extraction and sample weight (0.1–1.0 g)) on the concentration of each of the six quantified compounds and their sum are presented in Table S1 of the Supplementary Material.

The behavior of the three variables investigated on the seven responses can be adequately described by models without lack of adjustment since all F values for lack of adjustment were lower than the critical F values, with 95 % confidence (Table S1). The relative standard deviation of the central point of the experimental conditions studied varied between 3.83 and 21.30 %, showing that the extraction method is reliable and that the lack of adjustment test did not have a false result. All models had significant regression and random residual dispersion. The behavior of the variables on the extraction of moncaffeoylquinic acids (5-CQA, 3-CQA and 4-CQA) and dicaffeoylquinic acid 4,5-DQA was described by linear models. On the other hand, for the dicaffeoylquinic acid 3,5-DQA and for the sum of all the compounds the behavior was described by quadratic models. The 3,4-DQA acid extraction had its model described only by the intercept, indicating that none of the variables significantly affected the extraction of this compound (Table S1).

The CQAs were significantly influenced by the variables in a similar way to each other. The extraction temperature was the most significant variable, followed by time. The increase of both caused an increase in the concentration of chlorogenic acids (Table 1). Other authors found that the effect of temperature resulted in greater extraction of chlorogenic acids in the preparation of chimarrão (Silveira et al., 2021). Elevated temperatures enhance the breakdown of vegetable cell walls, thereby improving chlorogenic acids extraction. However, they are unstable (Luo et al., 2023) when in solutions under refrigeration or room temperature storage. The time and temperature extraction optimization aids in recovering high concentrations of these compounds but does not guarantee its after-extraction stabilization. Its increase caused the extraction reduction. This The sample weight had a negative linear effect on the CQA extraction, indicating that effect is possibly related to the saturation of the extracting solution (Othman et al., 2011; Villar Blanco et al., 2022).

Dicaffeoylquinic acid 4,5-DQA was influenced in a similar way as moncaffeoylquinic, except for the time variable, which was not significant. However, the 3,5-DQA acid had the variables temperature and time with significant negative effects in quadratic terms (Table S1). The increase in these variables increased extraction up to intermediate levels. However, when higher levels were employed, a reduction in extraction was observed. This behavior indicates intermediate conditions of temperature and time for the extraction of 3,5-DQA. Furthermore, the interaction of the variables time and temperature showed a significant negative effect, evidencing that the simultaneous increase of the two impacted on the reduction of extraction (Table S1).

The observed effects suggest that 3,5-DQA is more susceptible to degradation during extraction compared to the other CQAs and DQAs. DQAs are highly susceptible to intramolecular isomerization, transesterification, and degradation, which enables the disruption of the structure to generate fragments, such as CQAs.

This result corroborates the result observed by Filip et al. (2017) in the study of polyphenol extraction from basil. In the extraction of total phenols, total flavonoids and antioxidant activity from *Myrtus communis* leaves the intermediate levels of time also increased the concentration. It is suggested that faster extractions may be insufficient, and too long extractions may cause degradation of some compounds (Dahmoune

Table 3

Independent variables and multivariate design responses for loading capacity (%LC) and package size.

Coded variables and levels (1)			Decoded variables and levels			Loading capacity (%) ⁽²⁾									Size (radius. nm)
A	B	C	Zein (g)	Stirring (rpm)	Flow (mL/ h)	5- CQA	3- CQA	4- CQA	3,4- DQA	3,5- DQA	4,5- DQA	Sum CQA	Sum DQA	Total	
-1	-1	-1	0.7	5.2	14	9.99	14.61	7.40	24.79	20.95	24.71	11.56	23.19	17.39	204
1	-1	-1	1.3	5.2	14	3.43	3.13	2.67	29.27	29.89	31.33	3.10	30.60	16.89	204
-1	1	-1	0.7	8.8	14	3.03	4.04	2.07	15.32	12.13	16.75	3.27	14.78	9.04	407
1	1	-1	1.3	8.8	14	1.39	2.09	0.97	21.51	21.18	27.18	1.62	24.33	13.01	814
-1	-1	1	0.7	5.2	26	5.38	6.82	3.72	15.53	16.03	21.34	5.65	18.76	12.23	1629
1	-1	1	1.3	5.2	26	1.39	2.64	1.12	34.46	33.83	41.09	1.92	37.66	19.85	1118
-1	1	1	0.7	8.8	26	4.14	6.41	3.41	17.99	14.56	19.93	5.05	17.61	11.35	295
1	1	1	1.3	8.8	26	2.14	4.11	1.77	33.39	31.06	39.79	3.00	35.78	19.44	270
-1.68	0	0	0.5	7	20	0.92	1.24	0.62	9.65	7.11	10.76	1.00	9.20	5.11	229
1.68	0	0	1.5	7	20	4.87	6.62	3.52	38.03	29.26	32.03	5.37	31.35	18.40	301
0	-1.68	0	1	4	20	6.28	8.97	4.25	39.68	35.11	43.33	7.06	39.73	23.45	289
0	1.68	0	1	10	20	1.68	2.35	1.20	27.43	22.97	31.49	1.88	27.74	14.85	254
0	0	-1.68	1	7	10	2.31	2.59	1.38	17.27	16.40	21.65	2.21	19.20	10.73	238
0	0	1.68	1	7	30	4.70	5.12	2.41	23.31	22.47	28.90	4.33	25.88	15.14	273
0	0	0	1	7	20	1.30	2.48	1.22	21.19	19.86	25.76	1.85	23.04	12.47	271
0	0	0	1	7	20	1.79	1.89	2.15	28.96	23.02	31.05	1.93	27.64	14.82	315
0	0	0	1	7	20	5.43	4.64	3.32	23.26	21.83	27.39	4.52	24.83	14.71	207

(1) A: Zein weight (g). B: Stirring (rpm). C: Flow rate (mL/h); 5-CQA: 5-caffeoylquinic acid; 3-CQA: 3-caffeoylquinic acid; 4-CQA: 4-caffeoylquinic acid; 3,4-DQA: 3,4-dicaffeoylquinic acid; 3,5-DQA: 3,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-DQA: 4,5-dicaffeoylquinic acid.

et al., 2015). In the study on *I. paraguariensis* coproduct with another extracting solvent (41.1 % ethanol in water), a negative effect of extraction time was also observed (Lorini et al., 2022).

The quadratic model described the behavior of the three variables for the sum of chlorogenic acids, indicating a positive linear effect for increasing time and temperature and a negative linear effect for increasing IPC weight. The negative quadratic effect of temperature was also significant, indicating that at intermediate conditions favor extraction. Similarly, the interaction effect between the variables time and temperature was also negative on the extraction of the sum of compounds (Table S1). The quadratic behavior for this response is highly associated with the significant effects for 3,5-DQA.

The optimal point was obtained by adopting as criteria the maximum extraction of the individual compounds and the total sum of chlorogenic acids, the minimization of the extraction time and the use of the highest possible amount of IPC weight (Table S2). These desirability criteria aim to get the extract quickly rich in chlorogenic acids. Thus, the optimal condition was 17 min (-0.46), 82 °C (1.47) e 0.58 g de IPC (-0.09), with total predicted extraction of 10.17 g chlorogenic acids per 100 g IPC. The experimentally obtained concentrations were statistically similar to the predicted concentrations (*t*-test with 95 % confidence) (Table S2). The coproduct of *I. paraguariensis* was also used to produce extracts rich in chlorogenic acids employing a multivariate design by Lorini et al. (2022). The optimum extraction of all polar compounds was when 33.8 min, 85 °C with a hydroalcoholic solvent of 41.1 % (v/v) ethanol. Under these conditions, 11.8 g of total chlorogenic acids were extracted from 100 g of the sample. The concentration of chlorogenic acids was similar, with a variation of only 14 %. The main advantage of using 75 % ethanol (v/v) for the extraction of chlorogenic acids is the compatibility of the hydroalcoholic extract in the solubilization of zein, without the need for drying and resuspension for subsequent encapsulation, in addition to the extraction time, which was 50 % lower.

3.2. Multivariate optimization of obtaining encapsulates

The %EE, %EC, thermal stability, and size of the encapsulates from the multivariate design are presented in Tables 2 and 3, as well as the mathematical models describing the variables zein weight (0.5–1.5 g), stirring speed (4–10 rpm) and dripping flow rate (10–30 mL/h) as a function of the analyzed responses in Table S3.

The %EE of the CQAs was not significantly influenced by any of the variables investigated. On the other hand, for the DQAs the zein weight

was significant and positive in linear terms (Table S3), indicating that the increase of zein promoted the increase of %EE. Zein is a protein in which, about 50 % of its amino acids are apolar, and is classified as a prolamine with an amphiphilic character (Kasaai, 2018). Although zein is amphiphilic, it showed a higher affinity for DQAs than for CQAs. In parallel, the more polar CQAs have a higher affinity for aqueous solution (Table 2). The non-covalent bonds of proteins and polyphenols include hydrophobic bonds, hydrogen bonds, electrostatic attractions, and van der Waals interactions.

When considering the encapsulation of the sum of the six chlorogenic acids, it was possible to obtain a mathematical model with an adequate fit, and only the weight of zein was significant, whose increase improved the %EE of the total sum of the compounds (Table S3). This behavior is a consequence of the increased zein/IPC extract ratios and consequence, high functional groups available from zein for interaction with the chlorogenic acids of the extract. In the encapsulation of epigallocatechin gallate, using the encapsulation by anti-solvent precipitation also observed the same effect (Liang et al., 2017). In another study, the increase of zein weight in the encapsulation of α -tocopherol resulted in higher encapsulation efficiency of the compound (Luo et al., 2011).

The %LC of the sum of the three CQAs varied between 1.00 and 11.56 % (Table 3), proving the higher affinity of these compounds by the aqueous medium. The %LC of the CQAs was also not significantly influenced by any of the variables investigated (Table S3). Although the mathematical models presented adequate adjustment and regression indicating that none of the variables had a significant effect, the experimental error obtained is high (47–79.5 % in relative standard deviation). Thus, the models do not present reliability to describe the experimental data. This can be observed through the experimental results obtained in the first experimental condition (all variables are at levels -1), which presented better loading than the others. The high relative standard deviation for loading the isomers can be putatively explained by a possible isomerization of the position of the compounds to each other during encapsulation. This possibility requires future studies for more substantial conclusions.

The sum of %LC of the DQAs varied between 9.20 and 37.66 % (Table 3), indicating better interaction between the carrier and the molecules that have two caffeic acids in the structure. For these compounds it was possible to establish quadratic models with no lack of fit and good dispersion of the residues to describe the behavior of the variables as a function of the responses (Table S3). The positive linear effect for zein weight was the most significant, the increase of which

improved the %LC. The zein weight also showed a negative quadratic effect, which indicates that the increase in %LC was evidenced only up to certain levels, indicating that the intermediate levels are the best conditions. In contrast, the second most important variable was the stirring speed, which when increased, reduced the %LC. This variable had a positive quadratic effect suggesting that its behavior is concave, with better %LC at the two extremes of the stirring speed range studied, but not in the intermediate regions (Table S3).

The dripping flow rate had a positive effect on the %LC of DQAs, with the higher the dripping flow rate, the higher the loading capacity. The interaction effect between zein weight and dripping flow rate as well as the interaction effect between stirring speed and dripping flow rate caused the %EC to increase (Table S3). This behavior suggests that the highlighted variables can be used simultaneously at the higher levels to obtain a high %EC. The model describing the loading of the sum of all chlorogenic acids showed the same behavior as for the DQAs (Table S3).

The interaction between zein weight and flow rate (AC) as well as between stirring and flow rate (BC) resulted in positive coefficients (Table S3). This result reveals that when both variables are increased simultaneously, it is possible to obtain more capacity loading for the sum of the DQAs in addition to the 3,5-DQA. For the individual compounds, 3,4-DQA and the 4,5-DQA, only the AC interaction was significant. The solution feed flow rate in anti-solvent precipitation was studied by Patil et al. (2021), which varied from 2 to 8 mL/min. When the flow rate was fixed at 2 mL/min this was considered optimal to obtain lovastatin nanoparticles with hydroxypropylmethylcellulose and pluronic as stabilizers.

Thermal stability (T_m) and encapsulate size (DLS) showed models with a slight lack of fit, indicating that they should be used with caution to obtain assertiveness in predicting the optimal conditions (Table S3). High T_m is a good indicator of thermal stability (Pilatti-Riccio et al., 2019). Thermal stability increased with increasing dripping flow rate. On the other hand, it decreased when the stirring speed was increased. The zein weight exerted a negative quadratic effect on T_m , indicating that an improvement occurred in the intermediate conditions of this variable in detriment to the extreme points (axial) the hydrodynamic radius size of the encapsulates ranged from 204 to 1.629 μ m. The size showed a reduction when stirring speed and dripping flow rate were simultaneously employed at high levels (Table 3 and S3).

The precipitation of zein in the anti-solvent process forms a structure similar to micelles when in solution. After precipitation can still occur particle agglomeration, due to increased hydrophobic interactions between the particles, leading to an increase in their size. Lyophilization can also cause agglomeration (Kasaai, 2018). Thus, there is some variability in the size of the encapsulates that can be partially explained by the molecular weight and high hydrophobicity of zein, as well as its insolubility in water. Their reduced water solubility leads to rapid supersaturation and increase in protein nucleation with the formation of encapsulates. These interactions can occur even during resuspension and preparation of the samples for the DLS assay. Thus, it is hypothesized that this behavior is responsible for the lack of fit of the mathematical models (Table S3).

To define the optimum condition of encapsulation through the combination of mathematical models were employed the models of %EE of total compounds, %LC of total compounds, thermal stability and size. Some authors were successful when using models with a slight lack of adjustment for extraction optimizations or chromatographic separation (Alves Filho et al., 2020; dos Santos et al., 2022; Silveira et al., 2021) models of thermal stability and size of the encapsulated. So, we assumed the hypothesis that it could work in encapsulation processes. After adopting the criteria of the desirability of increase of %EE, %LC, thermal stability and reduction of encapsulated size (Table S4) it was possible to obtain a combination of the optimal conditions when employing 1.36 g of zein, with stirring of 4 rpm and dripping flow rate of 18.14 mL h⁻¹ as independent variables. The desirability was 90 %.

3.3. Validation of optimized encapsulated IPC extract

Under the experimental optimum conditions, the %EE of 94 % and %LC of 16 % of the IPC extract were observed. This behavior is a result of the combination of variables zein weight (1.36 g), stirring speed of coagulant medium (4 rpm) and dripping flow rate (18.14 mL h⁻¹) of zein solution solubilized in IPC extract. Anti-solvent precipitation of zein results in a high %EE of both polar (Davidov-Pardo et al., 2015) and apolar compounds (Kringel et al., 2020) due to its amphiphilic characteristic (Kasaai, 2018). Furthermore, encapsulation with zein is promising to preserve chlorogenic acids during the digestive process, as this protein is robust against water solubilization and is not degraded in the buccal mucosa and by stomach acids, and thus enables the delivery of the compounds through the intestinal mucosa as it can be degraded by enzymes present in the intestine, mainly trypsins (Yan et al., 2022). The %EE resulted in 89 % in zein nanoparticles with *Hibiscus sabdariffa* extract by anti-solvent precipitation, indicating the possibility of polyphenol trapping (Calliari et al., 2020).

The T_p of the encapsulated IPC extract was 185.1 °C, which proves that the prediction of the mathematical models was similar to the predicted conditions with 95 % confidence (Table S4). The extract of *I. paraguariensis* also showed thermal stability when encapsulated with fructooligosaccharide was 201.6 °C (Pilatti-Riccio et al., 2019). This behavior indicates the thermal stability of the compounds present in the encapsulated extract.

3.4. Characterization of optimized encapsulated IPC extract

3.4.1. Morphology

The encapsulated IPC extract produced under optimal and lyophilized conditions has an undefined and uneven morphology, with the presence of agglomerates (Fig. 2). These structures are probably the result of the anti-solvent precipitation process. Lyophilization also contributes to the formation of these agglomerated structures, which are formed due to the shrinkage of the solid material when water is removed during drying (Davidov-Pardo et al., 2015). The morphology is dependent on the whole encapsulation process, from the choice of the carrier material, the compound to be encapsulated, as well as the method (Chacon et al., 2023). This undefined morphology does not affect the encapsulation and loading capacity of the compounds as well as their stability (Rosário et al., 2021), as also demonstrated in the results of this study.

On the other hand, the encapsulation by anti-solvent precipitation of *Hibiscus sabdariffa* extract with zein resulted in spherical nanoparticles (138–257 nm), in addition to the formation of aggregates resulting from lyophilization. In this same study, the diameter of the particles increased the greater the weight of zein (Calliari et al., 2020). The encapsulation of orange essential oil with zein by the modified anti-solvent method resulted in spherical and regular particles, with sizes of 1.781 μ m (Kringel et al., 2020). Also, zein particles with lyophilized sodium caseinate presented spherical and agglomerated morphology, probably due to the high hydrophobic attraction, during lyophilization, which may have dehydrated the particles leading to these characteristics (Davidov-Pardo et al., 2015).

Lignocellulosic nanoparticles of yerba mate had a size around 500 nm, which was related to the formation of agglomerates during the lyophilization process (Arrieta et al., 2018). This fact can be due to the strong hydrogen bonds, as the water sublimates during freezing-drying (Beltrán et al., 2020). Another influential factor is the stirring speed during the precipitation process, which results in larger particles in the preparation of Pickering emulsions through anti-solvent precipitation (Cuthill et al., 2021).

3.4.2. Optimized encapsulation thermal behavior

Zein, lyophilized IPC extract, and encapsulated IPC extract presented a predominant thermal event of weight loss when evaluated by

Table 4

Thermal properties of the optimal conditions for the encapsulation of the co-product extract of *I. paraguariensis* (IPC).

Description	Thermal Properties		
	T _{on} [°C]	T _{end} [°C]	D _m [%]
Extract IPC	246.6	326.3	52.2
Zein	290.0	350.0	68.1
Encapsulated IPC	294.0	357.5	67.1

T_{on}: Initial temperature; T_{end}: Final temperature; D_m: Weight Loss.

thermogravimetry (TG). Lyophilized IPC extract has thermal decomposition in 246,6 °C (T_{on}) up to 326, 3 °C (T_{end}), and consequent 52,2 % weight loss. The encapsulated IPC extract showed enhanced thermal stability evidenced by T_{on} at 294 °C and T_{end} at 357.5 °C, and weight loss of 67.1 %. Zein showed characteristic thermal event with T_{on} at 290 °C and T_{end} at 350 °C, with weight loss of 68.1 % (Table 4). Thus, it can be confirmed that the improved effect of thermal stability of IPC extract is due to encapsulation with zein. These results can be related to the %LC of 94 %, which demonstrates that interaction occurred between zein and the chlorogenic acids in the IPC extract. The thermal stability of encapsulated compounds is influenced by the encapsulation process, the compounds to be encapsulated and especially the carrier or encapsulating material used (Bodbodak et al., 2022; Nunes et al., 2015). The strong interaction between the phenolic compounds and the carrier system proteins may be responsible for the increased encapsulation efficiency and consequent thermal protection of the compounds

(Bodbodak et al., 2022). Therefore, the thermal protection of chlorogenic acids was proven by the 47 °C increase in thermal decomposition (T_{on}) of the IPC extract after encapsulation (Table 4) and demonstrates that the anti-solvent precipitation of zein is effective in this optimized condition. The thermal stability of folic acid encapsulated in ultrafine zein fibers also increased from 47 to 57 °C after encapsulation, and when heated at 180 °C for 45 min, the concentration of folic acid reduced by ~9 % (Evangelho et al., 2019). The thermal stability of nanoparticles, increased by 13 % when produced with zein and octenyl succinate starch (Lai et al., 2021).

The thermal stability measured by thermogravimetric analysis assists in understanding the behavior of the compounds against thermal exposure, such as cooking and food baking. High thermal stability is desired when applying these encapsulated compounds to products that have undergone heating, such as cooking and baking.

3.4.3. Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR)

Zein, lyophilized and encapsulated IPC extract were analyzed by FTIR to verify the presence of functional groups and interactions between zein and chlorogenic acids present in IPC extract. All spectra showed characteristic bands in the region of 4000 cm⁻¹ - 800 cm⁻¹ (Fig. 1).

The FTIR spectrum of zein showed a band in the region of 3500 to 3000 cm⁻¹, which refers to νO—H stretching overlapped by asymmetric and symmetric N—H and C—H stretching (3309 cm⁻¹ and 2954 cm⁻¹ corresponding to νN—H and C—H vibrations, respectively), related to the presence of free fatty acids present in zein (Evangelho et al., 2019).

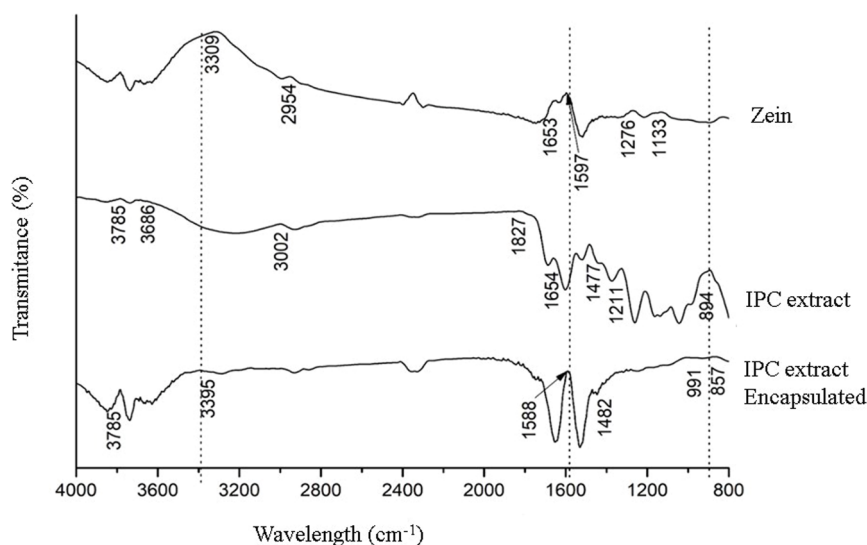


Fig. 1. Fourier Transform Infrared Spectrum (ATR-FTIR) of *I. paraguariensis* coproduct extract (IPC), zein and encapsulated ICP extract.

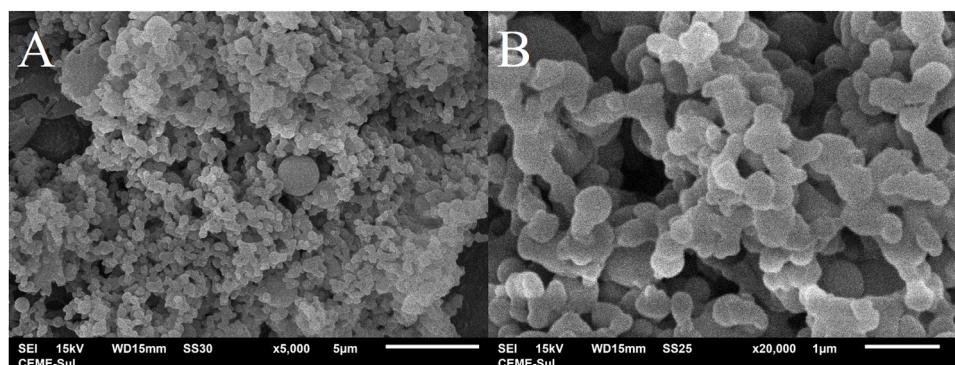


Fig. 2. Scanning electron microscopy (SEM) of encapsulated *I. paraguariensis* coproduct extract (IPC) (A: x5000 and B:x20000).

Also, the band 1654 cm^{-1} corresponds to the elongation of C=O (amide I), 1597 cm^{-1} to the elongation of C–N (amide II) and $1276\text{--}1133\text{ cm}^{-1}$ to the elongation of N–H (amide III) characteristic of the acidic amines present in proteins.

The spectrum of the freeze-dried IPC extract shows bands at $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, attributed to $\nu\text{O–H}$, 3000 and 2800 cm^{-1} elongation, which relates to symmetric and asymmetric vibrations of methyl and methylene groups, indicating metabolites such as caffeine in beverages and infusions (Paradkar & Irudayaraj, 2002; Pilatti-Riccio et al., 2019). The bands $1800\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$ assigned the C=C ester bands, which represents the aromatic group of compounds such as antioxidants and phenolic acids (Silva et al., 2014).

For IPC extract encapsulated with zein, the bands related in 3309 and 1654 cm^{-1} were displaced to 3395 and 1588 cm^{-1} , respectively. In addition, the intensity of these bands showed change in the encapsulated material, probably due to the reduction of the number of free functional groups (C–N and C=O groups) as a result of electrostatic interactions and hydrogen bonds, hydrophobic forces and electrostatic forces between zein and IPC extract (Chen et al., 2012; Davidov-Pardo et al., 2015; Luo et al., 2011). Zein can undergo conformational transformations from α -helix to β -sheet structures after antisolvent by the changes in polarities and driving force (Lai et al., 2021). Resveratrol and proteins (zein and gliadin) can be physically bound to each other without any chemicals in nanoparticles (Wu et al., 2012). Given this, the region of dislocations could indicate the presence of hydrophobic attraction between the proteins and chlorogenic acids and confirm the encapsulation.

4. Conclusions

This work presents a simple, fast and successful method of producing extract rich in chlorogenic acids from a commercially unexplored matrix (IPC). The IPC (0.58 g), when extracted with 75% ethanol (82°C for 17 min in stirring) results in extract with high concentration of chlorogenic acids ($10.16\text{ g }100\text{ g}^{-1}$). The mixture of IPC extract (15 mL) and zein (1.36 g) dripped (18.14 mL h^{-1}) on water under stirring (4 rpm) results in encapsulated with 94% efficiency and thermal stability of up to 357.5°C . The combination of optimized processes encourages the development of foods supplemented with chlorogenic acids that require heat treatment. These results highlight that the use of IPC ensures the rational use of natural resources in the context of the circular economy.

Funding

ACKThis study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) PQ Gaúcho 19/2551-0001637-9, Edital 05/2019. The author VZP thanks the Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) for the financial support (PES-2022-0184).

CRedit authorship contribution statement

Bruna Trindade Paim: Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Data curation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **Alexandra Lizandra Gomes Rosas:** Methodology, Formal analysis. **Alexandre Lorini:** Data curation, Writing – review & editing. **Vania Zanella Pinto:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Gisele Louro Peres:** Methodology, Writing – review & editing, Formal analysis. **Elessandra da Rosa Zavareze:** Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing. **Vanessa Galli:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Helen Cristina dos Santos Hackbart:** Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing. **Dianini Hüttner Kringel:** Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing. **Adriana Dillenburg Meinhart:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Data curation, Writing –

original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest with this publication, and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors thank the Machadinho city association, yerba mate producers (APROMATE) and Barão Trade and Yerba Mate Industry LTDA who kindly contributed by donating the samples of *I. paraguariensis*. We also would like to thank CEME-Sul at FURG for the support of SEM images.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:[10.1016/j.focha.2023.100524](https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100524).

References

- Alves Filho, E. G., Sousa, V. M., Rodrigues, S., de Brito, E. S., & Fernandes, F. A. N. (2020). Green ultrasound-assisted extraction of chlorogenic acids from sweet potato peels and sonochemical hydrolysis of caffeoylquinic acids derivatives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, Article 104911. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104911>. October 2019.
- Arrieta, M. P., Peponi, L., López, D., & Fernández-García, M. (2018). Recovery of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) residue for the development of PLA-based bionanocomposite films. *Industrial Crops and Products*, 111, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.042>. June 2017.
- Beltrán, F. R., Arrieta, M. P., Gaspar, G., de la Orden, M. U., & Urreaga, J. M. (2020). Effect of ignocellulosic nanoparticles extracted from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on the structural, thermal, optical and barrier properties of mechanically recycled poly(lactic acid). *Polymers*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/POLYM12081690>
- Bodbodak, S., Nejatian, M., Yazdi, A. P. G., Roustae, L. K., Zahra Rafiee, M. J. J., Kharazmi, M. S., et al. (2022). Improving the thermal stability of natural bioactive ingredients via encapsulation technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2127145>
- Calliari, C. M., Campardelli, R., Pettinato, M., & Perego, P. (2020). Encapsulation of hibiscus sabdariffa extract into zein nanoparticles. *Chemical Engineering and Technology*, 43(10), 2062–2072. <https://doi.org/10.1002/ceat.202000194>
- Chacon, W. D. C., Verruck, S., Monteiro, A. R., & Valencia, G. A. (2023). The mechanism, biopolymers and active compounds for the production of nanoparticles by antisolvent precipitation: A review. *Food Research International*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112728>. September 2022.
- Chen, L., Liu, C. S., Chen, Q. Z., Wang, S., Xiong, Y. A., Jing, J., et al. (2017). Characterization, pharmacokinetics and tissue distribution of chlorogenic acid-loaded self-microemulsifying drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.011>
- Chen, Q., Guo, Z., Zhao, J., & Ouyang, Q. (2012). Comparisons of different regressions tools in measurement of antioxidant activity in green tea using near infrared spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 60, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.10.020>
- Cuthill, H., Elleman, C., Curwen, T., & Wolf, B. (2021). Colloidal particles for pickering emulsion stabilization prepared via antisolvent precipitation of lignin-rich cocoa shell extract. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020371> (Basel, Switzerland).
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.066>
- Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., & McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 45, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.023>
- Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

- dos Santos, F. N., de Souza, E. J. D., Jéssica Siebeneichler, T., Buchveitz Pires, J., Hüttner Kringel, D., Dillenburg Meinhart, A., et al. (2022). Multivariate analysis as tool for optimization of anthocyanins extraction from jambolan (*Syzygium cumini* L.). *Food Analytical Methods*, 15(9), 2524–2536. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02313-3>
- Evangelho, J. A., Crizel, R. L., Chaves, F. C., Prietto, L., Pinto, V. Z., Miranda, M. Z. de, et al. (2019). Thermal and irradiation resistance of folic acid encapsulated in zein ultrafine fibers or nanocapsules produced by electrospinning and electrospraying. *Food Research International*, 124, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.019>. August 2018.
- Filip, S., Pavlič, B., Vidović, S., Vladić, J., & Zeković, Z. (2017). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Ocimum basilicum* by response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 10(7), 2270–2280. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0792-7>
- IBGE. (2021). Produção da extração vegetal e silvicultura. Estatísticas. <https://www.ibge.gov.br/Estatisticas/Economicas/Agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extra-cao-vegetal-e-da-silvicultura.html>.
- Jovanović, A. A., Vajić, U. J. V., Mijin, D. Z., Zdunić, G. M., Šavikin, K. P., Branković, S., et al. (2022). Polyphenol extraction in microwave reactor using by-product of *Thymus serpyllum* L. and biological potential of the extract. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100417>. July.
- Kasaai, M. R. (2018). Zein and zein-based nano-materials for food and nutrition applications: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79, 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.015>. October 2017.
- Kringel, D. H., da Silva, W. M. F., Biduski, B., Waller, S. B., Lim, L. T., Dias, A. R. G., et al. (2020). Free and encapsulated orange essential oil into a β -cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(5), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14411>
- Lai, C., Hu, L., Tu, J., Li, M., Cui, Q., & Wu, L. (2021). Effects of different alcohol and ultrasonic treatments on thermal and structural properties of zein-starch sodium octenyl succinate composite nanoparticles. *Journal of Food Science*, 86(8), 3574–3588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15845>
- Li, Q., Xu, J., Shi, J., Chu, J., & Shi, Q. (2022). Preparation of pure ellagic acid from waste pomegranate peel by supramolecular solvent based heat assisted extraction followed by liquid-liquid liquid-liquid extraction and antisolvent precipitation. *Environmental Technology and Innovation*, 28, Article 102916. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102916>
- Li, Y., Ren, X., Lio, C., Sun, W., Lai, K., Liu, Y., et al. (2018). A chlorogenic acid-phospholipid complex ameliorates post-myocardial infarction inflammatory response mediated by mitochondrial reactive oxygen species in SAMP8 mice. *Pharmacological Research*, 130, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.006>
- Liang, J., Yan, H., Wang, X., Zhou, Y., Gao, X., Puligundla, P., et al. (2017). Encapsulation of epigallocatechin gallate in zein/chitosan nanoparticles for controlled applications in food systems. *Food Chemistry*, 231, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.106>
- Lorini, A., Damin, F. M., de Oliveira, D. N., Crizel, R. L., Godoy, H. T., Galli, V., et al. (2021). Characterization and quantification of bioactive compounds from *Ilex paraguariensis* residue by HPLC-ESI-QTOF-MS from plants cultivated under different cultivation systems. *Journal of Food Science*, 86(5), 1599–1619. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15694>
- Lorini, A., Damin, F. M., de Oliveira, D. N., Ramires, T., Rombaldi, C. V., Zavareze, E., et al. (2022). Multivariate optimization results in an edible extract from *Ilex paraguariensis* unexplored residues with a high amount of phenolic compounds. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 57(1), 23–38. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.2020530>
- Luo, Y., Li, Y. C., Meng, F. B., Wang, Z. W., Liu, D. Y., Chen, W. J., et al. (2023). Simultaneously enhanced stability and biological activities of chlorogenic acid by covalent grafting with soluble oat β -glucan. *Food Chemistry: X*, 17, Article 100546. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100546>. October 2022.
- Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L., & Wang, Q. (2011). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Preparation and characterization of zein /chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.020>
- Nallamuthu, I., Devi, A., & Khanum, F. (2015). Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.005>
- Nunes, G. L., Boaventura, B. C. B., Pinto, S. S., Verruck, S., Murakami, F. S., Prudêncio, E. S., et al. (2015). Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 151, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.031>
- Othman, N., Mili, N., & Wong, Y. M. (2011). Liquid-liquid extraction of black b dye from liquid waste solution using tridodecylamine. In *Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 4, Issue 3), 324–331. <https://doi.org/10.3923/jest.2011.324.331>
- Paradkar, M. M., & Irudayaraj, J. (2002). A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. *Journal of Food Science*, 67(7), 2507–2511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08767.x>
- Patil, A. S., Hegde, R., Gadad, A. P., Dandagi, P. M., Masareddy, R., & Bolmal, U. (2021). Exploring the solvent-anti-solvent method of nanosuspension for enhanced oral bioavailability of lovastatin. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(5), 541–549. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.65047>
- Pilatti-Riccio, D., Fernando, D., Dillenburg, A., Antonio, M., Cristina, H., & Zanella, V. (2019). Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. *Food Research International*, 125, Article 108600. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108600>. June.
- Pinto, V. Z., Pilatti-Riccio, D., Paim, B. T., Costa, L. D. V., Amorin, S. G. De, Dillenburg, A., & Meinhart, (2023). *Ilex paraguariensis* – green gold from South America. In T. Pullaiah (ed.), *Phytochemistry and pharmacology of medicinal plants* (Vol. 1). Apple Academic Press.
- Rosário, F. M., Biduski, B., Santos, D. F. D., Hadlish, E. V., Tormen, L., Santos, G. H. F. D., et al. (2021). Red araçá pulp microencapsulation by hydrolyzed pinhão starch, and tara and arabic gums. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 2052–2062. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10825>
- Silva, S. D., Feliciano, R. P., Boas, L. V., & Bronze, M. R. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 150, 489–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.028>
- Silveira, T. F. F., Meinhart, A. D., de SOUZ, T. C. L., Cunha, E. C. E., de MORAES, M. R., Lorini, A., et al. (2021). Impact of water temperature of chimarrão on phenolic compounds extraction. *Food Science and Technology*, 41(4), 856–863. <https://doi.org/10.1590/fst.23720> (Brazil).
- Villar Blanco, L., González Sas, O., Sánchez, P. B., Domínguez Santiago, Á., & González de Prado, B. (2022). Congo red recovery from water using green extraction solvents. *Water Resources and Industry*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2021.100170>. October 2021.
- Wong, J. J. L., Wong, A. I. C., Xu, Y., & Yuliarti, O. (2020). Zein as a water insoluble excipient for spray dry encapsulation of hydrophilic bioactives. *Journal of Food Engineering*, 283, Article 110054. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110054>. July 2019.
- Wu, Y., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT*, 48(2), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.027>
- Yan, T., Wang, H., Song, X., Yan, T., Ding, Y., Luo, K., et al. (2022). Fabrication of apigenin nanoparticles using antisolvent crystallization technology: A comparison of supercritical antisolvent, ultrasonic-assisted liquid antisolvent, and high-pressure homogenization technologies. *International Journal of Pharmaceutics*, 624. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121981>. July.

Submetido para Food Biophysics

O encapsulamento de ácidos clorogênicos de coproduto de *Ilex paraguariensis* por “spray-drying” aumenta a estabilidade dos compostos em produtos forneados

Bruna Trindade Paim¹, Cristina Jansen-Alves¹, Alexandra Lizandra Gomes Rosas¹, Thamyres Cesar de Albuquerque Sousa¹, Yasmin Völz Bezerra Massaut¹, Vandressa Alves², Gustavo Henrique Fidelis do Santos², Vinícius Gonçalves Deon³, Vania Zanella Pinto², Adriana Dillenburg Meinhart^{1*}

¹ *Department of Food Science and Agrotechnology, Federal University of Pelotas (UFPEL), 96105-900, Pelotas, RS, Brazil*

² *Graduate Program of Food Science and Technology, Federal University of Federal da Fronteira Sul (UFFS), 85301-970, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil*

³ *Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC), Campus Xanxerê, CEP 89820-000*

Destaques

O encapsulamento por spray-drying resultou em 75,2% de eficiência para os ácidos clorogênicos

A estabilidade térmica do extrato encapsulado foi ampliada em 41 °C

94% dos ácidos clorogênicos foram preservados no forneamento

O armazenamento por 12 meses não causou degradação nos compostos encapsulados

* Autora correspondente: adrianadille@gmail.com

Resumo

O coproduto de *Ilex paraguariensis* (IPC) é pouco explorado comercialmente, sendo gerado 5 ton/há anualmente e possui alta concentração de ácidos clorogênicos. A sua preservação é necessária para aplicações diversas, especialmente os produtos de panificação. Objetivou-se otimizar as condições de encapsulamento por “spray-drying” do extrato obtido do IPC, com a finalidade de aumentar a estabilidade dos ácidos clorogênicos para aplicação em produtos forneados. Por meio de uma otimização multivariada foi encontrada a condição ótima de encapsulamento que resultou em 75% de eficiência de encapsulamento (%EE), 66.5 % de capacidade de carregamento (%LC), aumento de 40°C na estabilidade térmica e partículas com diâmetro médio de até 5 µm. Nos bolos formulados com o extrato de IPC encapsulado (IPCE), em média 94,4% dos ácidos clorogênicos foram preservados, ao passo que apenas 69,3% foram preservados nos bolos quando se utilizou extrato de IPC livre. Além disso, os ácidos clorogênicos presentes no IPCE apresentaram excelente estabilidade durante 12 meses armazenados 4°C. O encapsulamento por “spray-drying” é rápido, com um excelente custo-benefício para a indústria alimentícia, além de preservar os ácidos clorogênicos durante pelo menos 1 ano, durante a estocagem, em condições que naturalmente sofreriam degradação. Tais resultados encorajam a aplicação dos encapsulados para aumentar a funcionalidade de alimentos e valorizar um produto natural ainda negligenciado comercialmente.

Palavras-chave: cafeoilquínicos, eficiência de encapsulamento, estabilidade térmica, produtos de panificação.

1 Introdução

As folhas de *Ilex paraguariensis*, árvore nativa da América do Sul, são matérias-primas para produção de erva-mate para chimarrão, tererê e chá mate, bebidas muito apreciadas na América do Sul (Fayad et al., 2020), além de alguns alimentos e cosméticos. No entanto, aproximadamente 5 ton/ha de talos grossos são descartados como resíduo no solo a cada colheita (Heck et al., 2021). Estes resíduos não possuem destino comercial até o momento e não são eficientes para a geração de energia (queima).

A parte externa destes talos grossos, aqui denominado como coproduto de *Ilex paraguariensis* (IPC), bem como as folhas, possuem elevada concentração de ácidos clorogênicos, sendo aproximadamente de 10 a 12%, em base seca (Lorini et al., 2022; Meinhart et al., 2017). Os principais isômeros de ácidos clorogênicos presentes em *I. paraguariensis* são o ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA), o ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA), o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), o ácido 3,4-dicaffeoylquinico (3,4-DQA), o ácido 3,5-dicaffeoylquinico (3,5-DQA) e o ácido 4,5-dicapheoylquinico (4,5-DQA) (Lorini et al., 2021). Tais compostos tem sido cada vez mais associado aos efeitos benéficos do consumo de produtos contendo *I. paraguariensis*.

O consumo regular de bebidas à base de *I. paraguariensis* proporciona efeito anti-inflamatório e antioxidante (Kungel et al., 2018), redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL), modulação da microbiota (Yuan et al., 2019) e controle glicêmico, dentre outros (Petroselli et al. 2019). No entanto, os ácidos clorogênicos presentes nos extratos da planta são altamente suscetíveis à degradação quando na presença de oxigênio, luz, variações de pH e aquecimento, o que leva a busca por técnicas de proteção dos compostos (Paim et al., 2023).

O encapsulamento é uma técnica eficiente para melhorar a estabilidade desses compostos durante o seu processamento e armazenamento. A geleificação iônica empregando alginato de sódio como material encapsulante de extrato de *I. paraguariensis* resultou em micropartículas de 92 µm com 65% de eficiência de encapsulamento (%EE) (Vargas et al., 2021). Ainda, a secagem por “spray-drying” de extrato de *I. paraguariensis* utilizando quitosana reticulada com 1% de trifosfato de sódio pentabásico como carreador resultou em microesferas com %EE próxima

de 100% e estabilidade de 88% após 3 meses (Harris et al., 2011; Penalva et al., 2015; Wong et al., 2020). A secagem por “spray-drying” também foi utilizada para o encapsulamento de extrato aquoso de “green jelly leaf” (*Cyclea barbata* Miers) usando zeína como carreador e resultou entre ~50 and 70% de %EE (Wong et al., 2020).

Além disso, o uso de zeína, a principal proteína do milho (*Zea mays* L.), resultou na %EE de 94% dos ácidos clorogênicos de extrato de coproduto de *I. paraguariensis*, apesar da sua limitada capacidade de carregamento (LC) (<23%), quando precipitada em sistema antissolvente (Paim et al., 2023). Extrato de vitexin-rhamnoside nanoencapsulado com zeína-pectina (Huang, Li, and Li 2023) e curcumin encapsulada com zeína e e recoberta com dextrina sulfatada (Yuan et al., 2019) apresentaram elevada eficiência de encapsulamento. A zeína também foi empregada no encapsulamento, por “spray-drying”, de extrato aquoso rico em compostos fenólicos de casca de noz pecan e resultou em micropartículas com estabilidade até 200 °C (Kureck et al., 2018). A zeína também é aprovada para uso como ingrediente de grau alimentício pela Food and Drug Administration (FDA) e tem sido amplamente utilizada para desenvolver sistemas de encapsulamento com melhora da resistência à passagem no trato gastrointestinal e aumento da resistência à degradação térmica (Jiang & Zhu, 2019; Zhang et al., 2019). Além disso, os resultados indicam o potencial da zeína para encapsular compostos solúveis em água, sugerindo a sua aplicabilidade em produtos alimentares com elevado teor de água (Wong et al., 2020).

Desta forma, a nossa hipótese é de que o encapsulamento por “spray-drying” de extrato rico em ácidos clorogênicos, obtido de IPC, utilizando zeína como carreador, resultará em elevada %EE e %LC, bem como compostos estáveis tanto aplicados em produto de panificação forneado, utilizando-se bolo “pão de ló” como modelo de estudo, quanto durante o armazenamento. Assim, objetivou-se estudar as condições de “spray-drying” (vazão de alimentação, temperatura de entrada do ar e concentração de extrato na solução carreadora) de extrato rico em ácidos clorogênicos, por meio de otimização multivariada, seguido do estudo da estabilidade durante o armazenamento e quando aplicadas em bolos.

2 Material e métodos

2.1 Reagentes

Os solventes etanol (Neon, Suzano, Brasil), ácido tricloroacético e hexano (Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) foram todos de grau PA. O ácido fórmico (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) e acetonitrila (Honeywell, Wabash, EUA) foram de grau HPLC. O padrão de ácido 3-cafeoilquinic foi obtido da Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Os padrões de 4-cafeoylquinic, 5-cafeoylquinic, 3,4-dicafeoylquinic, 3,5-dicafeoylquinic and 4,5-dicafeoylquinic were obtained from Biopurity (Chengdu, China). A água foi ultrapurificada em um sistema MegaPurity® (MecLab, Jacareí, Brasil).

Os padrões foram diluídos em metanol/água (50:50) (1 mg mL⁻¹) e armazenado em ultrafreezer (-70 °C) por, no máximo, duas semanas. Todas as soluções e fases móveis foram filtradas utilizando membranas de nylon com porosidade de 0,22 µm (Analítica, São Paulo, Brazil).

2.2 Obtenção do coproduto de *Ilex paraguariensis* e produção do extrato

O resíduo da colheita de *Ilex paraguariensis* (cultivar Cambona 4) foi coletado em herval cultivado no sistema de pleno sol (Machadinho, RS, Brazil - 27°32'35,5" S e 51°39'46,9" W), em 2021. Foram coletados trinta quilos de talos grossos (com espessura maior que 10 mm), que foram descartados durante a colheita de *I. paranguarisis*. A casca (epiderme) dos talos grossos foi separada da parte interna (córtex e medula) com faca comercial. A parte externa (coproduto de *I. paranguariensis* - IPC) foi seca em secador comercial de chás (Schifel, Erechim, Brasil), à 130°C, por cerca de 30 minutos, até atingir 5% de umidade, triturada até 50 mesh e armazenada em sacos de polietileno (-20 °C).

Para o preparo do extrato foram pesados 9,6 g de IPC, adicionados de 250 mL de etanol 75% (v/v) e agitados em banho-maria por 17 min à 82°C, seguindo o método otimizado (Paim et al., 2023). Por fim, o extrato foi filtrado em filtro tipo Whatmann, de porosidade média, e submetido ao encapsulamento.

2.3 Otimização multivariada do encapsulamento por “spray-drying”

A obtenção dos encapsulados foi otimizada empregando um planejamento multivariado composto central 2³, com pontos centrais (n=3) e axiais. O efeito da vazão de alimentação (5 a 30 mL/h), temperatura de entrada do ar (110 a 150°C)

e a concentração do extrato de IPC na solução carreadora de zeína (35 a 100%, v/v) foram otimizados, totalizando 17 ensaios (Tabela 1). Para tanto, alíquotas do extrato obtido foram coletadas quantitativamente (nos diferentes percentuais de IPC, conforme o delineamento) e tiveram seu volume aferido até 100 mL com etanol 75%. Em seguida, foram adicionados de 5% zeína, m/v e foram agitados em vórtex por 5 min. A solução foi seca em “spray-drier” (Computer Controlled Spray Drier, Edibon, Madrid, ESPAÑA), com a vazão de alimentação e temperatura de entrada do ar de acordo com o delineamento experimental. Os particulados coletados foram armazenados em frascos hermeticamente fechados e conservados sob refrigeração (4°C) até o momento das análises.

As respostas avaliadas foram a eficiência de encapsulamento (%EE) dos seis isômeros de ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA, soma dos ácidos cafeoilquínicos – CQAs, soma dos ácidos dicafeoilquínicos – DQA e soma dos ácidos clorogênicos), a capacidade de carregamento (%LC), a estabilidade térmica e o tamanho de partícula.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente quanto aos ajustes e significância da regressão dos modelos matemáticos por Análise de Variância (ANOVA), com 95% de confiança para avaliar sua qualidade para a predição da condição ótima. Em seguida a condição ótima foi executada experimentalmente, em triplicata, e foi validada através do teste *t* (95% de confiança). Os dados foram tratados através dos softwares *Desing Expert* 6.0 (Menneapolis, EUA) e *Statistica* 6.0 da StatSoft (Tulsa, EUA).

2.4 Estabilidade dos ácidos clorogênicos do extrato de IPC livre e IPC encapsulado (IPCE) em produto forneado.

Para produção dos bolos, os ingredientes secos (farinha de trigo, sal e açúcar cristal) foram previamente pesados, misturados e reservados. Os demais ingredientes (ovos, água e margarina) foram adicionados gradativamente a mistura dos ingredientes secos e misturados por 2,5 min em velocidade baixa utilizando batedeira planetária (Arno, SX15, Brazil). Na sequência, o extrato de IPC livre e o IPCE foram e misturados de manualmente por 30 segundos em diferentes concentrações (Tabela S2) ao final da homogeneização da massa. Por fim, o fermento em pó foi adicionado e misturado por 30 s, em baixa velocidade. A massa (30 g) foi distribuída em formas de alumínio de 4x7 cm (largura x comprimento),

untadas com margarina, e assada em forno elétrico (Prática, Industrial Miniconv, Brazil) pré-aquecido, por 10 min à 200 °C (Kringel et al., 2020). Os bolos foram resfriados por 30 min à temperatura ambiente (20°C ± 5), acondicionados em sacos de polipropileno e armazenados à -18°C até as análises.

2.5 Métodos de análise: Caracterização do ICP, ICPE e bolos

2.5.1 Análise de ácidos clorogênicos

A quantificação dos ácidos clorogênicos foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (UFLC, Shimadzu, Japão) operando em 325 nm, equipado com injetor automático e bomba quaternária, coluna Zorbax eclipse plus C18 (Agilent, Technologies, Califórnia, EUA) de 2,1 mm de i.d., 100 mm de comprimento e 3,5 µm de tamanho de partícula, mantida sob temperatura de 35 °C, conforme método descrito por (Paim et al., 2023).

A fase móvel composta de A (água acidificada com 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila), em um sistema de eluição gradiente. A eluição do sistema inicial de fase móvel foi de 10% de B, com aumento linear até 20% de B em 5 min. Em 8 min, foi aumentado até 40% de B. De 8,1 a 9,5 min, a composição foi de 100% de B para limpeza da coluna de 9,6 a 15 min. Então a coluna foi recondicionada com 10% de B. A vazão da fase móvel foi mantida em 0,2 mL.min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL. A identificação dos ácidos clorogênicos foi realizada por comparação com padrão analítico através do tempo de retenção, espectro de absorção do DAD e por co-cromatografia.

O extrato livre de IPC foi diluído em água ultrapura, filtrado em membrana de nylon de porosidade de 0.22 µm e analisado. Para análise dos ácidos clorogênicos presentes na parte externa e na superfície de IPCE, foram pesados (100 mg) em tubos de centrifuga de 50 mL. Em seguida foi adicionado 10 mL de etanol: água (75:25) para rompimento dos IPCE, agitado em vórtex por 5 min, adicionado de 50 µL de ácido tricloroacético saturado, homogeneizado levemente e centrifugado durante 10 minutos em 5000 g, à 20 °C. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana de nylon de porosidade de 0.22 µm e submetido à análise. Para análise dos ácidos clorogênicos presentes na superfície dos IPCE (compostos não encapsulados), foram pesados (100 mg) em tubos de centrifuga

de 50 mL. Então, foi adicionado 10 mL de etanol: água (20:80) para lavagem da parte externa dos IPCE, agitado em vórtex por 5 min, adicionado de 50 µL de ácido tricloroacético saturado, homogeneizado levemente e centrifugadas durante 10 minutos em 5000 g, à 20 °C. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana de nylon de porosidade de 0.22 µm e submetido à análise. Para análise do teor de ácidos clorogênicos presente em bolos assados, foram pesados (1 g) de amostra em tubos de centrífuga de 50 mL e adicionou-se 10 mL de etanol: água (75:25), seguido de agitação em vórtex por 5 min. Na sequência, foi adicionado 5 mL de hexano e 50 µL de ácido tricloroacético saturado à mistura, homogeneizado levemente e centrifugado durante 10 minutos a 5000 g, à 20 °C. A fração contendo etanol:água foi cuidadosamente coletada, filtrada em membrana de nylon de porosidade de 0.22 µm e submetida à análise cromatográfica.

Para a quantificação dos ácidos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-CQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA foi utilizada a curva analítica do padrão 3-CQA. O método foi validado através dos parâmetros de limite de detecção, quantificação, linearidade, precisão no dia e entre dias, seguindo as orientações da International Union of Pure and Applied Chemistry (Thompson, Ellison, & Wood, 2002), e apresentou resultados adequados para as análises em questão.

2.5.2 Eficiência de Encapsulamento (%EE) e Capacidade de Carregamento (%LC)

A %EE foi calculada conforme a equação 1, considerando a concentração de cada ácido clorogênico (TC) e a concentração destes compostos na superfície do IPCE (S), corrigida pela massa seca dos encapsulados (Paim et al., 2023).

$$\%EE = \frac{TC-S}{TC} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A %LC foi calculada pela razão entre a massa de ácidos clorogênicos presente nos IPCE (A) e a concentração de ácidos clorogênicos presentes no extrato livre de IPC submetido ao encapsulamento (B) utilizando a equação 2 (Paim et al., 2023).

$$\%LC = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

2.5.3 Morfologia

Os IPCE foram suspensos em água destilada 1% (p/v) e mantidos em banho de ultrassom por 30 minutos. Uma fração foi retirada e depositada em um “stub” e seca em estufa por 2h a 30°C. A morfologia foi examinada utilizando um

microscópio eletrônico de varredura (VEGA3- TESCLAN ANALYTICS, Fuveau, França), sob tensão aceleradora de 5.9K. O diâmetro médio dos IPCE foi estimado a partir da medição de 50 partículas usando o software ImageJ (versão 2015, EUA).

2.5.4 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos ácidos clorogênicos presentes no extrato de IPC e nos IPCE foi determinada utilizando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) (Polyma 204, Netzsch, Selb, Alemanha) (Paim et al., 2023). Aproximadamente 2 mg de cada amostra foi pesada diretamente em cadinhos de alumínio e seladas hermeticamente. As amostras foram aquecidas de 20 à 300 °C a 10 °C min⁻¹, sob fluxo de N₂ a 40 mL min⁻¹. Um cadinho vazio foi usado como referência. A temperatura de pico foi determinada pelo evento térmico máximo do termograma.

A análise de termogravimétrica (TGA) foi realizada na zeína em pó, no extrato livre de IPC e no IPCE da condição ótima experimental. Utilizou-se um analisador termogravimétrico (DTG 60, Shimadzu, Japão). As amostras (5-10 mg) foram aquecidas em cápsulas de platina entre 30 e 600°C, sob fluxo de N₂ a 50 mL min⁻¹, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ empregando uma cápsula de platina vazia como referência.

2.5.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR)

Os espectros da zeína em pó, do IPC e do IPCE da condição ótima experimental foram obtidos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier sob refletância total atenuada (ATR-FTIR) (IRTracer-100, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão). Os espectros foram obtidos entre 4000–800 cm⁻¹ no modo de transmissão por 45 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹.

2.6 Estabilidade dos ácidos clorogênicos encapsulados durante o armazenamento

O IPCE da condição ótima experimental foi armazenado a 4°C em frascos hermeticamente fechados e tiveram o teor de ácidos clorogênicos determinados logo após a produção (início), após 6 e 12 meses. Os seis isômeros de ácidos clorogênicos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-CQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência conforme o método

264 descrito no item 2.5.1.

265

3 Resultados e discussão

3.1 Otimização multivariada do encapsulamento

The %EE, %LC dos seis isômeros de ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA), a soma dos ácidos cafeoilquínicos – CQAs, ácidos dicafeoilquínicos – DQA e da soma total dos ácidos clorogênicos, assim como a estabilidade térmica e o tamanho dos IPCE, conforme otimização multivariada, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Os modelos matemáticos que descrevem o comportamento das variáveis vazão de alimentação (5 a 30 mL/h), temperatura do ar de entrada (110 a 150 °C) e concentração do extrato na solução carreadora (35 a 100%, v/v) estão descritos na Tabela S1. Dos 20 modelos matemáticos, apenas 1 apresentou falta de ajuste significativa (%EE para o 3,5-DQA). O teste de falta de ajuste pode apresentar falsos resultados quando os desvios padrão relativos são muito baixos ou muito elevados, o que indica que não correspondem à realidade experimental. Quando o erro experimental é demasiadamente pequeno os resultados de falta de ajuste significativa são favorecidos, por outro lado, quando o erro experimental é demasiadamente grande, é favorecido o erro de ausência de falta de ajuste.

Nos dados apresentados nas tabelas 1 e 2 observamos que os desvios padrão relativos do ponto central do delineamento variaram entre 0,21 e 10,66% para %EE, %LC e estabilidade térmica. Estes desvios padrões são totalmente aceitáveis quando consideradas as inúmeras etapas entre o preparo do extrato de IPC, obtenção do IPCE e análise cromatográfica. O tamanho dos IPCE apresentou variação de 25,3%, que também é esperado, dada a robustez do processo. Essas variações experimentais são consistentes com os processos envolvidos. Dessa forma, pode-se dizer que a ausência de falta de ajuste não ocorreu por um falso resultado do teste. No entanto, com os graus de liberdade disponíveis nesse delineamento experimental, somente foi possível estabelecer regressões significativas (lineares ou quadráticas) para 5 modelos matemáticos (%EE para o 3,4-DQA e para o 4,5 DQA, %LC para o 3,4-DQA, para o 3,5-DQA e para a soma dos DQAs). As demais variáveis dependentes poderiam ter modelos ajustados se houvessem mais graus de liberdade. Tendo em vista que poucos modelos descrevem as variáveis com qualidade matemática adequada, a equipe de

trabalho optou por não usar os modelos para predição, e optou pela inspeção dos resultados experimentais.

A %EE dos ácidos clorogênicos foi diferente entre os CQAs e DQAs (Tabela 2). Os DQAs apresentaram %EE ~ 90%. Por outro lado, os CQAs apresentaram variação na %EE entre 31% e 62% (Tabela 1). Os CQAs, são compostos mais polares os DQAs, aspecto que possivelmente interfere na capacidade de interação com a zeína. A condição experimental que empregou vazão de alimentação 10,1 mL/h, aliado à temperatura do ar de entrada de 141,9 °C e concentração de extrato reduzida (48,2%, v/v) foi a condição experimental (exp. 3, Tabela 1) que apresentou melhor %EE para o CQAs (62,4%).

Ainda, o uso de temperatura do ar de entrada intermediária e baixa (110 °C e 130 °C, respetivamente), condições experimentais 11, 15-17, reduziram a eficiência de encapsulamento da soma dos CQAs e soma total dos ácidos clorogênicos. A temperatura do ar de entrada no “spray drier” promove a remoção da água e do etanol presentes na mistura de extrato de IPC e a zeína, resultando em um pó seco. Com base nesse aspecto, temperaturas elevadas formam rapidamente uma camada semi-poroso na superfície das partículas, resultando da rápida difusão do solvente do interior para a superfície das partículas ((WANG et al., 2016). Desta forma, acredita-se que pode ter havido a co-difusão dos compostos com estrutura molecular menor com os solventes, resultando assim, em reduzida %EE.

Elevadas vazões de alimentação em processos que exijam maior produtividade também podem causar condensação das paredes ou partículas úmidas na câmara ou ciclone, devido ao aumento da viscosidade, aglomeração e umidade residual. Esta operação também pode resultar no depósito das partículas secas nas paredes do secador, o que leva à redução da recuperação de material particulado (Koker et al., 2014). Por outro lado, baixas vazões de alimentação resultam em maior condensação de água, aglomerando ou depositando partículas na câmara de secagem demandando maior tempo de secagem pela técnica de spray (Espejo-Carpio et al., 2023).

A elevada concentração do extrato (v/v) teve impacto negativo na eficiência de encapsulamento total dos compostos (condição experimental 14). A elevada concentração dos ácidos clorogênicos provavelmente excederam a capacidade carreadora da zeína e não foram aprisionados pela proteína. Ainda, é sugerido que

alguns compostos fenólicos presentes em extrato de *Sambucus nigra* L. resultaram em elevada adesão das partículas às paredes do spray drier, desfavorecendo o encapsulamento (Ribeiro & Estevinho, 2019). A concentração de extrato de folha de amoreira encapsulada por spray-drying apresentou influência do material carreador, o que resultou em uma redução da capacidade de encapsulamento (Tchabo et al., 2019). Ainda, também houve diferente interação entre os CQAs e DQAs com a zeína, já que a %EE dos DQAs foi de 91,7%, enquanto a dos CQAs foi de 31,7% (condição experimental 14). Tal resultado corrobora com a hipótese de que os CQAs, pela alta polaridade, têm menor afinidade pela estrutura nucleada da zeína do que os DQAs. Visto que ambos são polares e estão em alta concentração, a maior afinidade química é dos DQAs (Tabela 1).

A %LC do extrato de IPC apresentou comportamento semelhante à %EE, notavelmente superior para os DQAs em relação aos CQAs. A soma de todos os isômeros apresentou % LC de 66% a 90% (Tabela 1). Esta elevada capacidade de carregamento é consequência do processo de spray-drying, o qual promove a evaporação do solvente com simultâneo aprisionamento dos ácidos clorogênicos. Os ácidos clorogênicos de extrato de IPC encapsulados por precipitação antissolvente com zeína apresentaram apenas 23% de %LC (Paim et al., 2023). Por outro lado, aproximadamente 99,1% de ácidos clorogênicos foram efetivamente incorporados em filmes de amido modificado por alta pressão hidrostática (ZHANG et al, 2024).

Assim, o método de obtenção de encapsulados para ser considerado uma boa ferramenta deve possuir como características elevadas %EE e %LC, notável estabilidade contra condições ambientais (armazenamento a longo prazo, temperatura, pH), boa biocompatibilidade, liberação controlada eficaz e bioacessibilidade aprimorada dos materiais principais (ZHANG et al., 2021). Desta forma, o uso de zeína como carreador de extrato de IPC rico em ácidos clorogênicos é eficiente quando se utiliza spray-drying para o seu encapsulamento.

3.2 Caracterização do extrato de IPC encapsulado (IPCE) por spray-drying.

3.2.1 Morfologia

Os IPCE apresentam-se na forma de aglomerado de partículas arredondadas com superfície lisa e regulares (Figura 2). A morfologia dos IPCE não foi influenciada pelas condições experimentais do delineamento multivariado

e todos os IPCE apresentaram partículas com tamanhos variados de até 5 µm (Tabela 2). A variação de tamanho das partículas é uma característica dos pós secos por spray-drying (Jansen-Alves et al., 2019). Ainda, partículas agregadas são frequentemente relatadas quando proteínas são utilizadas como material de parede para o encapsulamento de diferentes substâncias (Jansen-Alves et al., 2019; Nimbkar et al., 2023).

A vazão de alimentação afeta o tamanho das gotas atomizadas no spray drying, portanto, o tamanho das partículas secas (Elham et al., 2022). Ainda, a viscosidade elevada das soluções de proteína e de extrato a ser encapsulado tende a resultar na formação de partículas com superfícies lisas e pouco aglomeradas (Nimbkar et al. 2023). Por outro lado, nanopartículas de zeína com sulfato de condroitina produzidas por precipitação antissolvente também exibiram estruturas esféricas regulares (Yuan et al., 2019). Isso sugere que a zeína contribui para a formação de partículas secas com superfície lisa e regulares.

3.2.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica dos ácidos clorogênicos presentes nos IPCE foi verificada pela presença de apenas um evento endotérmico na análise de DSC, para todas as condições experimentais, o que forneceu a temperatura de fusão do material analisado (Tabela 2). Dentre as condições experimentais, a maior estabilidade térmica do IPCE (241-248 °C) foi verificada ao se empregar vazão de alimentação intermediária 17,5 mL/h (condições experimentais 12 e 13). Estas condições experimentais apresentaram %EE de 70-73% (Tabela 1). Por outro lado, quando a maior concentração de extrato de IPC foi adicionada à solução carreadora de zeína (100%) para produção do IPCE, a estabilidade térmica foi reduzida (155,9 °C), bem como a %EE (61,8%) (Tabela 1). Este comportamento leva a crer que há efeito protetor dos ácidos clorogênicos presentes no extrato de IPC, decorrente do uso da zeína como material carreador. Os IPCE, independentemente da condição experimental, apresentaram 59,8% de correlação entre a %EE (61%-79,1%) e a temperatura do pico endotérmico, a qual variou entre 155 °C – 229,8 °C.

No entanto, uma pequena parte dos ácidos clorogênicos pode ter sofrido degradação pelas altas temperaturas empregadas no spray-drying para a completa secagem. A exposição a altas temperaturas durante o spray-drying pode resultar

em degradação térmica de compostos termolábeis (Oikonomopoulou et al., 2022) como vitaminas (Nimbkar et al., 2023) e compostos fenólicos (Jansen-Alves et al., 2019). Da mesma forma, o extrato de *Ilex paraguariensis* liofilizado apresentou pico endotérmico à 150,9 °C, e quando encapsulado com fructo-oligosacarídeos seu pico endotérmico foi deslocado para 201,6 °C, o que indica maior estabilidade térmica dos ácidos clorogênicos quando encapsulados (Pilatti-riccio et al., 2019).

Para elucidar este comportamento, avaliou-se por termogravimetria (TG) a zeína, o extrato de IPC liofilizado e o IPCE na condição experimental otimizada (exp. 5). As três amostras apresentaram um único evento térmico predominante de perda de massa (Tabela 3). O extrato liofilizado de IPC apresentou decomposição térmica entre 242,8 °C (T_{on}) até 310,4 °C (T_{end}), e consequente perda de massa de 67,6 %. A zeína apresentou perda de massa de 68,1% a 290 °C (T_{on}) e 350 °C (T_{end}). O IPCE apresentou estabilidade térmica melhorada, com T_{on} a 284 °C e T_{end} a 338,1 °C, e consequente perda de massa de 67,1% (Tabela 3). Desta forma, a proteção dos ácidos clorogênicos do extrato de IPC pela zeína utilizando spray-drying para o encapsulamento aumentou ~ 41 °C.

Em nosso primeiro trabalho, a zeína foi utilizada para encapsulamento antisolvente de extrato de coproduto de *I. paraguariensis* com incremento da temperatura de encapsulamento de ~ 47°C (Paim et al., 2023). As micropartículas de zeína carregas com extrato aquoso de cascas de noz pecan apresentaram estabilidade térmica de até 200 °C e consequente liberação de compostos fenólicos 2,3 vezes superior que os extratos na sua forma aquosa (Kureck et al., 2018). Sugere-se que as principais interações entre a zeína e alguns ácidos fenólicos são as ligações de hidrogênio e as ligações iônicas, além de interações hidrofóbicas que induzem a um rearranjo da estrutura secundária da zeína (LIU et al, 2017). Assim, acredita-se que essas interações também contribuem para ampliar a estabilidade térmica dos ácidos clorogênicos quando encapsulados com essa proteína.

3.2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A zeína, o extrato de IPC liofilizado e o IPCE (10,1 mL/h vazão de alimentação, 118,1 °C temperatura do ar de entrada e 86,8% de extrato de IPC na solução carreadora) foram analisados por FTIR-ATR (Figura 1). A banda 3000-

3500 cm^{-1} , relacionada à vibração de alongamento -OH da água ligada, é verificada na zeína, no extrato de IPC liofilizado e no IPCE, com sobreposição da banda em 3300-3400 cm^{-1} relacionada a ligação N-H na zeína, decorrente da presença de amida secundária (LIU et al., 2017). No espectro do IPCE a banda 3350-3250 cm^{-1} está pronunciada, provavelmente relacionada ao estiramento N-H de amida secundária. As vibrações em 2994 e 2926 cm^{-1} relacionadas ao estiramento C-H₃ foram verificadas na zeína e no extrato de IPC. No IPCE houve um deslocamento para 2941 cm^{-1} , o que indica uma interação entre a zeína e o extrato de IPC (Figura 1).

Além disso, as bandas em 1633 cm^{-1} , 1679 cm^{-1} e 1639 cm^{-1} estão presentes na zeína, no extrato de IPC liofilizado e no IPCE, respectivamente, e correspondem ao estiramento C-O (Figura 1). As bandas em 1639 cm^{-1} (alongamento C=O da amida I), 1598 cm^{-1} (alongamento de C-N da amida II), 1256 cm^{-1} e 1133 cm^{-1} (alongamento de N-H da amida II) são observados no extrato de IPC. Dentre estas bandas, apenas em 1633 cm^{-1} é observada na zeína e apenas 1639 cm^{-1} no IPCE (Figura 1). Este comportamento é indicação de interações entre o extrato de IPC e os grupos amina da zeína. As bandas 1518 cm^{-1} – 1512 cm^{-1} estão presentes nos três espectros. As bandas 1653 cm^{-1} e 1539 cm^{-1} são descritas como características para proteínas, como a zeína (Yuan et al. 2019). Os extratos derivados de *I. paraguariensis* além dos ácidos clorogênicos apresentam concentrações de metilxantinas como teobromina e cafeína, os quais também são compostos nitrogenados (Meinhart et al., 2017).

As principais interações entre a zeína e os ácidos fenólicos são as ligações de hidrogênio e as ligações iônicas, além de interações hidrofóbicas que induzem a um rearranjo da estrutura secundária da zeína (LIU et al, 2019). Desta forma, outras bandas foram observadas no IPCE, em 1437 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} , sugerindo que a presença de grupos metil presentes no extrato de IPC e a ligação C-O presente nos compostos fenólicos (Vargas et al., 2021).

Além disso, a ocorrência de interações eletrostáticas durante a complexação da zeína com a curcumina refletida pela mudança do comprimento de onda da banda da amida II de 1533 cm^{-1} da zeína para 1514 cm^{-1} nas nanopartículas carregadas com curcumina. As mudanças conformacionais na estrutura secundária de fibras eletrofiadas de zeína carregadas com óleo de peixe também promoveram a formação de estruturas secundárias em α -hélice da

proteína (MOOMAND; LIM, 2014).

3.3 Estabilidade do IPCE durante o armazenamento

O IPCE produzido na condição otimizada foi armazenado a 4 °C por 12 meses. A concentração dos seis isômeros de ácidos clorogênicos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-DQA, 3,5-DQA e 4,5-DQA) presentes no IPCE foram estatisticamente iguais (com 95% de confiança) quando analisados logo após a secagem e após 6 e 12 meses de armazenamento. Este resultado evidencia que o processo de encapsulamento por spray-drying utilizando zeína como carreador protegeu os ácidos clorogênicos que normalmente degradam nessas condições, quando em solução aquosa ou com outro solvente orgânico.

3.4 Aplicação de extrato de IPC livre e IPCE em bolos

A adição de 6-21 mL de extrato de IPC livre em bolos resultou em 8,9 - 27,7 mg de ácidos clorogênicos totais 100 g⁻¹ de bolo assado, enquanto a adição de 0,5-1,75% de IPCE resultou em 7,6-26,5 mg 100g⁻¹. Após o assamento, as concentrações de 5,1-21,9 mg de ácidos clorogênicos totais em 100 g⁻¹ de bolo assado foram verificadas com a adição de extrato de IPC livre e 6,5-26,8 mg 100 g⁻¹ quando de 0,5-1,75% de IPCE foram incorporados aos bolos (Figura 3). Este comportamento apresentou variações entre cada isômero do ácido clorogênicos, indicado diferentes estabilidade térmicas de cada composto (Tabela S3), e os resultados corroboram com a estabilidade térmica estudada por DSC (Tabela 2).

Os bolos com adição de extrato livre apresentaram um percentual de preservação dos ácidos clorogênicos totais após o forneamento de 59,6% a 79,5% (Tabela 4). A formulação com adição de 10 mL de extrato livre apresentou melhor desempenho preservando 70,9% dos ácidos clorogênicos totais quando comparada a quantidades superiores de extrato adicionadas, visto que a formulação com 21 mL de extrato livre preservou apenas 79,5%. Os bolos com adição de IPCE apresentaram percentual elevado de preservação dos ácidos clorogênicos totais após forneamento (Tabela 4), sendo superior a 82 %. A adição de 1,12%, 1,43% e 1,75% de IPCE resultou em ~100% de preservação do total de ácidos clorogênicos adicionados em cada formulação de bolo. Com isso podemos notar que o encapsulamento do extrato de IPC foi uma ótima forma de evitar a degradação dos compostos após forneamento, sendo uma alternativa para a

incorporação eficiente em produtos do tipo bolo e panificados no geral. Alguns dos ácidos clorogênicos apresentam preservação maior que 100%, o que indica prováveis isomerizações de posição dos ácidos cafeicos esterificados ao ácido quínico.

A eficiência de encapsulamento de curcumina e α -tocoferol para posterior aplicação em biscoitos, foi de 90,59% e 98,89%, respectivamente. Este encapsulamento foi capaz de manter 90% ad capacidade antioxidante dos compostos bioativos após o forneamento dos biscoitos (PAMUNUWA et al., 2023). Além disso, extrato de vassoura de açougueiro (*Ruscus Hyrcanus L.*) nanoencapsulado com maltodextrina e goma Arabica foi incorporado em bolos e apresentou uma eficiência de encapsulamento maior que 80%. O extrato nanoencapsulado, após forneamento a 150 °C, foi capaz de evitar o desenvolvimento de bolores e leveduras por até 20 dias de armazenamento dos bolos. Além disso, o nanoencapsulamento foi capaz de reter a capacidade antioxidante dos compostos bioativos do extrato no bolo após o forneamento (MAHMOUDI et al., 2020)

A inclusão em bolos de extrato de própolis encapsulados com proteína de ervilha resultou em maior atividade antimicrobiana, quando comparados com a amostra de bolo utilizando o extrato de própolis livre. A eficiência de encapsulamento que variou de 49,40% a 97% permitiu que ~50% dos compostos fenólicos totais fossem reservados após o forneamento dos bolos, quando comparados ao extrato livre (Jansen-Alves et al. 2019).

Conclusão

O processo de encapsulamento de extrato rico em ácidos clorogênicos por spray-drying foi estudado, bem como a incorporação dos IPCE em produtos do tipo bolo. Nossos resultados revelaram que é possível obter 75,2% de eficiência de encapsulamento, 66% de eficiência de carregamento e estabilidade térmica 40 °C maior dos ácidos clorogênicos com o uso de zeína como material carreador, que o extrato de IPC na sua forma livre. Ao ser incorporado em bolos, o extrato encapsulado preservou 94,4% dos ácidos clorogênicos após forneamento, em detrimento à 69,3 % quando o extrato livre foi empregado. O IPCE obtido na condição ótima apresentou estabilidade dos ácidos clorogênicos durante 12

538 meses, sob refrigeração à 4°C, condição que naturalmente resultaria na
539 degradação destes compostos funcionais. Só esse resultado, já evidencia o
540 potencial do processo de encapsulamento otimizado. Mais que isso, os resultados
541 indicam que o extrato obtido a partir de uma matriz natural totalmente
542 negligenciada como o coproduto de *Ilex paraguariensis* pode ter seus compostos
543 extraídos e preservados, o que permite a sua utilização em diversos alimentos,
544 pela adição de compostos com propriedades promotoras de saúde, além de
545 reaproveitar uma matéria-prima pouco utilizada e que seria descartada pela cadeia
546 produtiva. Estudos futuros podem apresentar resultados promissores ao investigar
547 a bioacessibilidade e biodigestibilidade dos compostos nas diferentes formas de
548 adição em produtos panificados.

Financiamento e considerações éticas

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) PQ Gaúcho 19/2551-0001637-9, Edital 05/2019. Para a identificação botânica foi realizado depósito de amostra no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (26978). A pesquisa está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (A937529). A autora Vania Zanella Pinto agradece à Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) pelo apoio financeiro (PES-2022-0184) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa de produtividade (303720/2022-0). Os autores agradecem ao Programa SisNANO, ao MCTI, ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Laboratório Temático de Microscopia e Nanotecnologia (LTMN) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os autores declaram que não há conflitos éticos para a publicação do trabalho.

Referências

- Elham, S., Kalajahi, M., & Ghandiha, S. (2022). Optimization of spray-drying parameters for encapsulation of Nettle (*Urtica dioica* L.) extract. *LWT*, 158, 113149. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113149>.
- Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2023). *Encapsulation of Bioactive Peptides by Spray-Drying and Electrospraying*.
- Fayad, E., El-Sawalhi, S., Azizi, L., Beyrouthy, M., & Abdel-Massih, R. M. (2020). Yerba Mate (*Ilex paraguayensis* L.) F. et al. A Comparative Study of Covalent and Non-Covalent Interactions between Zein and Polyphenols in Ethanol-Water Solution. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 625–634, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.041>>.
- MAHMOUDI, L. et al. Ultrasonication and Encapsulation of Butcher Broom (*Ruscus Hyrcanus* L.) Extract and Its Bioactive Effects on Qualitative Properties, Oxidative Stability and Shelf Life of Cake. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, n. July, p. 100295, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100295>>.
- PAMUNUWA, G. K. et al. Effect of Liposomal Encapsulation of Curcumin and α -

Tocopherol on Sensory and Physicochemical Properties, and Retention of Antioxidant Capacity of Fortified Cookies during Baking. **Food Chemistry Advances**, v. 3, n. October, p. 100504, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100504>>.

WANG, Y. et al. Micro-Encapsulation and Stabilization of DHA Containing Fish Oil in Protein-Based Emulsion through Mono-Disperse Droplet Spray Dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 74–84, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.007>>.

ZHANG, Q. et al. Nanostructures of Protein-Polysaccharide Complexes or Conjugates for Encapsulation of Bioactive Compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, n. January, p. 169–196, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.026>>.

iensis) a potential food antibacterial agent and combination assays with different classes of antibiotics. *Lwt*, 125(January), 109267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109267>

Giraldo, C., & Diego, P. (2020). Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) flour and yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on physicochemical and sensory properties of a gluten free corn-based snack. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04850-3>

Harris, R., Lecumberri, E., Mateos-Aparicio, I., Mengibar, M., & Heras, A. (2011). Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 803–806. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.003>

Heck, R. T., da Rosa, J. L., Vendruscolo, R. G., Cichoski, A. J., Meinhart, A. D., Lorini, A., Paim, B. T., Galli, V., Robalo, S. S., Dos Santos, B. A., de Pellegrin, L. F. V., de Menezes, C. R., Wagner, R., & Campagnol, P. C. B. (2021). Lipid oxidation and sensory characterization of Omega-3 rich buffalo burgers enriched with chlorogenic acids from the mate (*Ilex paraguariensis*) tree harvesting residues. *Meat Science*, 179(February), 108534. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108534>

Huang, X., Li, T., & Li, S. (2023). Encapsulation of vitexin-rhamnoside based on zein/pectin nanoparticles improved its stability and bioavailability. *Current Research in Food Science*, 6(September 2022), 100419. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100419>

- Jansen-Alves, C., Krumreich, F. D., Zandoná, G. P., Gularte, M. A., Borges, C. D., & Zambiazzi, R. C. (2019). Production of Propolis Extract Microparticles with Concentrated Pea Protein for Application in Food. *Food and Bioprocess Technology*, 12(5), 729–740. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-2246-2>
- Jiang, G. L., & Zhu, M. J. (2019). Preparation of astaxanthin-encapsulated complex with zein and oligochitosan and its application in food processing. *Lwt*, 106(February), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.055>
- Koker, S. De, Fierens, K., Dierendonck, M., Rycke, R. De, Lambrecht, B. N., Grooten, J., Paul, J., & Geest, B. G. De. (2014). Nanoporous polyelectrolyte vaccine microcarriers. A formulation platform for enhancing humoral and cellular immune responses. *Journal of Controlled Release*, 195, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.043>
- Kringel, D. H., Max, W., Bárbara, S., Bressan, S., Lim, W. L., Renato, A., Dias, G., & Zavareze, R. (2020). Free and encapsulated orange essential oil into a β -cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. *October 2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14411>
- Kungel, P. T. A. N., Correa, V. G., Corrêa, R. C. G., Peralta, R. A., Soković, M., Calhella, R. C., Bracht, A., Ferreira, I. C. F. R., & Peralta, R. M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1161–1167. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.020>
- Kureck, I., Policarpi, P. D. B., Toaldo, I. M., Vinícius, M., Brisola, D. O., & Block, J. M. (2018). Chemical Characterization and Release of Polyphenols from Pecan Nut Shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] in Zein Microparticles for Bioactive Applications. *Plant Foods for Human Nutrition* <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0667-0>.
- López-córdoba, A., Deladino, L., Agudelo-mesa, L., & Martino, M. (2014). Yerba mate antioxidant powders obtained by co-crystallization: Stability during storage. *124*, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.010>
- Lorini, A., Aranha, B. C., Antunes, B. da F., Otero, D. M., Jacques, A. C., & Zambiazzi, R. C. (2021). Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times. *Food Chemistry*, 345(December 2020), 128758. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128758>
- Lorini, A., Damin, F. M., Oliveira, D. N. De, Rombaldi, C. V, Zavareze, E. R., Dias,

Á. R. G., Godoy, H. T., Silva, W. P., Galli, V., Meinhart, A. D., Lorini, A., Damin, F. M., Oliveira, D. N. De, Ramires, T., Rombaldi, C. V, Zavareze, E. R., Dias, Á. R. G., Godoy, H. T., Wladimir, P., Meinharta, A. D. (2022). *Revista de Ciência Ambiental e Saúde, Parte B Pesticidas, Contaminantes de Alimentos e Resíduos Agrícolas*. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.2020530>

Meinhart, A. D., Damin, F. M., Caldeirão, L., da Silveira, T. F. F., Filho, J. T., & Godoy, H. T. (2017). Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. *Food Research International*, 99(March), 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.017>

Nimbkar, S., Leena, M. M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2023). Development of iron-vitamin multilayer encapsulates using 3 fluid nozzle spray-drying. *Food Chemistry*, 406(November 2022), 135035. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135035>

Nooshkam, M., Varidi, M., & Bashash, M. (2019). The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry*, 275(September 2018), 644–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.083>

Oikonomopoulou, V., Stramarkou, M., Plakida, A., & Krokida, M. (2022). Optimization of encapsulation of stevia glycosides through electrospraying and spray-drying. *Food Hydrocolloids*, 131(January), 107854. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107854>

Paim, B. T., Rosas, A. L. G., Lorini, A., Pinto, V. Z., Peres, G. L., Zavareze, E. da R., Galli, V., Hackbart, H. C. dos S., Kringel, D. H., & Meinhart, A. D. (2023). Exploring the potential of *Ilex paraguariensis* coproduct: High concentration of chlorogenic acids and enhanced thermal stability. *Food Chemistry Advances*, 3, 100524. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100524>

Penalva, R., Esparza, I., Larraneta, E., González-Navarro, C. J., Gamazo, C., & Irache, J. M. (2015). Zein-Based Nanoparticles Improve the Oral Bioavailability of Resveratrol and Its Anti-inflammatory Effects in a Mouse Model of Endotoxic Shock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5603–5611. <https://doi.org/10.1021/jf505694e>

Petroselli, G., Parapugna, T. L., Lagorio, M. G., & Erra-Balsells, R. (2019). MALDI- and LDI-MS saponin fingerprint of leaves and stick components of commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Mass Spectrometry*, 54(2), 195–203.

<https://doi.org/10.1002/jms.4324>

Pilatti-riccio, D., Fernando, D., Dillenburg, A., Antonio, M., Cristina, H., & Zanella, V. (2019). Impact of the use of saccharides in the encapsulation of *Ilex paraguariensis* extract. *Food Research International*, 125(June), 108600. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108600>

Ribeiro, A. M., & Estevinho, B. N. (2019). *Spray-drying Encapsulation of Elderberry Extract and Evaluating the Release and Stability of Phenolic Compounds in Encapsulated Powders*. 1381–1394.

Tchabo, W., Ma, Y., Kaptso, G. K., Kwaw, E., Cheno, R. W., Xiao, L., Osae, R., Wu, M., & Farooq, M. (2019). Process Analysis of Mulberry (*Morus alba*) Leaf Extract Encapsulation: Effects of Spray-drying Conditions on Bioactive Encapsulated Powder Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 12(1), 122–146. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2194-2>

Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single - Laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 74(5), 835–855.

Vargas, B. K., Frota, E. G., Franco dos Santos, L., Gutkoski, J. P., Lopes, S. T., Bertol, C. D., & Bertolin, T. E. (2021). Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) microparticles modulate antioxidant markers in the plasma and brains of rats. *Food Bioscience*, 41(March). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100999>

Wong, J. J. L., Wong, A. I. C., Xu, Y., & Yuliarti, O. (2020). Zein as a water insoluble excipient for spray dry encapsulation of hydrophilic bioactives. *Journal of Food Engineering*, 283, 110054. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110054>

Yuan, Y., Li, H., Liu, C., Zhu, J., Xu, Y., Zhang, S., Fan, M., Zhang, D., Zhang, Y., Zhang, Z., & Wang, D. (2019). Fabrication of stable zein nanoparticles by chondroitin sulfate deposition based on antisolvent precipitation method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.090>

Yuan, Y., Li, H., Zhu, J., Liu, C., Sun, X., Wang, D., & Xu, Y. (2020). Fabrication and characterization of zein nanoparticles by dextran sulfate coating as vehicles for delivery of curcumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1074–1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.149>

Zhang, H., Fu, Y., Xu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., Jin, B., Chen, G., & Li, X. (2019). One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and

improved bioaccessibility of propolis. *Food and Function*, 10(2), 635–645.
<https://doi.org/10.1039/c8fo01614c>

Tabela 1: Variáveis independentes e respostas obtidas no planejamento multivariado composto central para eficiência de encapsulamento dos ácidos clorogênicos do coproduto de *Ilex paraguariensis*

Exp	Variáveis e Níveis Codificados ⁽¹⁾			Variáveis e Níveis Decodificados			Eficiência de Encapsulamento (%EE) ⁽²⁾								
	A	B	C	Vazão (mL/h)	Temperatura (°C)	Extrato (% v/v)	5-CQA	3-CQA	4-CQA	3,4-DQA	3,5-DQA	4,5-DQA	Sum CQA	Sum DQA	Total
1	-1	-1	-1	10,1	118,1	48,2	50,5	58,1	57,5	74,7	94,7	95,3	55,9	93,1	74,9
2	1	-1	-1	24,9	118,1	48,2	49,3	56,8	55,5	79,6	88,4	90,5	54,5	88,6	71,6
3	-1	1	-1	10,1	141,9	48,2	58,1	64,8	62,4	86,8	97	95,8	62,4	95,4	79,1
4	1	1	-1	24,9	141,9	48,2	45,3	54,3	51	79,2	96,7	95,6	51	94,4	72,9
5	-1	-1	1	10,1	118,1	86,8	52,5	60,1	57,9	86,1	94,4	93,1	57,5	93	75,2
6	1	-1	1	24,9	118,1	86,8	52,6	60,7	58,6	83,1	94,4	92,8	58	92,8	75,3
7	-1	1	1	10,1	141,9	86,8	35,4	43,4	40,5	88	98,2	92,1	40,5	94,2	67,7
8	1	1	1	24,9	141,9	86,8	44,3	52,5	49,3	84,9	94,7	92,7	49,4	92,8	71
9	-1,68	0	0	5	130	67,5	33,1	41,2	37,4	86,1	98,5	91,1	38	93,7	66,1
10	1,68	0	0	30	130	67,5	33,3	39,7	36,7	82,9	98,2	92,9	37,2	94,1	66
11	0	-1,68	0	17,5	110	67,5	35	40,7	38,2	83,2	98	92,1	38,5	93,7	66,3
12	0	1,68	0	17,5	150	67,5	40,7	48,3	44,8	87	98,6	94,4	45,4	95,5	70,7
13	0	0	-1,68	17,5	130	35	45,9	52,6	49,4	78,9	98,8	96,2	50	95,5	73,2
14	0	0	1,68	17,5	130	100	26,6	34,6	31	88,4	97,5	87,6	31,6	91,7	61,8
15	0	0	0	17,5	130	67,5	34,6	42,6	39,8	86,6	98,2	92,2	39,8	94,1	67,1
16	0	0	0	17,5	130	67,5	28,8	36,1	32,4	84,4	98,1	91,4	33,2	93,5	63,7
17	0	0	0	17,5	130	67,5	34,1	41,5	38,4	84,4	98,5	93,3	38,7	94,7	67,2

(1) A: Vazão de alimentação (mL/h), B: Temperatura de atomização (°C) e C: % Extrato (v/v) na solução polimérica. (2) 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico; 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico; 4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico; 3,4-DQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-DQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-DQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico

Tabela 2: Variáveis independentes e respostas obtidas no planejamento multivariado composto central para eficiência de carregamento dos ácidos clorogênicos, estabilidade térmica e tamanho dos encapsulados do coproduto de *Ilex paraguariensis*

Exp	Variáveis e Níveis Codificados ⁽¹⁾			Variáveis e Níveis Decodificados			Capacidade de Carregamento (%LC) ⁽²⁾									Tamanho (µm)	Estabilidade térmica (°C)
	A	B	C	Vazão (mL/h)	Temperatura (°C)	Extrato (% v/v)	5-CQA	3-CQA	4-CQA	3,4-DQA	3,5-DQA	4,5-DQA	Sum CQA	Sum DQA	Total		
1	-1	-1	-1	10,1	118,1	48,2	79,3	74,8	77,6	100,3	81	83,6	76,7	84	79,8	3,1	194,2
2	1	-1	-1	24,9	118,1	48,2	90,2	85,7	88	85,7	92,8	96,5	87,5	94	90,1	3,8	229,5
3	-1	1	-1	10,1	141,9	48,2	77,2	73,8	75,9	94,4	78,9	83,6	75,3	82,6	78,3	3,8	209,9
4	1	1	-1	24,9	141,9	48,2	76,2	71,7	73,9	91,9	70,2	75,7	73,5	74,9	74,1	4,2	225,1
5	-1	-1	1	10,1	118,1	86,8	66,3	63,3	66	71,1	65,4	71,2	64,8	68,8	66,5	3,7	229,8
6	1	-1	1	24,9	118,1	86,8	84,5	81,8	85,5	72,4	87,5	91,5	83,5	88,1	85,4	4,0	190,8
7	-1	1	1	10,1	141,9	86,8	78	73,7	77,5	73	68	77,7	75,8	73,2	74,7	3,3	197,9
8	1	1	1	24,9	141,9	86,8	77,4	72,1	74,9	73,9	70,4	77,5	74,2	74,2	74,2	3,1	216,9
9	-1,68	0	0	5	130	67,5	91,7	86,4	88,4	83,8	78,9	87,5	88,3	83,6	86,4	4,4	174
10	1,68	0	0	30	130	67,5	80,4	76	78,6	80,2	68,8	76,4	77,8	73,6	76,1	4,7	187,8
11	0	-1,68	0	17,5	110	67,5	89,9	84,5	86,8	85,5	77	85,4	86,5	81,9	84,6	3,8	181
12	0	1,68	0	17,5	150	67,5	82,7	78,2	80,2	81,6	74,7	80,5	79,9	78,2	79,2	3,2	248,6
13	0	0	-1,68	17,5	130	35	91,6	86,5	88,7	94,3	85,6	91,1	88,4	89,1	88,7	3,1	241,1
14	0	0	1,68	17,5	130	100	84,6	79,8	82,4	69,5	70,2	81	81,7	75,4	79,1	5,0	155,9
15	0	0	0	17,5	130	67,5	89,4	85,7	88	85,1	77,6	86,9	87,3	82,9	85,5	3,8	214,3
16	0	0	0	17,5	130	67,5	88,2	83,7	85,5	81,8	74,4	81,9	85,3	78,7	82,6	3,0	179,8
17	0	0	0	17,5	130	67,5	77,1	72,5	74,8	77,2	67,6	73,3	74,3	71,3	73,1	4,9	200,5

(1) A: Vazão de alimentação (mL/h), B: Temperatura de atomização e C: % Extrato (v/v) na solução polimérica. ⁽²⁾ 5-CQA: *ácido 5-cafeoilquínico*; 3-CQA: *ácido 3-cafeoilquínico*; 4-CQA: *ácido 4-cafeoilquínico*; 3,4-DQA: *ácido 3,4-dicafeoilquínico*; 3,5-DQA: *ácido 3,5-dicafeoilquínico*; 4,5-DQA: *ácido 4,5-dicafeoilquínico*

Tabela 3: Propriedades térmicas do extrato de coproduto de *Ilex paraguariensis* encapsulado (IPCE)

Descrição	Propriedades Termicas		
	T _{on} [°C]	T _{end} [°C]	D _m [%]
Extrato de IPC	242,8	310,4	67.6
Zeína	290	349	68.1
IPCE	284	338,1	67,1

T_{on} : Temperatura Inicial; T_{end} : Temperatura final; D_m: Perda de massa

Tabela 4: Ácidos clorogênicos preservados em bolo adicionados de extrato do coproduto de *Ilex paraguariensis* (IPC) livre e IPCE em diferentes concentrações

Compostos preservados (%)	Extrato de IPC (mL)				
	6	10	13	17	21
5-CQA	43,3	53,5	58,9	52,6	57,8
3-CQA	86,2	100	94,3	90,0	109,7
4-CQA	38,6	48,8	47,5	45,4	55,3
3,4-DQA	238,9	266,1	259,6	226,4	250,6
3,5-DQA	34,4	41,8	46,0	45,9	56,7
4,5-DQA	52,9	64,1	60,1	60,7	72,6
Soma CQA	61,8	73,5	72,2	68,0	81,2
Soma DQA	57,0	67,8	67,0	65,0	77,6
Total	59,6	70,9	69,8	66,6	79,5
	Concentração de IPCE (%)				
	0,5	0,81	1,12	1,43	1,75
5-CQA	75,2	84,5	97,6	96,0	95,4
3-CQA	96,1	101,3	116,7	111,6	108,9
4-CQA	104,7	110,6	128,9	129,4	127,2
3,4-DQA	316,4	340,3	378,8	372,9	369,4
3,5-DQA	41,7	48,6	65,6	62,5	65,6
4,5-DQA	70,0	71,6	75,1	74,8	75,6
Soma CQA	92,0	98,3	113,6	110,2	108,2
Soma DQA	73,9	79,2	90,6	88,7	90,2
Total	82,9	88,7	102	99,4	99,1

5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico; 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico; 4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico; 3,4-DQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-DQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-DQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico

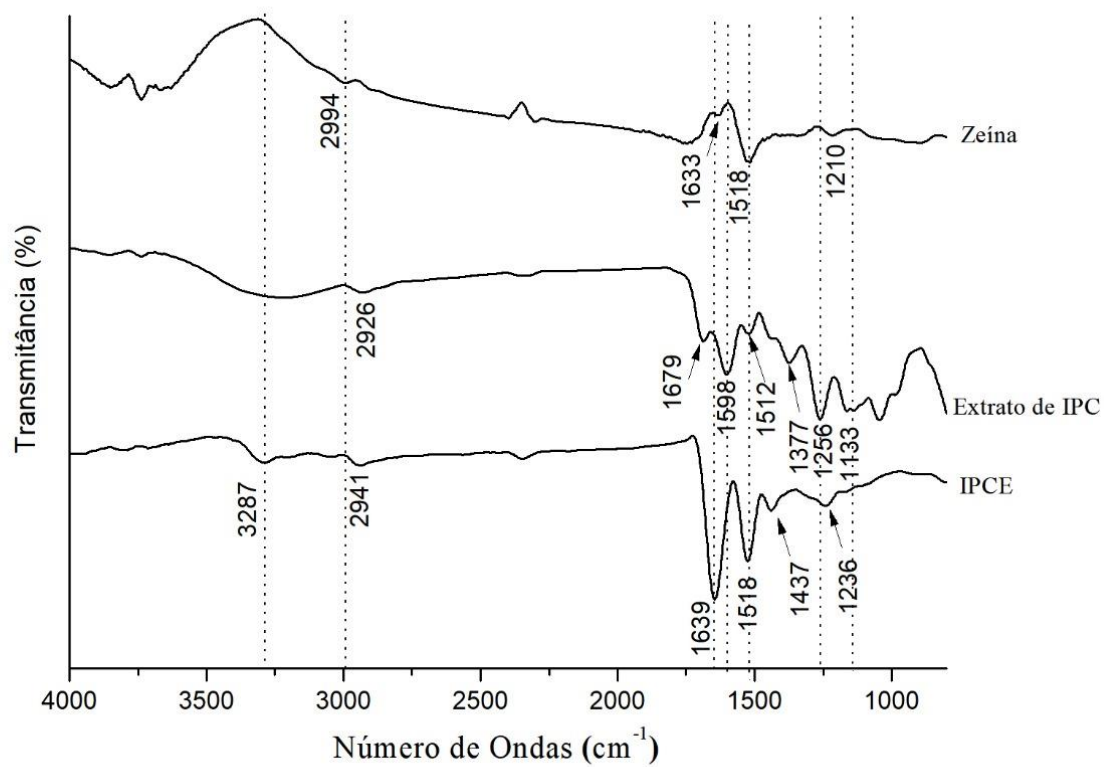


Figura 1:Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da zeína, extrato de co-produto de *Ilex paraguariensis* (IPC) liofilizado e do extrato de IPC encapsulado (IPCE).

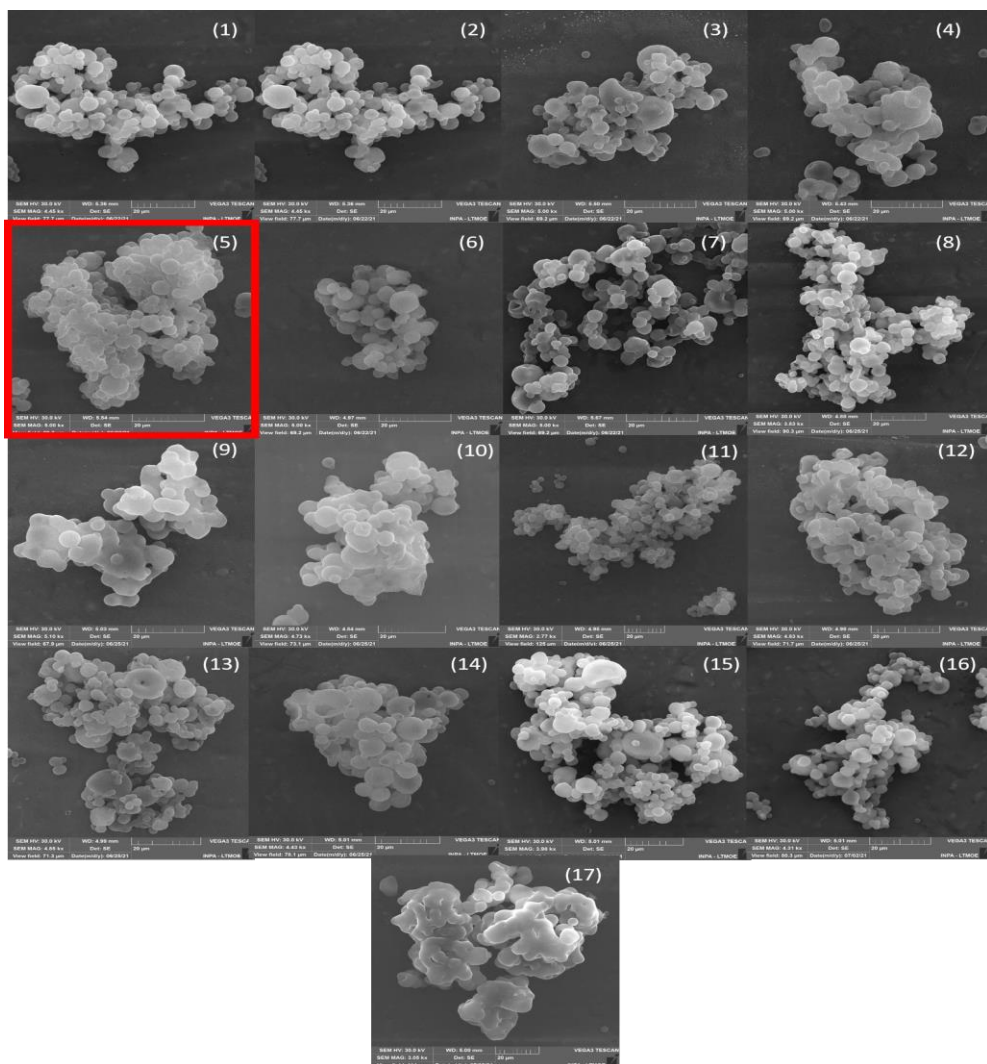


Figura 2: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos extratos de IPC encapsulados (IPCE) por spray-drying empregando planejamento multivariado. 1: Experimento 1; 2: Experimento 2; 3: Experimento 3; 4: Experimento 4; 5: Experimento 5; 6: Experimento 6; 7: Experimento 7; 8: Experimento 8; 9: Experimento 9; 10: Experimento 10; 11: Experimento 11; 12: Experimento 12; 13: Experimento 13; 14: Experimento 14; 15: Experimento 15; 16: Experimento 16; 17: Experimento 17. *número da condição experimental referente ao planejamento.

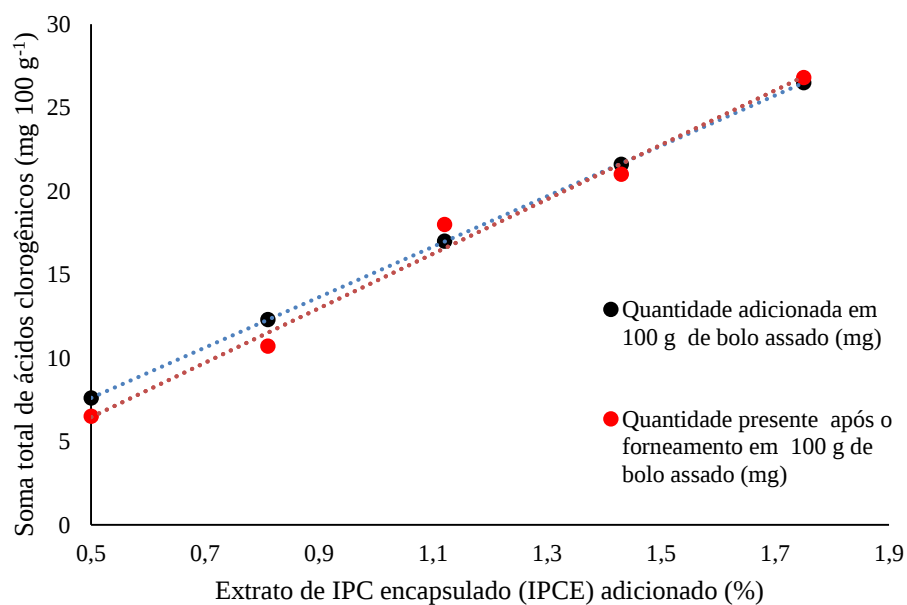
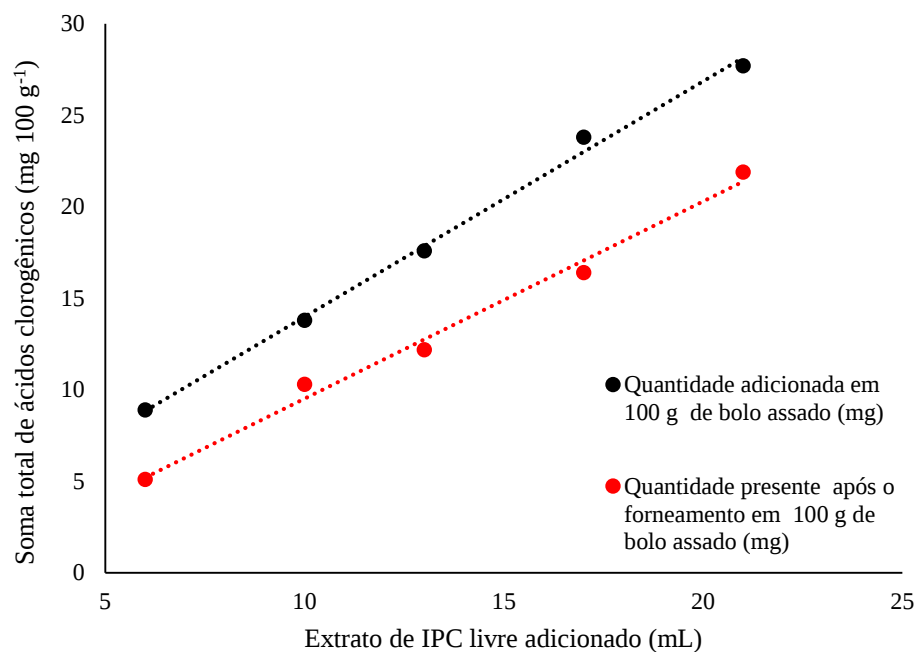


Figura 3: Soma dos isômeros de ácidos clorogênicos adicionados em bolo com extrato do coproduto de *Ilex paraguariensis* (IPC) livre e IPCE em diferentes concentrações

Material Suplementar

Tabela S 1: Validação dos modelos matemáticos obtidos no planejamento multivariado para o encapsulamento de coproduto de *Ilex paraguariensis*

Resposta	Compostos	Modelo	Coeficiente Significativo dos modelos (erro)										Falta de Ajuste (F)	Significância da Regressão (F)
			Intercept	A	B	C	A ²	B ²	C ²	AB	AC	BC		
Eficiência (%EE)	5-CQA	Mean	41,18 (2,27)										9,57 (NS)	9,31 (S)
	3-CQA	Mean	48,71 (2,29)										8,26 (NS)	
	4-CQA	Mean	45,93 (2,42)										7,24 (NS)	
	3,4-DQA	Linear	84,78 (0,57)		1,60 (0,64)	2,77 (0,64)							3,86 (NS)	4,22 (S)
	3,5-DQA	Mean	96,64 (0,64)										186,19 (S)	
	4,5-DQA	Linear	92,89 (0,42)			-1,54 (0,47)							3,66 (NS)	
	Sum CQA	Mean	45,98 (2,32)										8,19 (NS)	
	Sum DQA	Mean	93,58 (0,40)										8,53 (NS)	
	Total	Mean	69,99 (1,15)										6,30 (NS)	

Tabela S1: Continuação...

Resposta ⁽¹⁾	Compostos ⁽²⁾	Modelo	Coeficiente Significativo dos modelos (erro) ⁽³⁾									Falta de Ajuste (F) ⁽⁴⁾	Significância da Regressão (F) ⁽⁵⁾	
			Intercept	A	B	C	A ²	B ²	C ²	AB	AC			BC
Carregamento (%LC)	5-CQA	Mean	82,63 (1,70)										1,08 (NS)	
	3-CQA	Mean	78,25 (1,63)										0,88 (NS)	
	4-CQA	Mean	80,75 (1,60)										0,87 (NS)	
	3,4-DQA	Linear	82,45 (0,86)			-9,06 (0,96)							0,75 (NS)	30,84 (S)
	3,5-DQA	2Fl	75,82 (1,32)			-4,21 (1,47)			-5,03 (1,92)				1,16 (NS)	3,73 (S)
	4,5-DQA	Mean	82,43 (1,67)										1,00 (NS)	
	Sum CQA	Mean	80,05 (1,64)										0,92 (NS)	
	Sum DQA	2Fl	79,68 (1,17)			-3,97 (1,31)			-4,50 (1,71)				0,59 (NS)	3,81 (S)
	Total	Mean	79,91 (1,55)										0,96 (NS)	
Estabilidade térmica (°C)		Mean	204,54 (6,17)									2,31 (NS)		
Tamanho de partícula (µm)		Mean	3,83 (0,16)									0,36 (NS)		

(1) EE: Eficiência de encapsulamento (EE), C: Capacidade de Carregamento (LC); (2) 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico, 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico, 4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico, 3,4-DQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-DQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-DQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico. (3) A: Fluxo de alimentação (mL/h), B: Temperatura de atomização e C: % Extrato (v/v) na solução polimérica; ⁽⁴⁾ NS quando o $F_{\text{crítico}}$ foi menor que o F_{cal} ; ⁽⁵⁾ (S) quando o $F_{\text{crítico}}$ foi maior que o F_{cal}

Tabela S2: Percentual de ingredientes das formulações dos bolos controle, com adição do extrato de coproduto de *Ilex paraguariensis* encapsulado e extrato de coproduto de *Ilex Paraguariensis* não encapsulado

Descrição	Formulação	Extrato (mL)	Concentração IPCE (%)	Ingredientes (g)						
				Água	Farinha	Açúcar	Sal	Ovo	Margarina	Fermento
Controle	F 0	-	-	40	100	90	1	41	11	5,2
	F 1	-	0,5	40	99,5	90	1	41	11	5,2
IPCE encapsulado	F 2	-	0,81	40	99,2	90	1	41	11	5,2
	F 3	-	1,12	40	96,9	90	1	41	11	5,2
	F 4	-	1,43	40	98,6	90	1	41	11	5,2
	F 5	-	1,75	40	98,3	90	1	41	11	5,2
	F 6	6	-	34	100	90	1	41	11	5,2
	F 7	10	-	30	100	90	1	41	11	5,2
IPCE não encapsulado	F 8	13	-	27	100	90	1	41	11	5,2
	F 9	17	-	23	100	90	1	41	11	5,2
	F 10	21	-	19	100	90	1	41	11	5,2

Tabela S3: Ácidos clorogênicos presentes em bolo com extrato do coproduto de *Ilex paraguariensis* (IPC) livre e IPCE em diferentes concentrações.

Descrição	Formulação	Extrato de IPC (mL)	Concentração de IPCE (%)	Compostos (mg 100 g ⁻¹)							
				5-CQA	3-CQA	4-CQA	3,4-DQA	3,5-DQA	4,5-DQA	Soma CQA	Soma DQA
Quantidade adicionada em 100 g de bolo assado (mg)	Bolo com extrato de IPC livre	6	-	1,3	2,2	1,2	0,3	1,7	2,1	4,8	4,1
		10	-	2,1	3,4	1,9	0,4	2,6	3,3	7,4	6,4
		13	-	2,6	4,4	2,5	0,5	3,3	4,3	9,5	8,1
		17	-	3,6	5,9	3,3	0,7	4,5	5,7	12,8	11,0
		21	-	4,1	6,9	3,9	0,8	5,3	6,7	14,8	12,9
	Bolo com IPCE	-	0,5	1,0	2,2	0,6	0,2	1,6	2,0	3,8	3,8
		-	0,81	1,6	3,6	0,9	0,4	2,6	3,2	6,1	6,2
		-	1,12	2,2	5,0	1,3	0,5	3,6	4,4	8,4	8,6
		-	1,43	2,8	6,3	1,6	0,7	4,6	5,7	10,7	10,9
		-	1,75	3,4	7,7	2,0	0,9	5,6	6,9	13,1	13,4
Quantidade presente após o forneamento em 100 g de bolo assado (mg)	Bolo com extrato de IPC livre	6	-	0,6	1,8	0,5	0,6	0,6	1,1	2,9	2,3
		10	-	1,2	3,6	1,0	1,2	1,1	2,2	5,8	4,5
		13	-	1,6	4,1	1,2	1,3	1,5	2,6	6,8	5,5
		17	-	2,0	5,5	1,6	1,6	2,2	3,6	9,1	7,3
		21	-	2,4	7,5	2,1	2,1	3,0	4,8	12,0	9,9
	Bolo com IPCE	-	0,5	0,7	2,3	0,6	0,8	0,7	1,4	3,6	2,9
		-	0,81	1,3	3,5	1,0	1,3	1,2	2,3	5,9	4,9
		-	1,12	2,3	6,1	1,7	2,1	2,4	3,4	10,1	7,9
		-	1,43	2,7	6,8	2,0	2,5	2,8	4,2	11,5	9,5
		-	1,75	3,3	8,7	2,6	3,2	3,8	5,2	14,6	12,2

5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico; 3-CQA: ácido 3-cafeoilquínico; 4-CQA: ácido 4-cafeoilquínico; 3,4-DQA: ácido 3,4-dicafeoilquínico; 3,5-DQA: ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-DQA: ácido 4,5-dicafeoilquínico

7 Considerações Finais

O processo descrito, envolvendo extração seguida do encapsulamento por antissolvente, é promissor para a obtenção de partículas ricas em ácidos clorogênicos e pode ser empregado em vários produtos. Mediante a otimização da obtenção de um extrato, foi possível alcançar uma condição ótima de extração capaz de extrair 10,16 g de ácidos clorogênicos, resultando em um extrato eficiente para ser empregado em um método de encapsulamento.

O aumento da estabilidade térmica é uma resposta muito interessante para a etapa posterior de aplicação dessas partículas nos alimentos, representando uma vantagem para utilização em processos que necessitem de tratamento térmico durante seu preparo.

O processo de encapsulamento por spray-drying resultou em cápsulas com 75,2% de eficiência e uma estabilidade maior do que o extrato não encapsulado. Ao ser aplicado em bolos, o encapsulado preservou os ácidos em 94% após o forneamento. O processo de otimização do extrato encapsulado encoraja a utilização do CIP em produtos submetidos ao processo de forneamento, sendo viável a aplicação em bolos e até mesmo em outros produtos, tornando o alimento mais funcional.

Este estudo apresenta a extração dos ácidos clorogênicos do coproduto de *Ilex paraguariensis*, seu encapsulamento e apresenta aplicação, onde foi obtida a estabilidade térmica dos ácidos clorogênicos, o que gera perspectivas para futuras aplicações benéficas à saúde humana. Além dos métodos serem simples e rápidos, o emprego do coproduto prospecta o uso de uma matriz negligenciada até o momento para agregar renda a pequenos agricultores da América do Sul e gerar produtos funcionais.

Referências Bibliográficas

Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., & Costa, G. (2008). Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. **Annals of Applied Biology**, 153(1), 11–23. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00234.x>

CLIFFORD, M. N. et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.

COELHO, S. C. et al. A New Approach to the Production of Zein Microstructures with Vitamin B12 , by Electrospinning and Spray Drying Techniques. v. 392, p. 47–57, 2021.

CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Release of Yerba Mate Antioxidants from Corn Starch-Alginate Capsules as Affected by Structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 150–157, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.026>>.

DELADINO, L.; NAVARRO, A. S.; MARTINO, M. N. Carrier Systems for Yerba Mate Extract (*Ilex Paraguariensis*) to Enrich Instant Soups. Release Mechanisms under Different PH Conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 163–169, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.030>>.

DILLENBURG, A. et al. LWT - Food Science and Technology Optimization of Frying Oil Composition Rich in Essential Fatty Acids by Mixture Design. v. 84, 2017.

ELHAM, S.; KALAJAHI, M.; GHANDIHA, S. Optimization of Spray Drying Parameters for Encapsulation of Nettle (*Urtica Dioica* L .) Extract. **LWT**, v. 158, p. 113149, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113149>>.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Encapsulation of Bioactive Peptides by Spray-Drying and Electrospinning. 2023.

FENOGLIO, D. et al. Active Food Additive Based on Encapsulated Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) Extract: Effect of Drying Methods on the Oxidative

Stability of a Real Food Matrix (Mayonnaise). **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 4, p. 1574–1584, 2021.

FRANCIS, S. S. et al. Optimization of the Encapsulation Process of Cupuassu (*Theobroma Grandiflorum*) Pulp by Spray Drying as an Alternative for the Valorization of Amazonian Fruits. v. 184, n. June, 2023.

HUANG, X.; LI, T.; LI, S. Encapsulation of Vitexin-Rhamnoside Based on Zein/Pectin Nanoparticles Improved Its Stability and Bioavailability. **Current Research in Food Science**, v. 6, n. September 2022, p. 100419, 2023.

JIE, J. et al. Zein as a Water Insoluble Excipient for Spray Dry Encapsulation of Hydrophilic Bioactives. **Journal of Food Engineering**, v. 283, n. March, p. 110054, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110054>>.

KALTBACH, P. et al. Mate (*Ilex Paraguariensis*) Tea Preparations : Understanding the Extraction of Volatile and Non-Volatile Compounds upon Variations of the Traditional Consecutive Infusions. **Food Chemistry**, v. 374, n. August 2021, p. 131756, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131756>>.

KAMALI, L. et al. Trends in Food Science & Technology Use of Encapsulation Technology to Enrich and Fortify Bakery , Pasta , and Cereal-Based Products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, n. PA, p. 688–710, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.029>>.

KIM, S. Y. et al. Anti-Obesity Effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

KURECK, I. et al. Chemical Characterization and Release of Polyphenols from Pecan Nut Shell [*Carya Illinoensis* (Wangenh) C . Koch] in Zein Microparticles for Bioactive Applications. 2018.

LIU, F. et al. A Comparative Study of Covalent and Non-Covalent Interactions between Zein and Polyphenols in Ethanol-Water Solution. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 625–634, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.041>>.

LIU, Q. et al. Fabrication of Curcumin-Loaded Zein Nanoparticles Stabilized by Sodium Caseinate / Sodium Alginate : Curcumin Solubility , Thermal Properties , Rheology , and Stability. **Process Biochemistry**, v. 94, n. March, p. 30–38, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.017>>.

LOBO, R. R. et al. Inclusion of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) Extract in the Diet of Growing Lambs: Effects on Blood Parameters, Animal Performance, and Carcass Traits. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2020.

LOPES, D. R.; SANTOS, L. O.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Antioxidant and Antibacterial Activity of a Beverage Obtained by Fermentation of Yerba-Maté (*Ilex Paraguariensis*) with Symbiotic Kombucha Culture. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, p. 0–2, 2021.

LÓPEZ-CÓRDOBA, A. et al. Yerba Mate Antioxidant Powders Obtained by Co-Crystallization : Stability during Storage. v. 124, p. 158–165, 2014.

LORINI, A. et al. Multivariate Optimization Results in an Edible Extract from *Ilex Paraguariensis* Unexplored Residues with a High Amount of Phenolic Compounds. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 0, n. 0, p. 1–16, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2021.2020530>>.

MAHMOUDI, L. et al. Ultrasonication and Encapsulation of Butcher Broom (*Ruscus Hyrcanus* L.) Extract and Its Bioactive Effects on Qualitative Properties, Oxidative Stability and Shelf Life of Cake. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, n. July, p. 100295, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100295>>.

MERCADO, D. F. et al. Yerba Mate Applications: Magnetic Response of Powders and Colloids of Iron Oxide Nanoparticles Coated with *Ilex Paraguariensis* Derivatives. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 462, p. 13–21, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.04.048>>.

NIU, B. et al. Food Chemistry : X Co-Encapsulation of Chlorogenic Acid and Cinnamaldehyde Essential Oil in Pickering Emulsion Stablized by Chitosan

Nanoparticles. **Food Chemistry: X**, v. 14, n. February, p. 100312, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100312>>.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulation of Freeze Concentrated *Ilex Paraguariensis* Extract by Spray Drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60–68, 2015.

OIKONOMOPOULOU, V. et al. Optimization of Encapsulation of Stevia Glycosides through Electrospraying and Spray Drying. **Food Hydrocolloids**, v. 131, n. January, p. 107854, 2022.

PAMUNUWA, G. K. et al. Effect of Liposomal Encapsulation of Curcumin and α -Tocopherol on Sensory and Physicochemical Properties, and Retention of Antioxidant Capacity of Fortified Cookies during Baking. **Food Chemistry Advances**, v. 3, n. October, p. 100504, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100504>>.

PILATTI-RICCIO, D. et al. Impact of the Use of Saccharides in the Encapsulation of *Ilex Paraguariensis* Extract. **Food Research International**, v. 125, 2019.

PO, E. et al. Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) as a Novel Feed Supplement for Growing Lambs. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2–3, p. 131–136, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.05.016>>.

PRADO MARTIN, J. G. et al. Actividad Antimicrobiana de La Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.) Contra Patógenos Alimentarios. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p. 93–98, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70006-3)>.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein : The Industrial Protein from Corn. v. 13, p. 171–192, 2001.

STREIT, N. M. et al. Relation among Taste-Related Compounds (Phenolics and Caffeine) and Sensory Profile of Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 560–564, 2007.

TCHABO, W. et al. Process Analysis of Mulberry (*Morus Alba*) Leaf Extract Encapsulation: Effects of Spray Drying Conditions on Bioactive Encapsulated

Powder Quality. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 1, p. 122–146, 2019.

WANG, Y. et al. Micro-Encapsulation and Stabilization of DHA Containing Fish Oil in Protein-Based Emulsion through Mono-Disperse Droplet Spray Dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 74–84, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.12.007>>.

YUAN, Y. et al. Trends in Food Science & Technology Surface Coating of Zein Nanoparticles to Improve the Application of Bioactive Compounds : A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, n. November 2021, p. 1–15, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.025>>.

ZHANG, Q. et al. Nanostructures of Protein-Polysaccharide Complexes or Conjugates for Encapsulation of Bioactive Compounds. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, n. January, p. 169–196, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.026>>.

Pagliosa, C. M., de Simas, K. N., Amboni, R. D. M. C., Murakami, A. N. N., Petkowicz, C. L. O., Medeiros, J. d. D., ... Amante, E. R. (2010). Characterization of the bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Industrial Crops and Products**, 32(3), 428–433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.010>

Kringel, D.H.; da Silva, W.M.F.; Biduski, B.; Waller, S.B.; Lim, L.T.; Dias, A.R.G.; Zavareze, E.D.R. Free and encapsulated orange essential oil into a β -cyclodextrin inclusion complex and zein to delay fungal spoilage in cakes. **J. Food Process. Preserv.** 2020, 44, e14411.

Yoneyama, F., Fukao, M., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2008). Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14. **Journal of Applied Microbiology**, 105(6), 1982–1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03958.x>.