

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TECNOLÓGICA DA FRAÇÃO
SAPONOSÍDICA DOS FRUTOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.:
potencialidade como adjuvante espumógeno

GIZELE SCOTTI DO CANTO

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E TECNOLÓGICA DA FRAÇÃO
SAPONOSÍDICA DOS FRUTOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.:
potencialidade como adjuvante espumógeno

Tese apresentada por **Gizele Scotti do**
Canto para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de maio de 2007, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Adriana Raffin Pohlmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marco Antônio Segatto Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Margareth Linde Athayde
Universidade Federal de Santa Maria

CATÁLOGO NA PUBLICAÇÃO

C232a Canto, Gizele Scotti do

Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno / Gizele Scotti do Canto – Porto Alegre : UFRGS, 2007. - xxix , 231 p. : il., tab., gráf.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Ilex paraguariensis*: frutos. 2. Erva-mate. 3. Saponinas. 4. Adjuvante espumógeno. 5. Irritação cutânea. I. González Ortega, George. II. Título.

CDU: 615.4:547.9

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Ao meu pai Airton (*in memoriam*),
grande incentivador da carreira universitária.**

**À minha mãe Eloisa, pelo exemplo profissional,
moral e ético na profissão farmacêutica.**

**À minha filha Débora,
pelo amor.**

O Farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz se estenda sobre a terra.

Eclesiástico, 38:5

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sobretudo.

Ao meu pai, pela presença de amor.

À minha Família pelo apoio emocional, carinho e incentivo constantes, em especial à minha mãe, pela imensa ajuda, colaboração, amparo e estímulo em todos os momentos. À minha filha Débora, pelo amor e força demonstrados durante estes anos. À Dinda e Bisa pelo incentivo, apoio e carinho, à minha irmã Thaís pelo apoio, exemplo profissional e desprendimento em colaborar sempre, ao Roberto, Rogério, meus irmãos, Samira, Luciane e Rubens, cunhados, ao meu sobrinho Guilherme pela torcida e incentivo, e à Odete pela amizade, carinho e cuidados com a Débora nestes anos.

Ao Prof. Dr. George González Ortega pela orientação, amizade e grande contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick e Prof. Dr. Paulo Mayorga, pela amizade e apoio.

À Barão Comércio e Indústria de Erva-mate Ltda., na pessoa do Sr. Etelvino Picolo, pela imensa gentileza no fornecimento dos frutos e pela valorização da pesquisa.

À profa. Dra. Fátima do Laboratório de análises do solo da Faculdade de Agronomia desta Universidade, pelo empréstimo do Tensiômetro e pela disponibilidade na assessoria das análises.

Ao Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos da Universidade Federal de Santa Maria, em nome do Prof. Dr. Sérgio Dalmora, pela contribuição e Coordenação do ensaio biológico, e à veterinária Silvana Vaccari e ao técnico João Luiz Rizzi pela colaboração e disponibilidade na execução do ensaio.

À Prof. Dra. Nády P. da Silveira do Instituto de Química desta Universidade, pela imensa colaboração e orientação nas análises de espalhamento de luz dinâmico, e à bolsista Yasmin, pela colaboração e responsabilidade na realização das análises.

Ao Engenheiro Nelson Yang pela gentileza em contribuir na elaboração do projeto do equipamento para análise bidimensional da espuma.

Ao Laboratório de Tecnologia de Materiais (LTM) desta Universidade, em nome da Prof. Dra. Solange, pela realização das análises do potencial zeta.

À Prof. Dra. Silvia Guterres, do Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia desta Faculdade, pela possibilidade da realização das análises do potencial zeta, e à bolsista Alessandra pela boa vontade na realização das análises.

Aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), em especial à Ana Paula, Bárbara, Cabral, Camila, Cleverson, Francilene, Greice, Giovana, Gustavo Borré, Gustavo Petrovick, Juliana, Lísias, Maria Paula, Maribete, Olívia, Rafael, Roberta, Simone, Tiago Sausen e Vinícius, por todas as demonstraçoess de carinho e amizade, pela boa vontade em colaborar no que fosse preciso e pelas manifestações de apoio e incentivo.

Às bolsistas Paula Guzatto, Samanta Yang e Janine Treter, pela imensa colaboração na realização dos experimentos e pelo convívio de carinho e amizade.

Ao Gustavo Borré e Vinícius Bicca, pelo desprendimento em colaborar nas análises.

À Angélica Couto e Renata Longhini, mais do que colegas, amigas superpoderosas.

À Lauren e Bebel pelos momentos de amizade e apoio emocional.

Á Rosângela, Nereida, Sílvia e Isa pela grande amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Gilberto, Maria Terezinha e Roger pelo carinho e amizade.

E a todos àqueles que através de uma palavra ou de um gesto, expressaram o seu carinho e incentivo nestes anos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTADE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiv
LISTA DE ANEXOS	xxviii
RESUMO	xxix
ABSTRACT	xxxix
INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA	2
OBJETIVOS	4
Capítulo 1. Saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	6
1.1. Introdução	7
1.2. Fundamentação Teórica	8
1.2.1 Gênero <i>Ilex</i> : ocorrência, distribuição e aspectos fito-econômicos.....	8
1.2.1.1. <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	9
1.2.1.1.1. Aspectos agronômicos e Botânicos.....	9
1.2.1.1.2. Aspectos Fitoquímicos.....	10
1.2.1.1.2.1. Saponinas.....	11
1.2.1.1.2.1.1. Saponinas das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	11
1.2.1.1.2.1.2. Saponinas dos frutos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	16
1.2.1.1.3. Aspectos Farmacológicos e Toxicológicos	19
1.3. Referências	21
Capítulo 2. Caracterização por CLAE das saponinas dos frutos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	26
2.1. Introdução	27
2.2. Fundamentação Teórica	28
2.3. Material e Métodos	28
2.3.1. Material	28
2.3.1.1. Reagentes e Solventes	28
2.3.1.2. Substâncias de referência	29
2.3.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais diversos	29
2.3.2. Métodos	29

2.3.2.1. Obtenção do perfil cromatográfico por CLAE das saponinas do extrato bruto	29
2.3.2.1.1. Preparação da amostra	30
2.3.2.1.2. Preparação da fase móvel	30
2.3.2.1.3. Descrição do método cromatográfico	30
2.4. Resultados e Discussão	31
2.4.1. Perfil cromatográfico por CLAE das saponinas isoladas de <i>Ilex paraguariensis</i>	31
2.4.2. Perfil cromatográfico por CLAE do ácido clorogênico e rutina	33
2.4.3. Perfil cromatográfico por CLAE do extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i>	35
2.5. Referências	37
Capítulo 3. Processo de obtenção, caracterização e purificação do extrato bruto dos frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	39
3.1. Introdução	40
3.2. Fundamentação Teórica	40
3.3. Material e Métodos	43
3.3.1. Matéria-prima vegetal	43
3.3.1.1. Secagem e moagem da matéria-prima vegetal	43
3.3.2. Reagentes e Substâncias de referência	43
3.3.3. Aparelhos e equipamentos	44
3.3.4. Métodos	44
3.3.4.1. Caracterização da matéria-prima vegetal	44
3.3.4.1.1. Determinação da perda por dessecação	44
3.3.4.1.2. Determinação do teor de extrativos	45
3.3.4.1.3. Análise granulométrica	45
3.3.4.1.4. Análise cromatográfica por cromatografia em camada delgada	46
3.3.4.2. Obtenção do extrato bruto	46
3.3.4.2.1. Seleção do líquido extrator	46
3.3.4.2.1.1. Determinação do volume de espuma	47
3.3.4.2.2. Preparação do extrato bruto	47
3.3.4.2.3. Caracterização do extrato bruto	48

3.3.4.2.3.1. Determinação do resíduo seco	48
3.3.4.2.3.2. Determinação do pH	48
3.3.4.2.3.3. Determinação de densidade	48
3.3.4.2.3.4. Análise cromatográfica das saponinas	49
3.3.4.2.3.4.1. Perfil cromatográfico por CCD	49
3.3.4.2.3.4.2. Perfil cromatográfico por CLAE	49
3.3.4.3. Obtenção do extrato liofilizado	49
3.3.4.3.1. Caracterização do extrato bruto liofilizado	49
3.3.4.3.1.1. Determinação da perda por dessecação	49
3.3.4.3.1.2. Determinação do pH	49
3.3.4.3.1.3. Perfil cromatográfico do extrato bruto liofilizado	50
3.3.4.4. Processos de purificação do extrato bruto liofilizado	50
3.3.4.4.1. Método I (fracionamento)	50
3.3.4.4.1.1. Preparação da amostra	50
3.3.4.4.1.2. Preparação dos eluentes	50
3.3.4.4.1.3. Obtenção das frações purificadas	51
3.3.4.4.2. Método II	52
3.3.4.4.2.1. Preparação da amostra	52
3.3.4.4.2.2. Obtenção do extrato purificado (P6)	52
3.3.4.4.3. Avaliação do rendimento dos produtos purificados pelos Métodos I e II.	53
3.3.4.4.4. Avaliação por CLAE da presença de polifenóis nas frações purificadas e P6.....	53
3.3.4.4.5. Avaliação por espectrofotometria no UV-VIS do extrato bruto quanto a presença de polifenóis	53
3.4. Resultados e Discussão	54
3.4.1. Caracterização da matéria-prima vegetal	54
3.4.2. Preparação do extrato bruto	56

3.4.2.1. Caracterização do extrato bruto	58
3.4.2.2. Caracterização do extrato bruto liofilizado	58
3.4.3. Perfil cromatográfico por CCD da matéria-prima, EXB e EXL	59
3.4.4. Perfil cromatográfico por CCD das frações purificadas e do extrato P6	61
3.4.5. Rendimento das frações e do extrato P6	63
3.4.6. Análise comparativa por CLAE do extrato bruto liofilizado, frações purificadas e do extrato P6	64
3.4.7. Caracterização por espectrofotometria no UV-VIS do extrato bruto e produtos purificados	69
3.4.8. Análise por CLAE dos compostos polifenólicos presentes nas frações purificadas e no extrato P6	70
3.5. Referências	75
Capítulo 4. Caracterização das propriedades físico-químicas e avaliação da atividade espumógena das saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	78
4.1. Introdução	79
4.2. Fundamentação Teórica	81
4.3. Material e Métodos	100
4.3.1. Material	100
4.3.1.1. Reagentes e substâncias de referência	100
4.3.1.2. Equipamentos e aparelhos	101
4.3.2. Métodos	101
4.3.2.1. Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)	101
4.3.2.2. Avaliação da atividade espumógena das saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i>	103
4.3.2.2.1. Caracterização do perfil espumógeno.....	103
4.3.2.2.1.1. Determinação do grau de espumabilidade	103
4.3.2.2.1.2. Caracterização do perfil de drenagem da espuma	104
4.3.2.2.1.3. Determinação do volume de drenagem da espuma em função do tempo	104
4.3.2.2.1.3.1. Determinação do volume de líquido retido na espuma em função do tempo	105
4.3.2.3. Avaliação da estabilidade da espuma.....	105
4.3.2.4. Avaliação da resistência da espuma	106
4.3.2.5. Análise bidimensional da espuma	106

4.3.2.6. Determinação da viscosidade das soluções tensoativas	108
4.3.2.7. Avaliação da influência de eletrólitos sobre o comportamento espumógeno das saponinas	108
4.3.2.8. Obtenção do diâmetro efetivo das micelas de saponinas.....	109
4.3.2.9. Determinação do potencial zeta das soluções de saponinas.....	111
4.4. Resultados e Discussão	112
4.4.1. Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) das soluções tensoativas	112
4.4.2. Caracterização do perfil espumógeno das saponinas dos frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i>	118
4.4.2.1. Determinação do perfil de drenagem da espuma das saponinas	118
4.4.2.2. Determinação do grau de espumabilidade das saponinas	120
4.4.2.3. Avaliação da estabilidade da espuma das saponinas	123
4.4.2.3.1. Determinação da altura da coluna de espuma em função do tempo.....	123
4.4.3. Avaliação do efeito de eletrólitos no perfil espumógeno das saponinas.....	130
4.4.3.1. Determinação do pH das soluções de eletrólitos à força iônica de 0,024M.....	130
4.4.3.2. Determinação do pH das soluções tensoativas na presença de eletrólitos.....	130
4.4.3.3. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre a drenagem e espumabilidade das soluções de saponinas	131
4.4.3.3.1. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre o perfil de drenagem das espumas das saponinas	132
4.4.3.3.2. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre a espumabilidade das saponinas	134
4.4.3.4. O efeito dos eletrólitos sobre a estabilidade da espuma das saponinas	135
4.4.3.5. Determinação do potencial zeta das soluções da Fr.7090	138
4.4.3.6. Avaliação da resistência da espuma	139
4.4.3.7. Determinação da viscosidade	142
4.4.3.8. Avaliação da influência dos eletrólitos sobre o tamanho das micelas das saponinas.....	143
4.4.3.9. Avaliação bidimensional da espuma	152
4.4.3.9.1. Resultados da caracterização da espuma das saponinas por análise bidimensional	152
4.5. Referências	157
Capítulo 5. Avaliação do potencial de irritação cutânea das saponinas dos frutos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.	162

5.1. Introdução	163
5.2. Fundamentação Teórica	163
5.3. Material e Métodos	165
5.3.1. Material.....	165
5.3.1.1. Substâncias e reagentes.....	165
5.3.1.2. Equipamentos e materiais diversos	166
5.3.1.3. Animais de laboratório	166
5.3.2. Métodos	166
5.3.2.1 Avaliação do grau de irritação primária dérmica	166
5.3.2.1.1. Preparo da amostra	166
5.3.2.1.2. Descrição do método	166
5.3.2.1.3. Avaliação das reações da pele	167
5.3.2.1.4. Determinação do Índice de irritação primária dérmica	168
5.4. Resultados e Discussão	169
5.4.1. Determinação do grau de irritação cutâneas das soluções tensoativas	169
5.5. Referências	177
Conclusões Finais	179
Anexos	182
Biografia	195
Pareceres	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Saponinas das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	13
Tabela 2.	Sistema de eluição gradiente por CLAE da fase móvel em função do tempo.....	30
Tabela 3.	Resultados dos ensaios de caracterização da matéria-prima Vegetal	54
Tabela 4.	Análises físico-químicas dos extratos brutos obtidos com diferentes solventes.....	56
Tabela 5.	Resultado dos ensaios de caracterização do extrato bruto.....	58
Tabela 6.	Resultados dos ensaios de caracterização do extrato bruto liofilizado	59
Tabela 7.	Resultado do rendimento ponderal das frações purificadas (Método I) e do extrato P6 (Método II) em relação ao EXL	63
Tabela 8.	Absorvância em 325 nm para o EXL, Fr. 50, Fr. 70, Fr. 90 P6.....	69
Tabela 9.	Parâmetros da regressão linear das isotermas de tensão superficial das soluções tensoativas	115
Tabela 10.	Valores da CMC, concentração de excesso (Γ) e de superfície molecular (A) das soluções tensoativas.....	115
Tabela 11.	Espumabilidade das soluções de EXL, Fr.7090, extrato P6, LSS e Poli.80 na concentração de 10 CMC.....	121
Tabela 12.	Valores do pH das soluções de eletrólitos à força iônica de 0,024 M.....	135
Tabela 13.	Valores do pH das soluções tensoativas na presença de eletrólitos ($I = 0,024$ M) na concentração de 10 CMC.....	130
Tabela 14.	Efeito dos eletrólitos ($I = 0,024$ M) sobre a drenagem das soluções de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli.80 na concentração de 10 CMC no tempo zero e após 60 minutos	132

Tabela 15.	Efeito dos eletrólitos ($I = 0,024 \text{ M}$) sobre a espumabilidade das soluções de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli.80 na concentração de 10 CMC	134
Tabela 16.	Efeito dos eletrólitos sobre a estabilidade das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli.80 em 60 minutos.....	135
Tabela 17.	Valores do potencial zeta das soluções da Fr.7090 sob a influência de eletrólitos na força iônica de 0,024 M.....	139
Tabela 18.	Velocidade de queda da esfera na espuma das soluções de EXB, Fr.7090, LSS e Poli.80 à 10 CMC sob a força iônica de 0,024 M.....	140
Tabela 19.	Velocidade de queda da esfera na espuma das soluções de EXB, Fr.7090, LSS e Poli.80 em 25 CMC.....	141
Tabela 20.	Viscosidade das soluções tensoativas em viscosímetro capilar de Ostwald.....	142
Tabela 21.	Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para as soluções de EXB e Fr. 7090 e na influência de diferentes eletrólitos.....	143
Tabela 22.	Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para a Fr. 7090 à diferentes valores de CMC a 21 °C.....	146
Tabela 23.	Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para a Fr. 50 na concentração de 10 CMC a 21 °C.	147
Tabela 24.	Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para as soluções de LSS e Poli.80 concentração de 10 CMC a 21 °C...	148
Tabela 25.	Parâmetros da análise bidimensional das soluções de EXB, LSS e Poli. 80 à concentração de 1,0%.....	154
Tabela 26.	Número de arestas das bolhas em função do tempo para as soluções de EXB, LSS e Poli.80 a 1,0%.....	154
Tabela 27.	Classificação do grau de eritema e formação de crosta do ensaio de irritação primária dérmica de Draize.....	167
Tabela 28.	Classificação do grau de formação de edema para avaliação do grau de irritação primária dérmica de Draize.....	168

Tabela 29.	Índice de irritação primária para o teste de irritação primária dérmica de Draize	168
Tabela 30.	Grau de eritema e formação de crosta, para a solução de LSS 1,0%.....	169
Tabela 31.	Grau de formação edema para a solução de LSS a 1,0%.....	169
Tabela 32.	Grau de eritema e formação de crosta, para a solução de EXL 1,0%.....	170
Tabela 33.	Grau de formação edema para a solução de EXL a 1,0%.....	170
Tabela 34.	Grau de eritema e formação de crosta da solução da Fr. 70 a 1,0%.....	171
Tabela 35.	Grau de formação de edema para a solução da Fr. 70 a 1,0%.....	171
Tabela 36.	Grau de eritema e formação de crosta da solução de extrato P6 1,0 %.....	172
Tabela 37.	Grau de formação de edema para a solução de extrato P6 a 1,0%.....	172
Tabela 38.	Índices de irritação primária dérmica para as soluções de LSS, EXL, Fr. 70 e P6 a 1,0%.....	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.....	10
Figura 2.	Agliconas das saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i>	12
Figura 3.	Estrutura da matessaponina-5	14
Figura 4.	Estrutura química dos ácidos ursólico, acetóxiursólico e 23-hidroxiursólico	16
Figura 5.	Estrutura do glicosídeo matesídeo	17
Figura 6.	Estrutura do glicosídeo I-Ziyu	18
Figura 7.	Estrutura do Ilexosídeo II	18
Figura 8.	Cromatograma da matessaponina-1.....	31
Figura 9.	Cromatograma da matessaponina-3.....	32
Figura 10.	Cromatograma da matessaponina-5.....	32
Figura 11.	Cromatograma da matessaponina J _{3/4}	33
Figura 12.	Cromatograma do ácido clorogênico.....	34
Figura 13.	Cromatograma da rutina	34
Figura 14.	Perfil cromatográfico do EXL	35
Figura 15.	Curvas cumulativas de retenção e de passagem da matéria - prima vegetal constituída por frutos imaturos secos e moídos de <i>I. paraguariensis</i>	55
Figura 16.	Perfil cromatográfico por CCD dos extratos brutos de <i>Ilex paraguariensis</i> em diferentes sistemas solvente.....	57
Figura 17.	Cromatograma por CCD da matéria-prima vegetal (MP), extrato bruto (EXB) e extrato bruto liofilizado (EXL), em sistema CHCl ₃ :EtOH:H ₂ O (70:40:5 v/v/v).....	60
Figura 18.	Cromatograma por CCD da MP, EXB e G ₁ , em sistema CHCl ₃ :EtOH:H ₂ O (50:40:5 v/v/v).....	60

Figura 19.	Cromatograma por CCD da MP, EXB e EXL, em sistema $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:40:5 v/v/v).....	61
Figura 20.	Cromatogramas por CCD das frações purificadas pelo método I e II em sistema eluente $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (40:40:5 v/v/v)	62
Figura 21.	Cromatograma por CIAE do extrato bruto liofilizado. Detecção em 205 nm.	64
Figura 22.	Cromatograma por CIAE da fração água. Detecção em 205 nm	65
Figura 23.	Cromatograma por CIAE da fração 30. Detecção em 205 nm.....	66
Figura 24.	Cromatograma por CIAE da fração 50. Detecção em 205 nm.....	66
Figura 25.	Cromatograma por CIAE da fração 70. Detecção em 205 nm.....	67
Figura 26.	Cromatograma por CIAE da fração 90. Detecção em 205 nm	67
Figura 27.	Cromatograma por CIAE do extrato P6. Detecção em 205 nm	68
Figura 28.	Espectro de absorção UV-VIS do EXL, Fr.50, Fr.70, Fr.90 e P6.....	70
Figura 29.	Cromatograma por CLAE do EXL. Detecção em 340 nm	71
Figura 30.	Cromatograma por CLAE da Fr. Água. Detecção em 340 nm	71
Figura 31.	Cromatograma por CLAE da Fr. 30. Detecção em 340 nm	71
Figura 32.	Cromatograma por CLAE da Fr. 50. Detecção em 340 nm	72
Figura 33.	Cromatograma por CLAE da Fr. 70. Detecção em 340 nm	72

Figura 34.	Cromatograma por CLAE da Fr. 90. Detecção em 340 nm	72
Figura 35.	Cromatograma por CLAE do extrato P6 Detecção em 340 nm	73
Figura 36.	Comparação visual dos produtos purificados obtidos pelos métodos I e II	74
Figura 37.	Modelo da micela esférica de dodecilsulfato de sódio	89
Figura 38.	Ilustração bidimensional das bordas de Plateau	93
Figura 39.	Filme vertical líquido com superfícies móveis	94
Figura 40.	Filmes pretos comum (FPC) e Filmes pretos de Newton (FPN)	95
Figura 41.	Projeção da agregação de lâminas curvas	97
Figura 42.	Visualização por tomografia óptica do processo de afinamento dos filmes líquidos de uma espuma	99
Figura 43.	Esquema do aparelho para a caracterização espumógena	104
Figura 44.	Representação bidimensional de uma espuma ideal	107
Figura 45.	Isoterma de abaixamento da tensão superficial do LSS a 20 °C	112
Figura 46.	Isoterma de abaixamento da tensão superficial do Poli.80 a 20 °C	113
Figura 47.	Isoterma de abaixamento da tensão superficial do EXL a 20 °C	113
Figura 48.	Isoterma de abaixamento da tensão superficial da Fr. 7090 a 20 °C.....	114
Figura 49.	Isoterma de abaixamento da tensão superficial do extrato P6 a 20 °C	114
Figura 50.	Perfil de drenagem das soluções de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli.80.....	119
Figura 51.	Perfil de estabilidade da espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80 (10 CMC) em 60 minutos.....	124

Figura 52.	Perfil de estabilidade da espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80 (10 CMC) em 480 minutos.....	125
Figura 53.	Características da espuma de EXL no tempo zero e em 7 horas da Fr.7090.....	127
Figura 54.	Características da espuma de Poli.80 no tempo zero e em 7 horas ..	128
Figura 55.	Características da espuma de LSS no tempo zero e em 7 horas	128
Figura 56.	Perfil de drenagem da espuma da Fr.7090 (10 CMC) sob a influência de eletrólitos	133
Figura 57.	Perfil de estabilidade da espuma da Fr.7090 (10 CMC) sob a influência de eletrólitos à força iônica de 0,024 M.....	137
Figura 58.	Imagem bidimensional da espuma de LSS à 1,0% nos tempos: zero, 20, 90, 240, 290 e 300 segundos.....	152
Figura 59.	Imagem bidimensional da espuma do EXL à 1,0% nos tempos zero,10, 20, 30, 60 e 70 segundos.....	153
Figura 60.	Aspecto das peles íntegra e escarificada após 72 horas da aplicação das soluções tensoativas de LSS, EXL, Fr. 70 e extrato P6.....	173

LISTA DE ANEXOS

A1 – Distribuição granulométrica ponderal da matéria-prima vegetal, frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i>	184
A2 – Valores de abaixamento da tensão superficial em função da concentração de LSS	185
A3 - Valores de abaixamento da tensão superficial em função da concentração de Poli. 80	186
A4 - Valores de abaixamento da tensão superficial em função da concentração de Extrato bruto	186
A5 - Valores de abaixamento da tensão superficial em função da concentração da Fr. 7090	187
A6 – Perfil de drenagem da solução de Polissorbato 80 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos	188
A7 - Perfil de drenagem da solução de laurilsulfato de sódio (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos	190
A8 - Perfil de drenagem da solução de Extrato bruto liofilizado (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos	192
A9 - Perfil de drenagem da solução da Fr. 7090 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos	193

RESUMO

As saponinas são tensoativos naturais, caracterizadas principalmente por sua atividade espumógena. *Ilex paraguariensis* A. St. Hil, conhecida como “erva-mate”, é uma espécie vegetal rica em saponinas e de importância econômica e cultural para este Estado. Estudos anteriores demonstraram que os frutos imaturos de *I. paraguariensis*, uma parte do vegetal sem valor comercial, apresenta teores mais elevados de saponinas que as folhas da erva-mate. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade das saponinas dos frutos imaturos de *I. paraguariensis* como adjuvante espumógeno, sob o ponto de vista físico-químico e tecnológico, bem como a avaliação do potencial de irritação dérmica. Para isso, foram empregados um extrato bruto liofilizado (**EXL**) obtido por turbólise na proporção de 1:10 droga-solvente em etanol:água (40:60 v/v) como líquido extrator e dois produtos purificados ricos em saponinas, denominados **Fr.7090** e **P6**, obtidos por um processo de fracionamento em fase sólida e eluição com metanol-água (método I) e por um processo de complexação com polímero polivinílico por contato direto (método II), respectivamente. Para a caracterização do perfil das saponinas e monitoramento de processos, foi desenvolvida uma metodologia analítica por CLAE em fase reversa C₁₈, em sistema gradiente acetonitrila: ácido fosfórico 0,5 % com detecção em 205 nm. A atividade de superfície das saponinas foi avaliada através do abaixamento da tensão superficial, CMC, excesso de superfície e área superficial. Os perfis de espumabilidade e estabilidade da espuma das saponinas do EXL e da Fr. 7090 foram avaliados através de medidas da espumabilidade, drenagem, tempo de permanência da espuma e resistência. Como tensoativos de comparação foram utilizados o laurilsulfato de sódio (**LSS**) e polissorbato 80 (**Poli. 80**), empregados nas mesmas condições e concentrações que as soluções de saponinas. A influência de eletrólitos sobre os perfis espumógenos foi avaliado utilizando NaCl, KBr, KNO₃, MgCl₂ e Na₂HPO₄, mantendo a força iônica constante em 0,024 M. Para a análise das propriedades espumógenas das saponinas, a espuma foi gerada em coluna de vidro por insuflação de ar durante 20 segundos, mantendo um fluxo de 2 L min⁻¹. O perfil de drenagem das espumas das saponinas na concentração de 10 CMC foi avaliado e expresso como percentual de volume de líquido retido na espuma (VLE %), no tempo zero e ao longo de 60 minutos. A

estabilidade da espuma das saponinas de Fr.7090 e P6 foi avaliada considerando a altura da coluna de espuma em função do tempo e pelo registro e análise fotográficos da espuma até 480 minutos. Para avaliar a influência do tamanho micelar sobre as propriedades espumógenas dos tensoativos, o diâmetro efetivo das micelas foi determinado por medidas de espalhamento de luz dinâmica. Dados adicionais sobre a sua estabilidade foram obtidos mediante a análise fotográfica bidimensional, em câmara geradora de espuma projetada para esta finalidade. A resistência da espuma foi caracterizada mediante a velocidade de queda de uma esfera através da coluna de espuma, sob condições experimentais padronizadas. A Fr. 7090 apresentou um elevado grau de espumabilidade semelhante ao LSS e superior ao Poli. 80. Quanto ao perfil de drenagem, as saponinas apresentaram um valor de VLE % em 60 minutos (T_{1h}) de 12,0 % e 15,2 %, para o EXL e Fr. 7090, respectivamente, em relação a 7,15 % para ambos tensoativos sintéticos. As saponinas apresentaram um perfil de estabilidade diferenciado, com maior estabilização estrutural com o tempo. As espumas das saponinas apresentaram uma resistência superior aos tensoativos sintéticos, porém, somente a 25 CMC. A adição de eletrólitos às soluções de saponinas influenciou negativamente os perfis espumógeno e de estabilidade da espuma das saponinas. As análises por espalhamento da luz sugerem micelas de dimensões maiores em relação aos tensoativos não-iônicos ou a possível formação de estruturas supramicelares, mesmo baixas concentrações. Pela análise bidimensional, a espuma do EXL apresentou menor alteração da forma e número das bolhas de ar com o tempo, comparado à espuma de LSS. O potencial de irritação dérmica das saponinas foi avaliado pelo teste de irritação primária dérmica de Draize *in vivo*, em coelhos machos albinos. A avaliação biológica classificou as saponinas como produtos não-irritantes. Pelos resultados, concluiu-se que as saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* apresentam um potencial emprego tecnológico, tanto pelas suas propriedades espumógenas, como pela ausência de irritação cutânea.

Palavras-Chave: Saponinas, frutos, *Ilex paraguariensis*, propriedades de interface, espuma, tensão superficial, eletrólitos, micelas, irritação cutânea.

ABSTRACT

Physico-Chemical and Technological avaluation of the saponins of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. fruits: potential adjuvant foaming.

Saponins are natural surfactants, characterized mainly for its foaming properties. *Ilex paraguariensis* A. St. Hil, known as “erva-mate”, is a rich vegetal specie in saponins and of economic and cultural importance for this State. Previous studies had demonstrated that the immature fruits of *I. paraguariensis*, one has left of the vegetable without commercial value, presents higher concentrations of saponins that the leaves of “erva-mate”. The objective of this work was to evaluate the saponins potentiality of the immature fruits of *I. paraguariensis* as adjuvant foaming, under the technological and physical-chemical point of view, as well as the evaluation of the cutaneous irritation potential. For this, it had been used a rude extract (EXL) obtained by tubo-extraction using ethanol 40% (v/v) as extractor liquid and two rich purified products in saponins obtained by a process in solid phase and elution with methanol-water (method I) and a complexation process with polyvinyl polymer (method II), respectively. For the characterization of saponins profile was developed an analytical methodology using HPLC in C₁₈ reversed phase, with a system gradient composed by acetonitrile:phosphoric acid 0,5 % with detection in 205 nm. The surface activity of saponins was evaluated through the lower of the superficial tension, CMC, surface density and superficial area. Foambility and stability profiles of the saponins foam of the EXL and Fr. 7090 had been evaluated through foamability mensuraments, draining, permanence time of the foam and resistance of the films. As surfactants of comparison it had been used sodium dodecylsulphate (LSS) and polyssorbate 80 (Poli. 80). These had been analyzed in the same conditions and concentrations of saponins solutions. The electrolytes influence on the foaming profiles was evaluated using NaCl, KBr, KNO₃, MgCl₂ and Na₂HPO₄, keeping the constant ionic strenght in 0,024 M. For the analysis of the foams properties of the saponins, the foam was generated in glass column by air insufflation during 20 seconds, with a constant flow of 2 L min⁻¹. The draining profile of the saponins foams in the concentration of 10 CMC was

evaluated and expressed as percentile of volume of restrained liquid in the foam (VLE %), in time zero and throughout 60 minutes. The stability of the saponins foam of Fr.7090 and P6 was evaluated considering the height of the foam column in function of the time and for the photographic register and analysis of the foam till 480 minutes. To evaluate the influence of the micellar size on the foaming properties of the surfactants, the effective diameter of micelles was determined by dynamic light scattering mensuraments. Additional data on its stability had been obtained by means of the bidimensional photographic analysis, in generating foam chamber projected for this purpose. The resistance of the foam was characterized by means of the speed of a sphere fall through the foam column, under standardized experimental conditions. Fr. 7090 presented one high degree of similar foambility to the LSS and superior to Poli. 80. As much as to the draining profile, the saponins had presented a value of VLE % in 60 minutes (T1h) of 12,0 % and 15,2 %, for the EXL and Fr. 7090, respectively, in relation to 7,15 % for both synthetic surfactants. The saponins showed a differentiated profile of stability, with bigger structural stabilization with the time. The saponins foams had presented a superior resistance to the synthetic surfactants, however, only 25 CMC. The addition of electrolytes had a negative influence on saponins foams profile and stability. The analyses for dynamic light scattering suggest bigger dimensions micelles in relation to the nonionic surfactants or the possible formation of highest micelles, even at low concentrations. To the bidimensional analysis, the EXL foam presented minor alteration of the form and number of the air bubbles with the time, compared with the LSS foam. The potential of the cutaneous irritation of the saponins was evaluated by the test of dermic primary irritation of the Draize test in albinic male rabbits. The biological evaluation classified the saponins as not-irritating products. For the results, it was concluded that the saponins of *I. paraguariensis* immature fruits presented a technological potential use, as for its foaming properties as for the absence of cutaneous irritation.

Keywords: *Ilex paraguariensis*, saponins, fruits, interface properties, foam, superficial tension, electrolytes, micelles, cutaneous irritation.

INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

As saponinas constituem uma das mais importantes classes de metabólitos secundários produzidos pelas plantas superiores, notificadas em aproximadamente 100 famílias botânicas. Ocorrem em grandes quantidades (até 30%) em tecidos vegetais e, em menor proporção, em alguns animais marinhos (HOSTETTMAN e MARSTON, 1995; OLESZEK, 2002).

Devido o seu caráter anfifílico, as saponinas são conhecidas como tensoativos naturais, sendo utilizadas pelas suas propriedades emulsificantes, espumógenas e detergentes em diversos setores industriais, como o têxtil, farmacêutico, alimentício, cosmético e na produção de bebidas (TANAKA *et al.*, 1996; MITRA e DUNGAN, 1997; KAUFFMANN, 2002). Além destas propriedades, as saponinas apresentam várias atividades biológicas relacionadas tanto às suas características de atividade superficial (LEONARD *et al.*, 2003), como pela capacidade de formarem complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos das membranas celulares (HOSTETTMAN e MARSTON, 1995; CHAVALI E CAMPBELL, 1987; CHAVALI *et al.*, 1987; CLELAND *et al.*, 1996; MARCIANI *et al.*, 2000; KAUFFMANN, 2002; SPARG *et al.*, 2004). As saponinas e os polifenóis são considerados por alguns autores como os responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos observados na medicina tradicional chinesa (SPARG *et al.*, 2004).

As principais fontes de saponinas para a indústria são as raízes de diferentes espécies europeias de *Gypsophilla spp* e cascas do tronco de *Quillaja saponaria* Molina, espécie sul-americana encontrada no Chile, Peru e Bolívia. O emprego das saponinas da quilaia em alimentos como emulsionante e, em bebidas como espumante, é regulamentado nos Estados Unidos, Europa e Japão (KAUFFMANN, 2002).

Apesar do seu uso difundido, as propriedades físico-químicas e coloidais das saponinas, ainda têm sido pouco caracterizadas (MITRA e DUNGAN, 1997).

Para a utilização em nível industrial, é essencial, no entanto, que a matéria-prima vegetal seja disponível em quantidade suficiente, e que o conteúdo em saponinas seja elevado e, para o emprego em alimentos e cosméticos, a planta deve ter

uma longa história de uso humano e a sua segurança deve estar oficialmente comprovada (TANAKA, *et al.*,1996).

Neste contexto, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., popularmente conhecida como erva-mate, é uma espécie vegetal rica em saponinas, abundante em nosso Estado e de grande importância econômica e cultural, principalmente para o sul do Brasil e países vizinhos (ATHAYDE, 1993; CAMPOS, 1996).

A investigação das saponinas da erva-mate tem sido objeto de vários estudos de identificação, isolamento e elucidação estrutural, principalmente referente às saponinas encontradas nas folhas (GNOATTO, 2002). Até o momento, somente as folhas e ramos de *I. paraguariensis* são utilizados nos produtos a base de “erva-mate”. Parte de suas potencialidades reflete-se nas duas patentes registradas para os extratos secos (*resinas*) obtidos das folhas de *Ilex aquifolium* L. ou *Ilex paraguariensis* e do seu emprego para o tratamento da pele e cabelos (US6210660; US5958395).

Neste sentido, devido à importância do cultivo da erva-mate em nosso Estado, é de vital importância investigar o potencial emprego de outras partes do vegetal.

A investigação da presença de saponinas em outros órgãos e da comprovação de teores elevados de saponinas nos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000), levou a estudos posteriores sobre o isolamento e identificação destas saponinas (TAKETA, 2001), bem como ao desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos direcionados à obtenção de frações purificadas das saponinas presentes nos frutos imaturos, incluindo métodos de separação e purificação (PAVEI, 2004).

É neste contexto que se insere o objetivo de estudar sob o ponto de vista físico-químico e tecnológico a fração saponosídica dos frutos imaturos de *I. paraguariensis*, um material de refugo industrial, com alto teor de saponinas, cujas potencialidades de aplicação tecnológica vêm sendo objeto de estudo neste Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas e tecnológicas das saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, visando explorar a sua potencialidade como adjuvante espumógeno.

Objetivos Específicos:

- 1) Identificar e caracterizar a matéria-prima vegetal através de métodos cromatográficos analíticos qualitativos como CCD e CLAE;
- 2) Estabelecer condições de extração pelo processo de turboextração, a partir de misturas hidroalcoólicas de diferente graduação;
- 3) Desenvolver uma metodologia por CLAE para a caracterização das saponinas, segundo as características dos produtos a serem analisados;
- 4) Caracterizar a atividade superficial das saponinas, através da tensão superficial, concentração micelar crítica, densidade de superfície e área molecular;
- 5) Avaliar a capacidade espumógena das saponinas e comparar frente a tensoativos sintéticos através da determinação do volume de espuma gerado sob condições padronizadas;
- 6) Avaliar a estabilidade das espumas das saponinas através da determinação dos perfis de drenagem e de permanência da espuma em função do tempo;
- 7) Avaliar a resistência da espuma;
- 8) Avaliar o efeito de eletrólitos sobre as propriedades espumógenas e de estabilidade das espumas das saponinas;
- 9) Avaliar através de análises de espalhamento de luz dinâmico, a influência do tamanho micelar sobre as propriedades espumógenas das saponinas
- 10) Avaliar a evolução da estrutura da espuma através de análise bidimensional;
- 11) Avaliar o grau de irritação primária dérmica *in vivo* do extrato bruto e produtos purificados.

Capítulo 1

Saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

1.1. INTRODUÇÃO

As saponinas são glicosídeos de elevada massa molecular (600 a 2000 Da). De acordo com a estrutura da aglicona (genina ou sapogenina) são classificadas em saponinas triterpênicas, as quais apresentam um núcleo triterpênico pentacíclico composto por 30 átomos de carbono ou em saponinas esteroidais, compostas por um núcleo esteroidal de 27 átomos de carbono. As saponinas esteroidais, no entanto, não são tão largamente distribuídas na natureza como as do tipo triterpênico (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; OLESZEK e BIALY, 2006).

Ambas agliconas podem apresentar diferentes substituintes (-H, -COOH, -CH₃), e os açúcares podem estar ligados à sapogenina por um ou dois sítios de glicosilação, o que originou a classificação em saponinas monodesmosídicas e bidesmosídicas, respectivamente, sendo raras as saponinas tridesmosídicas. As porções glicosídicas podem ser lineares ou ramificadas, com cadeias contendo normalmente de 2 a 5 unidades monossacarídicas. Os açúcares mais comuns encontrados nas saponinas são hexoses (glicose, galactose), 6-deoxihexoses (ramnose), pentoses (arabinose, xilose), ácidos urônicos (ácido glicurônico) ou aminoaçúcares (glicosamina) (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; HE, 2000; SCHENKEL, *et al.*, 2003; SPARG *et al.*, 2004).

O número de constituintes e as diferentes possibilidades da composição da cadeia de açúcar e sua ligação, originam uma grande diversidade natural de estruturas e, mesmo dentro de uma mesma espécie, diferentes partes do vegetal podem conter saponinas com diferentes estruturas (SCHENKEL *et al.*, 2003; OLESZEK e BIALY, 2006).

O estudo das saponinas de *Ilex paraguariensis* foi iniciado neste Programa de Pós-Graduação pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e colaboradores. Assim, GOSMANN em 1989 isolou e identificou os primeiros compostos glicosilados nas folhas de *Ilex paraguariensis*, seguida por MONTANHA, em 1990, que além do isolamento e da identificação de outros glicosídeos triterpênicos, iniciou a avaliação biológica destes compostos. A seguir, a análise fitoquímica e farmacológica, bem como o desenvolvimento de metodologias analíticas de quantificação e processos de

purificação, deram continuidade aos estudos com *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (ATHAYDE, 1993; KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000; GNOATO, 2002; COELHO, 2002; TAKETA, 2001; PAVEI, 2004).

A investigação de outras espécies do Rio Grande do Sul do gênero *Ilex*, como *I. dumosa* Reissek, *I. brevicuspis*, *I. integerrima*, *I. microdonta*, *I. pseudoboxus*, *I. taubertiana*, e *I. theezans* foram paralelamente realizadas aos estudos com *Ilex paraguariensis*, vindo a contribuir para um maior conhecimento químico, taxonômico e farmacológico das espécies deste Gênero. Devido às características estruturais entre as espécies estudadas, as saponinas constituem, por excelência, marcadores quimiotaxonômicos deste Gênero (TAKETA e SCHENKEL, 1994; HEIZMANN e SCHENKEL, 1995; TAKETA e SCHENKEL, 1995; TAKETA *et al.*, 2000; ATHAYDE, 2000, LENCINA, 2004).

1.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1. Gênero *Ilex*: ocorrência, distribuição e aspectos fitoeconômicos

O gênero *Ilex* pertence à família Aquifoliaceae, possuindo cerca de 500 espécies já identificadas. São árvores de médio a grande porte, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo o maior número de espécies encontrado na região tropical da Ásia e da América (GIBERTI, 1979; GORLZACZANY *et al.*, 2001).

Na América, o Brasil conta com o maior número de representantes, sendo relatadas 68 espécies para este gênero (GIBERTI, 1995), onde a mais importante das espécies para a América do Sul, sob o ponto de vista social, econômico e cultural, é *Ilex paraguariensis* A. St. Hil, conhecida popularmente como “erva-mate”. Sua área de distribuição nativa está concentrada nas regiões subtropicais e temperadas do sul da América Latina e do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), incluindo Mato Grosso do Sul, sudoeste de São Paulo e oeste do Paraguai (GORLZACZANY, 2001). O cultivo para fins comerciais ocorre, também, na Argentina, Uruguai e Paraguai (TAKETA, 2001).

Para *I. paraguariensis* são reconhecidas, atualmente, três variedades botânicas: variedade *paraguariensis*, *sincorensis* Loes e *vestita* Loes (GIBERTI, 1995).

Entre as espécies de *Ilex*, *I. brevicuspis* Reissek e *I. theezans* Mart. crescem no mesmo hábitat de *I. paraguariensis*, sendo *I. argentina* Lillo, nativa do noroeste da Argentina. Estas três espécies são usadas como substituintes ou adulterantes da erva-mate (GORZALCZANY *et al.*, 2001).

1.2.1.1. *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

1.2.1.1.1. Aspectos agronômicos e botânicos

Ilex paraguariensis é popularmente conhecida como erva-mate, mate, chá-mate, mate-legítimo e mate-verdadeiro, entre outras denominações (GOSMANN, 1989; ATHAYDE, 1993; CAMPOS, 1996). É uma árvore ou arbusto perene com até 15 metros de altura, folhas com margens irregulares serreado-crenadas alternadas e simples, subcoriáceas até coriáceas de 5 a 8 cm de comprimento com 3 a 4 cm de largura. Apresentam inflorescências geralmente fasciculadas e axilares nas folhas. As flores são tetrâmeras, brancas, estando freqüentemente as masculinas e femininas na mesma inflorescência. O período de floração vai de setembro a dezembro e o período de frutificação ocorre de dezembro a março. O fruto (Figura1) é esférico, carnoso, na forma de baga-drupa preta quando seco, com um diâmetro médio de 5 mm e pode ser verde, vermelho ou vinho, dependendo do seu estágio de maturação (GIBERTI, 1979).

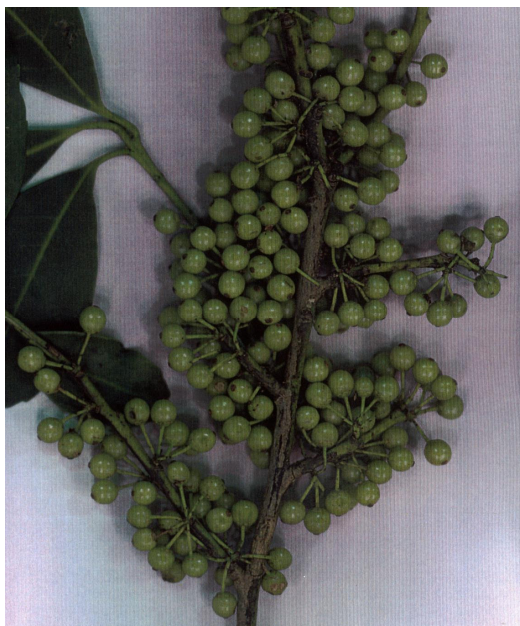


Figura 1. Frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

1.2.1.1.2. Aspectos fitoquímicos

A maioria dos estudos com *I. paraguariensis* está relacionada à análise da composição química das folhas, destacando-se a presença de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), flavonóides (rutina, quercetina e isoquercitrina), taninos, ácido clorogênico, neoclorogênico e isoclorogênico, saponinas, metabólitos primários, como as vitaminas A, B₁, B₂ e C, ácido nicotínico, carotenos, colina, trigonelina, açúcares, ácidos graxos normais do butírico ao esteárico e aproximadamente 250 constituintes voláteis, com altos níveis de 2-butoxietanol e linalol, o que caracteriza o aroma da erva-mate (KRAEMER, 1997).

Da análise dos teores de metilxantinas nas folhas de *I. paraguariensis*, constatou-se que os teores de cafeína e teobromina são significativamente maiores em *I. paraguariensis* do que em outras espécies riograndenses desse gênero (SCHENKEL *et al.*, 1996; TAKETA, 1997; ATHAYDE, 2000), e entre as variedades, a *paraguariensis* apresentou um maior teor de cafeína (1,4% nas folhas jovens e 0,16% nas velhas), quantidades pouco expressivas de teobromina, não sendo detectada a presença de teofilina (MAZZAFERA, 1994; GNOATTO, 2002). Quanto a variação anual do teor das metilxantinas, SCHUBERT (2003), detectou para a cafeína e

teobromina um aumento da concentração destas na primavera e no verão, e um decréscimo no período do outono e inverno.

O primeiro relato quanto à composição química dos frutos de *I. paraguariensis*, foi relacionado à presença de metilxantinas por MARAVALHAS (1965), e complementado por MAZZAFERA (1994), o qual detectou pequenas concentrações de metilxantinas, estando, a cafeína, presente em todas as etapas de maturação dos frutos. A teobromina apenas nos frutos maduros e a teofilina não sendo detectada.

Entre os compostos polifenólicos presentes nas folhas de *I. paraguariensis*, estão os flavonóides quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercitrina), canferol-3-O-glicosídeo, canferol-3-O-rutinosídeo e quercetina livre, juntamente com os ácidos clorogênico, neoclorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e isoclorogênico, sendo, este, uma mistura dos ácidos 4,5-3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico (KRAEMER, 1997).

Na investigação da presença de flavonóides, foi encontrado para *I. paraguariensis*, um maior teor de flavonóides e derivados polifenólicos em relação às outras oito espécies sul Americanas do gênero *Ilex* avaliadas (FILIP *et al.*, 2001)

Nos frutos, SANTAMOUR (1973) identificou as antocianinas cianidina-3-xilosilglicosídeo e cianidina-3-glicosídeo.

1.2.1.1.2.1. Saponinas

1.2.1.1.2.1.1. Saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*

GOSMANN (1989) relatou teores de saponinas de 5 a 10% do peso seco das folhas de *I. paraguariensis*. A elucidação estrutural dessas saponinas foi estabelecida por GOSMANN e SCHENKEL (1989), MONTANHA (1990), GOSMANN *et al.* (1995), KRAEMER *et al.* (1996) e SCHENKEL *et al.* (1997), sendo, atualmente descritos 13 glicosídeos triterpênicos com a parte osídica composta de glicose, ramnose e arabinose (Tabela 1).

As saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis* apresentam exclusivamente agliconas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (Figura 2), o que permite diferenciá-las das saponinas das folhas das demais espécies sul-americanas do gênero *Ilex*, as quais são predominantemente derivadas do ácido 19 α -hidroxi-ursólico (SCHENKEL *et al.*, 1997).

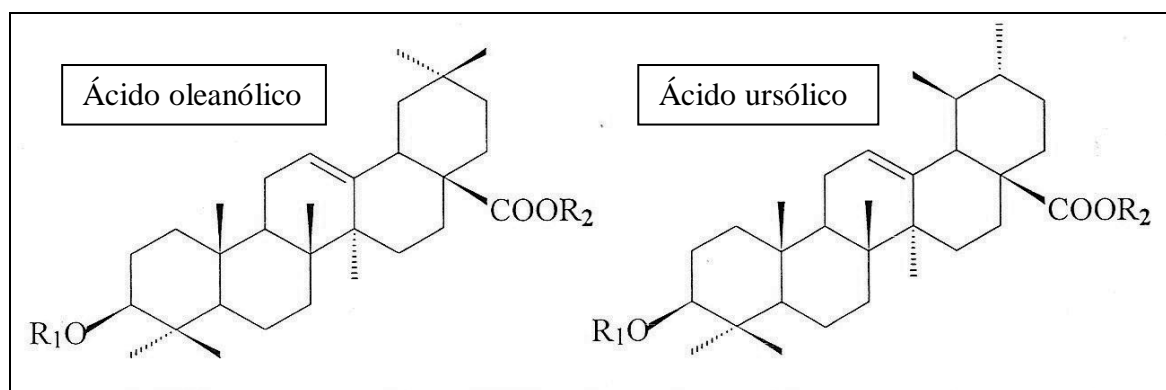


Figura 2. Agliconas das saponinas de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997).

As saponinas identificadas nas folhas de *I. paraguariensis*, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (GNOATTO, 2002)

Saponina	R1 (C ₃)	R2 (C ₂₈)
Matessaponina 1	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila
Matessaponina 2	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila
Matessaponina 3	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila
Matessaponina 4	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila
Matessaponina 5	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glicopiranosila-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosila
Guaiacina B	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila
Nudicaucina C	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila
J1a	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosila	H
J1b	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosila	H
J2a	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosila	H
J2b	β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosila	H
J3a	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila
J3b	α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosila	β -D-glicopiranosila

Observação: As matessaponinas 1-4 e as saponinas J com extensão **b** são derivadas do ácido ursólico; a matessaponina-5, guaiacina B, nudicaucina C e as saponinas J com extensão **a**, são derivadas do ácido oleanólico.

GOSMANN (1989) isolou e identificou os primeiros quatro glicosídeos triterpênicos nas folhas, denominados de matessaponinas-1, 2, 3, e 4. MONTANHA (1990) isolou e identificou as saponinas J1_(a/b), J2_(a/b), e J3_(a/b). Análises espectroscópicas revelaram que J₂ e J₃ são pares de glicosídeos isoméricos dos ácidos ursólico e oleanólico. J₄, uma saponina bidesmosídica foi identificada pelo mesmo método, em uma mistura com J_{3a} e J_{3b}. Posteriormente, KRAEMER (1997) isolou uma nova saponina, denominada matessaponina-5 (Figura 3), sendo esta, descrita como a saponina mais polar desta espécie, com seis unidades monossacarídicas. Esta saponina no entanto, encontra-se em concentração muito baixa nas folhas.

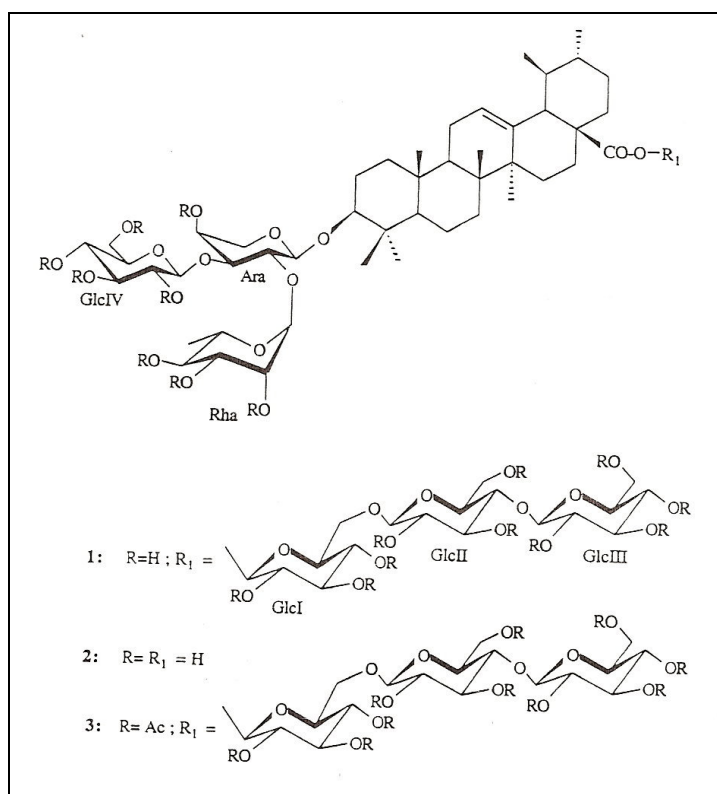


Figura 3. Estrutura da matessaponina-5 (KRAEMER, 1997).

MARTINET e colaboradores (2001) identificaram duas saponinas minoritárias, denominadas guaiacina B e nudicaucina C, as quais são formas isoméricas das matessaponinas 1 e 2, respectivamente. A diferença reside na natureza da aglicona, tendo o ácido oleanólico ao invés do ácido ursólico nas matessaponinas. Estas saponinas minoritárias são caracterizadas a partir de uma mistura dos seus principais isômeros.

Das saponinas isoladas e identificadas nas folhas de *I. paraguariensis*, somente quatro, as saponinas J_{1a}, J_{1b}, J_{2a} e J_{2b} são monodesmosídicas e ácidas, as demais são bidesmosídicas e neutras (MONTANHA, 1990; KRAEMER, 1997) o que favorece a capacidade apogênica (SCHENKEL *et al.*, 1997). A atividade hemolítica foi analisada preliminarmente por GOSMANN (1989), verificando que a fração de saponinas das folhas de *I. paraguariensis*, diferentemente de outras saponinas do gênero *Ilex*, não apresenta esta atividade.

As matessaponinas 1, 2, 3, 4 e 5 são também codificadas em alguns trabalhos pelas siglas G1, G3a, G3b, G5 e G7, respectivamente.

SCHUBERT (2003), analisou por CCD semi-quantitativa a variação anual da concentração nas folhas das saponinas G1 (matessaponina-1 e seu isômero guaiacina B) e G3 (matessaponina-2 e seu isômero nudicaucina C) em duas populações geograficamente afastadas de *I. paraguariensis*, observando uma maior concentração destas durante o inverno.

KRAEMER (1997), além das folhas, analisou por CCD, o perfil de saponinas presentes nos ramos, raízes, frutos verdes e maduros e em cultura de células de *I. paraguariensis*. Os resultados obtidos permitiram afirmar a presença destes compostos também nos frutos e raízes, enquanto que nos ramos e culturas celulares esses ocorreram em quantidades reduzidas. A presença das matessaponinas-1 e 2 foi nítida nos frutos e raízes, enquanto que traços de matessaponina-4 foram detectados somente nas raízes. De acordo com a análise cromatográfica, nos frutos verdes foram detectadas as matessaponinas-1, 2 e 3, duas saponinas acima da matessaponina 4, uma logo acima da matessaponina-1 e duas entre as matessaponinas 1 e 2/3 e a saponina J2. Nos frutos verdes portanto, além da maior concentração, observou-se também, a presença de saponinas diferentes das encontradas nas folhas.

A constatação de que os frutos verdes acumulam mais saponinas, e que os frutos maduros apresentam as mesmas saponinas, porém em menor concentração, e com o predomínio de açúcares, foi demonstrado por ATHAYDE (2000), através da análise por CCD semiquantitativa, considerando o número e intensidade das manchas.

1.2.1.1.2.1.2. Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis*

Com o objetivo de comparar os perfis das frações saponosídicas de folhas e de frutos, TAKETA (2001) analisou amostras de frutos maduros de três populações nativas do Rio Grande do Sul, Paraná e Mato Grosso do Sul. Após maceração em uma mistura de etanol: água (70:30 v/v), foram isolados e identificados seis compostos, sendo destes, duas sapogeninas e três saponinas, não detectadas nas folhas desta espécie. Entre as sapogeninas estão o ácido ursólico, o ácido 3- β -acetóxiursólico e o ácido 23-hidroxiursólico, sendo, esta, a primeira notificação de sapogenina 23-hidroxiada descrita para a espécie (Figura 4).

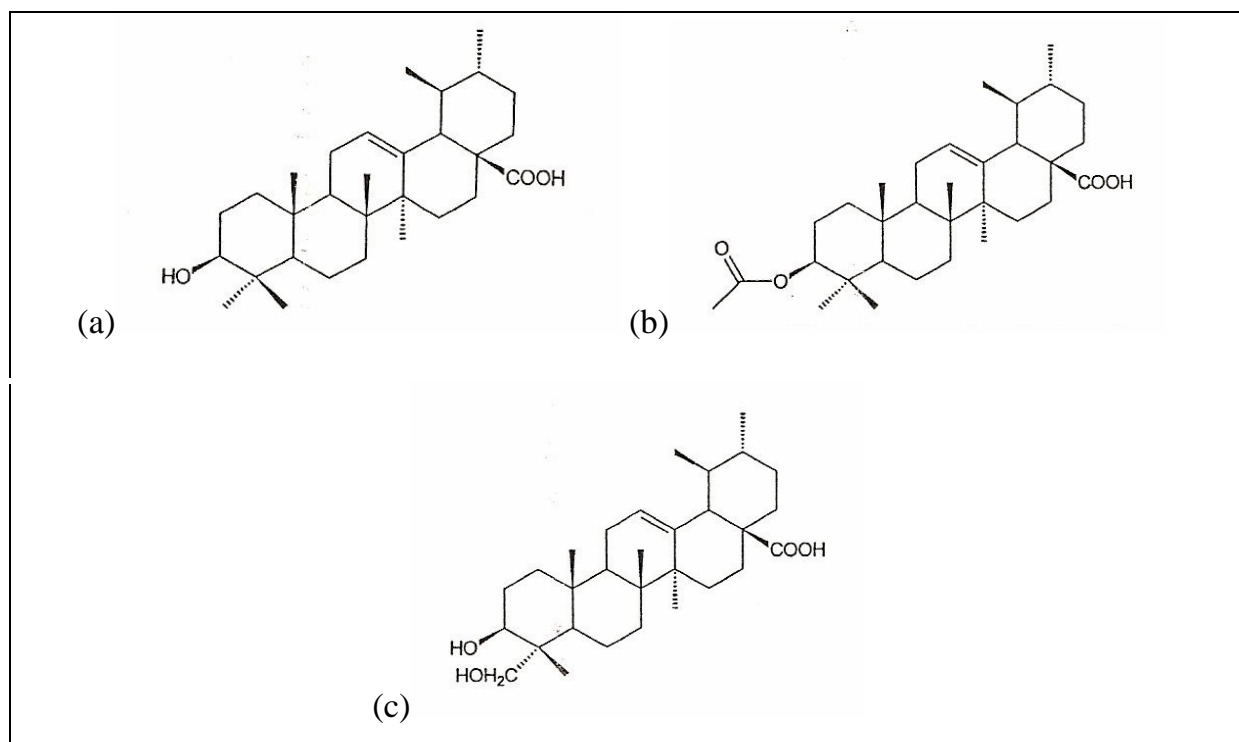


Figura 4. Estrutura química dos ácidos: (a) ursólico, (b) acetoxiursólico e (c) 23-hidroxiursólico (TAKETA, 2001).

Das saponinas isoladas e identificadas, o glicosídeo I-Ziyu e o ilexosídeo II já haviam sido relatados para outras espécies de *Ilex*, enquanto o matesídeo, foi pela primeira vez relatado para o gênero *Ilex*.

O *matesídeo* (Figura 5) é uma saponina monodesmosídica, a qual, corresponde ao 3 β -O- α -arabinopiranosil-19 α ácido 23-diidroxiursólico (C₃₅H₅₆O₉), tendo como estrutura glicosídica, a arabinose liberada através da hidrólise ácida em CCD. O valor de R_f encontrado para o matesídeo foi de 0,75 em CCD usando sílicagel em sistema clorofórmio:metanol:água (100:40:55 v/v/v), com uma reação de coloração azul-púrpura desenvolvida após nebulização de uma solução de vanilina-ácido sulfúrico e posterior aquecimento (TAKETA, 2001).

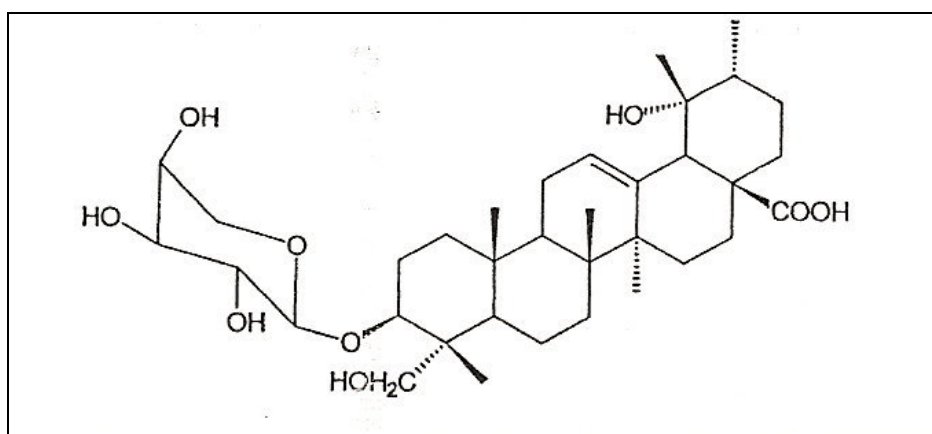


Figura 5. Estrutura do glicosídeo triterpênico matesídeo (TAKETA, 2001).

O glicosídeo *I-Ziyu* (Figura 6) é uma saponina bidesmosídica que corresponde ao 28 β -O-D-glicopiranosiléster do 3 β -O- α -L-arabinopiranosil-19 α do ácido hidroxiursólico (C₄₁H₆₆O₁₃), contendo os açúcares glicose e arabinose. Apresenta um valor de R_f de 0,4 em sistema clorofórmio:etanol:água (90:40:5 v/v/v) com o desenvolvimento de uma coloração de cor púrpura quando revelado com vanilina sulfúrica e aquecimento (TAKETA, 2001).

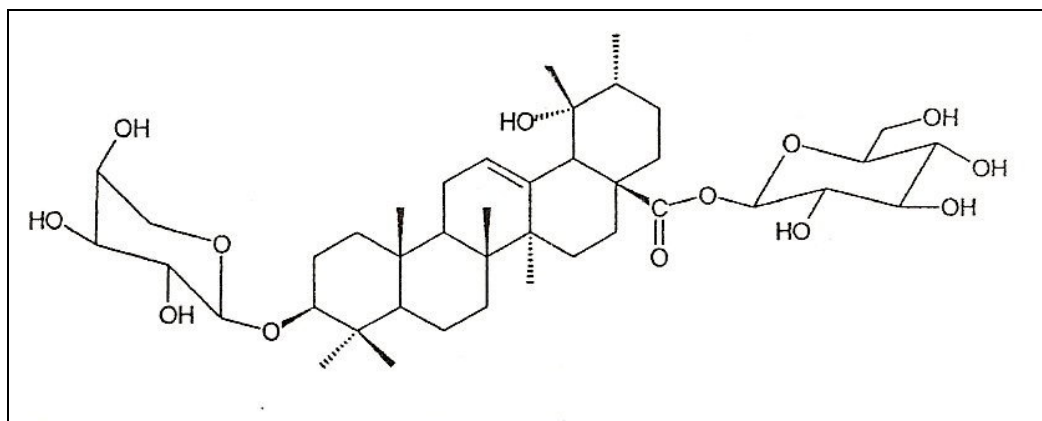


Figura 6. Estrutura do glicosídeo I-Ziyu dos frutos de *I. paraguariensis* (TAKETA, 2001).

O *ilesoxídeo II* (Figura 7) foi a saponina majoritária e de maior polaridade encontrada nos frutos de *I. paraguariensis*. Corresponde ao 28 β -O-D-glicopiranosilester do 3 β -O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil-19 α -ácido hidroxiursólico (C₄₇H₇₆O₁₈). A hidrólise ácida em CCD indicou os açúcares glicose e arabinose. Apresenta um valor de R_f de 0,5 em sistema clorofórmio:etanol:água (30:40:5 v/v/v), com uma reação de coloração púrpura, desenvolvida após nebulização com vanilina sulfúrica e aquecimento (TAKETA, 2001).

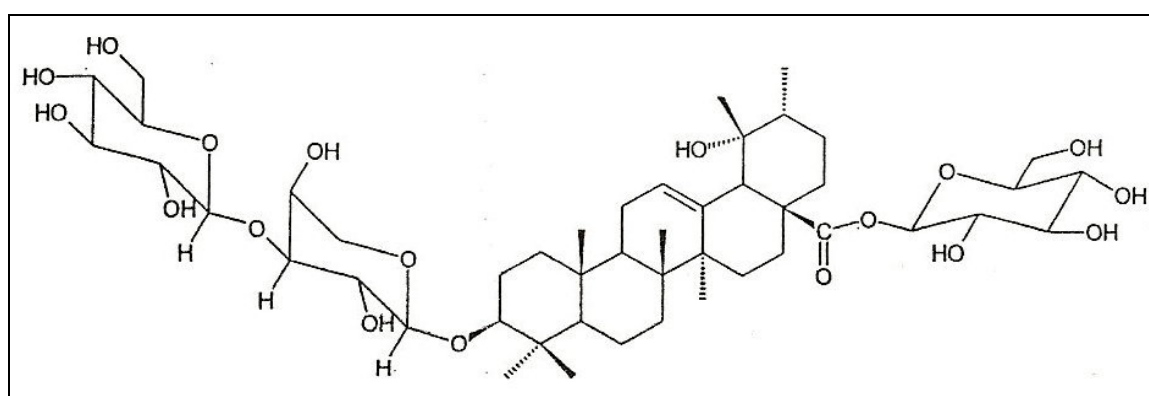


Figura 7. Estrutura do Ilexosídeo II dos frutos de *I. paraguariensis* (TAKETA, 2001)

Quanto as propriedades organolépticas da erva-mate, TAKETA e colaboradores (2004) avaliaram esta propriedade e, demonstraram que as saponinas presentes nos frutos de *Ilex paraguariensis* apresentaram um limiar de amargor inferior ao observado para as saponinas isoladas das folhas. Das saponinas isoladas dos frutos, o ilexosídeo II apresentou um limiar de amargor três vezes inferior ao obtido para a matessaponina-4, presente, apenas nas folhas.

1.2.1.1.3. Aspectos farmacológicos e toxicológicos

Estudos farmacológicos demonstraram para *I. paraguariensis* atividades antiedematogênica (MONTANHA, 1990), antioxidante *in vitro* (GUGLIUCCI e STAHL, 1995) e *in vivo* (GUGLIUCCI, 1996; SCHINELLA *et al.*, 2000), hipocolesterolêmica (FERREIRA *et al.*, 1997), colerética e de aumento da propulsão intestinal (GORZALCZANY *et al.*, 2001).

A atividade antiedematogênica *in vivo* de um extrato hidroetanólico das folhas de *I. paraguariensis* e de uma fração purificada de saponinas foi demonstrada por MONTANHA (1990). O extrato purificado administrado por via oral nas concentrações de 150 e 300 mg/kg reduziu o edema da pata de rato induzido por carragenina a partir da quarta hora, e da segunda hora, respectivamente. A atividade antiálgica também foi avaliada pela via oral para o extrato bruto (0,5g/kg) e para uma fração de saponinas purificadas (300 mg/kg), contudo, essa atividade não foi constatada para essa via. Por outro lado, a mesma fração de saponinas purificadas administrada via intra-peritoneal (300 mg) mostrou atividade antiálgica no ensaio da chapa aquecida. Os ensaios para atividade antibacteriana e antifúngica também foram realizadas frente aos microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. O extrato vegetal bruto (100 mg/ml), a fração de saponinas purificadas (100 mg/ml) e a fração de saponinas hidrolisadas (100 mg/ml) não apresentaram esta atividade.

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* para o extrato de *I. paraguariensis* foi relatada por GUGLIUCCI e STAHL (1995) demonstrada através da inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em grau

comparável à obtida com ácido ascórbico. Posteriormente, GUGLIUCHI (1996), evidenciou esta ação *in vivo*, demonstrando que as substâncias antioxidantes de *I. paraguariensis* são absorvidas e atingem concentrações plasmáticas capazes de inibir a autooxidação do LDL.

A ação antioxidante de um extrato aquoso preparado a partir de uma infusão de *I. paraguariensis*, usando sistemas de geração de radicais livres, foi avaliada por SCHINELLA e colaboradores (2000). O extrato inibiu, de forma dose-dependente, as peroxidações lipídicas enzimática e não-enzimática em microssomas do fígado de ratos.

A atividade hipocolesterolemiantes atribuída à *I. paraguariensis* foi associada ao seu conteúdo em saponinas. Existem três mecanismos propostos para esta atividade: o primeiro, foi associado à capacidade das saponinas de formarem agregados micelares capazes de solubilizarem o colesterol, evitando sua absorção (MITRA e DUNCAN, 1997). Outro mecanismo foi proposto por FERREIRA e colaboradores (1997), o qual refere-se à inibição do processo de difusão passiva do ácido cólico através da parede intestinal, simulada por membrana de acetato de celulose. Os autores sugerem um possível efeito hipocolesterolemiantes *in vivo*, promovido pelo aumento da excreção dos ácidos biliares e depleção do colesterol sistêmico, utilizado para a síntese destes compostos no fígado.

O terceiro e mais recente mecanismo se refere à complexação das saponinas com proteínas, fosfolípidos e esteróis, como o colesterol, que ocorreria nas membranas celulares da parede intestinal, reduzindo a área disponível para a absorção destas substâncias na mesma (SCHENKEL *et al.*, 2003).

GORZALCZANY e colaboradores (2001) avaliaram o efeito de decoctos de folhas de *I. paraguariensis* e de três dos seus substituintes ou adulterantes (*I. brevicuspis*, *I. theezans* e *I. argentina*) sobre o fluxo biliar e na propulsão intestinal. Os resultados demonstraram que *I. paraguariensis* e *I. brevicuspis* induziram um aumento no fluxo biliar, seguido de um aumento na propulsão intestinal. Em contraste, *I. theezans* e *I. argentina* não exerceram nenhum efeito no fluxo biliar nem na propulsão intestinal.

A atividade antimicrobiana de uma fração de saponinas isoladas das frutos de *I. paraguariensis* foi avaliada por SCHUBERT (2003), constatando nenhuma atividade frente ao grupo de microorganismos testados.

Além das atividades específicas citadas, *I. paraguariensis* também é utilizada na medicina popular, sendo empregada em preparações comerciais como medicamento natural para artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas associadas a alimentos (GORZALCZANY *et al.*, 2001).

Devido ao consumo da erva-mate estar associado, não só às suas propriedades farmacológicas, mas também ao hábito do seu consumo diário como bebida estimulante, foram realizados alguns estudos sobre a sua toxicidade. Entre estes está o de FONSECA e colaboradores (2000) os quais demonstraram atividade genotóxica para o extrato aquoso de *I. paraguariensis*, quando avaliado pelos testes de indução lisogênica em *Escherichia coli* e de indução mutagênica em *Salmonella typhimurium*. O extrato, também apresentou um aumento na frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos periféricos humanos. Este estudo sugeriu que o alto consumo de erva-mate pode potencializar a carcinogênese orofaríngea e esofágica.

Cabe destacar, também, que *I. paraguariensis* está incluída no Código Alimentar Argentino (Argentine Food Code) e na Farmacopéia Britânica de Plantas desde 1996, e está sendo analisada pela Comissão E de revisão das monografias da Farmacopéia Alemã, sendo indicada contra a fadiga física e mental (GORZALCZANY *et al.*, 2001).

1.3. REFERÊNCIAS

ATHAYDE, M. L. **Saponinas e Triterpenos em algumas espécies do gênero *Ilex***. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 184 p. Dissertação (Mestrado em Análise, Síntese e Controle de medicamentos) – Universidade do Rio Grande do Sul, 1993.

ATHAYDE, M. L. **Metilxantinas e Saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.; Triterpenos e saponinas em outras espécies do Gênero *Ilex***. Porto Alegre; UFRGS, 2000, 232 p.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C. & SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

CHAVALI, S. R.; FRANCIS, T.; CAMPBELL, J. B. An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 675-683, 1987.

CHAVALI, S. R.; FRANCIS, T.; CAMPBELL, J. B. An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 9, n. 6, p. 675-683, 1987.

CHAVALI, S. R.; CAMPBELL, J. B. Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune responses in mice. **Immunobiology**, v. 174, n. 3, p. 347-359, 1987.

CLELAND, J. L.; KENSIL, C. R.; LIM A. Isomerization and formulation stability of the vaccine adjuvant. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 1, p. 22-28, 1996.

FARMACOPÉIA Brasileira, 2ª edição, 1959

FERREIRA, A. G; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C.- **Erva mate, biologia e cultura no cone Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade (UFRGS), 1995. P. 251 - 256.

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

FONSECA, C. A; OTTO, S. S.; PAUMGARTTEN, F. J.; LEITÃO, A. C. Nontoxic, mutagenic and clastogenic activities of mate-chimarrao (*Ilex paraguariensis*). **Journal Environmental Pathol. Toxicol. Oncol.**, v. 19, p. 333-346, 2000.

GNOATTO, S. C. B. **Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e desenvolvimento de extrato seco por nebulização**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2002. Dissertação de Mestrado.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Porto Alegre: Curso de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1989. 108p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. R. Choleric effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 291-294, 2001.

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

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

HE, X-G. On line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of chromatography A**, v. 880, p. 203-232, 2000.

HEIZMANN, B. M.; SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex dumosa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1419-1422, 1995.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins – Chemistry and Pharmacology of natural Products**. Cambridge: University, 1995.

KAUFFMANN, C. **Constituição química e avaliação da atividade imunoadjuvante de *Quillaja brasiliensis***. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

KRAEMER, K. H. ***Ilex paraguariensis* St. Hil.(erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão**. Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. 163 p., 1997.

LENCINA, C. Análise química de *Ilex chamaedryfolia*. Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K; SCHUTZ, Y. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical Analysis.**, v. 12, n. 1, p. 48-52, 2001.

MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 2, p. 149-151, 1994.

MARCIANI, D. J.; PATHAK, A. K.; REYNOLDS, R. C. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded *Quillaja saponaria* Molina saponins. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 813-818, 2001.

MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar Properties of *Quillaja Saponin*. 1. Effects of temperature, Salt and pH on Solution Properties. **Journal of Agriculture and Food Chem**, v. 45, p. 1587 -1595, 1997.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e Biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A St. Hil. – Aquifoliaceae**. Curso de Pós- Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1990. Dissertação de Mestrado.

OLESZEK, W.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plants saponins – An update (2002 – 2005). **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 78-91, 2006.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2004. Dissertação de Mestrado.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P.R. (Org) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/UFSC, p.597-622, 2003.

SANTAMOUR, F. S. Anthocyanins of holly fruits. **Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 611-615, 1973.

SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DÁVILA, P. M. Antioxidant effects of na aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, p. 357-360, 2000.

SCHUBERT, A. **Variação anual de metilxantinas totais e saponinas em duas populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil.; Avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante de frações de folhas e frutos**. Santa Maria: Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia farmacêuticas. Curso de Farmácia e Bioquímica, UFSM, 2003. Dissertação de Mestrado.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.219-243, 2004.

TAKETA, A. T. C. **Phytochemical investigation on the triterpenes and triterpenoids glycosides from the fruits and leaves of South American *Ilex* species**. Bonn: Kekulé-Institute für organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, 2001. Tese de Doutorado.

TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex pseudoboxus*. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 13, n.3, p. 159-164, 1994.

TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Saponins from *Ilex tauberiana*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.76, n.1, p. 9-11, 1995.

TAKETA, A. T. C.; SCHIMITTMANN-SCHLAGER, T.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoids glycosides and a triterpene from *Ilex brevicauspis*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 901-904, 2000.

TANAKA, O.; TAMURA, Y.; MASUDA, H.; MIZUTANI, K. Application of saponins in foods and cosmetics: saponins of *Mohave yucca* and *Sapindus mukurossi*. **Saponins used in Food and Agriculture**. Ed. Walker and Yamasaki, Plenum Press, New York, 1996.

Capítulo 2

Caracterização cromatográfica por CLAE das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

2.1. INTRODUÇÃO

A separação e quantificação cromatográfica das saponinas é ainda um desafio, devido ao fato das saponinas ocorrerem como uma mistura multi-componente de compostos de polaridades muito similares na maioria das espécies de plantas, não existindo um único método recomendado como procedimento de análise de rotina para misturas complexas de saponinas (HE, 2000; OLESZEK, 2002; LEONARD *et al.*, 2003; OLESZEK e BIALY, 2006).

Entre os métodos de análise quantitativa aplicados às saponinas, a técnica por CLAE tem grande destaque devido à rapidez de análise, sensibilidade e adaptabilidade a compostos polares não-voláteis. Outra vantagem reside no fato das fases estacionária e móvel estarem disponíveis em uma ampla faixa de polaridade, de modo que a seletividade no processo de separação pode ser ajustada. Por outro lado, a detecção de compostos através de métodos espectrofotométricos na faixa do UV-visível fica limitada aos compostos com cromóforos específicos, o que no caso das saponinas é um fator crítico, uma vez que a ausência de um cromóforo que absorva em comprimentos de onda mais elevados, dificulta sua detecção no ultravioleta e permite a detecção não-específica entre 200 e 210 nm (VERPOORTE e MARASCHIN, 2001; OLESZEK, 2002; SCHENKEL *et al.*, 2003). Para superar estes problemas e desenvolver métodos analíticos validados, outros tipos de detectores têm sido testados com sucesso, como a detecção por espalhamento de luz evaporativo, para a detecção de saponinas. No entanto, este tipo de detector ainda não está em uso para rotina no controle de qualidade dos produtos vegetais contendo saponinas e a CLAE com detecção UV permanece o método de escolha, sendo a maioria dos dados publicados baseados no registro de perfis de CLAE entre 200 e 210 nm (OLESZEK e BIALY, 2006).

2.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Entre os métodos por CLAE descritos para a quantificação das saponinas das folhas de *I. paraguariensis* estão, primeiramente, aqueles propostos por KRAEMER (1997); COELHO (2002) e MARTINET (2001). Contudo, estas metodologias

apresentaram certas limitações em termos de validação. GNOATTO (2002) desenvolveu um método que mostrou linearidade e precisão, porém, propõe a quantificação das agliconas liberadas mediante hidrólise ácida, expressas em ácido ursólico e oleanólico, não sendo transponível para a quantificação dos glicosídeos saponosídicos.

Com base nestes estudos, PAVEI (2004) propôs o desenvolvimento de um método analítico por CLAE para a quantificação dos glicosídeos presentes nos frutos imaturos. O método consiste em um sistema de eluição isocrático em fase reversa. As condições cromatográficas propostas, incluem o emprego de coluna C₁₈, detecção em ultravioleta ($\lambda = 205$ nm) e fase móvel constituída de acetonitrila (bomba A) e ácido orto-fosfórico 0,15 M (bomba B), num fluxo de 0,7 ml/min. Esta metodologia se mostrou satisfatória quanto aos parâmetros analisados, porém, apenas, para os glicosídeos com características mais polares.

Em face disso, o objetivo desta etapa, foi desenvolver uma metodologia por CLAE, empregando um sistema de eluição por gradiente, com a finalidade de obter um perfil cromatográfico, que permita a caracterização dos diferentes glicosídeos triterpênicos presentes no extrato bruto e frações purificadas dos frutos imaturos de *I. paraguariensis*.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. MATERIAL

2.3.1.1. Reagentes e solventes

Acetonitrila (Ominisolv[®], Merck); ácido *orto*-fosfórico 85% (Merck); água Milli-Q[®].

2.3.1.2. Substâncias de referência

Ácido clorogênico (Sigma), rutina (Rotichrom), matessaponinas-1, 3 e 5, saponina J_{3/4} isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis*¹, extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*.

2.3.1.3. Aparelhos, equipamentos e materiais diversos

Cromatógrafo de fase líquida Shimadzu[®] composto por duas bombas de alta pressão LC-10AD, degasificador DGU-2A; injetor automático SIL-10A, unidade de controle CBM-10A, equipado com programa gerenciador CLASS LC-10 (Shimadzu[®]); coluna cromatográfica de aço inoxidável com enchimento em fase reversa Nova-Pak[®] C₁₈ (300 x 3,9 mm d.i.), diâmetro de partícula de 4 µm, 60 Å (Waters); pré-coluna com enchimento Bondapak[®] C₁₈, 125 Å (Waters); membrana hidrofílica HVLPO 4700 (0,45 µm de poro x 47 mm de diâmetro) Millipore[®] (Estados Unidos); membrana hidrofílica HVLPO 1300 (0,45 µm de poro x 13 mm de diâmetro) Millipore[®] (Estados Unidos).

2.3.2. MÉTODOS

2.3.2.1. Obtenção do perfil cromatográfico por CLAE das saponinas do extrato bruto dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*

2.3.2.1.1. Preparação da amostra

Amostras de 5 mg de cada substância de referência e do extrato bruto liofilizado (descrito no ítem 3.2.4.3 do Capítulo 3), exatamente pesadas, foram dissolvidas em 10,0 ml de uma mistura de acetonitrila:água (25:75 v/v) em balão volumétrico,

¹ Amostras de saponinas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fitoquímica desta Faculdade e pela Profa. Dra. Margareth L. Athayde (UFSM).

filtradas em membrana hidrofílica HVLP, com diâmetro de poro de 0,45 μ (Millipore[®]) e imediatamente injetadas no cromatógrafo.

2.3.2.1.2. Preparação da fase móvel

A fase móvel foi composta por duas misturas de solventes, denominadas Fases A e B. A Fase A composta por acetonitrila e ácido fosfórico 0,5%, na proporção de 10:90 v/v, e a Fase B por acetonitrila e ácido fosfórico 0,5% na proporção de 90:10 v/v. Após preparadas, as fases móveis foram filtradas em membranas Millipore[®] (0,45 μ m de poro) e desgaseificadas.

2.3.2.1.3. Descrição do método cromatográfico

As condições cromatográficas empregadas foram desenvolvidas em coluna Nova-pak[®] RP-18, adaptada a uma pré-coluna Bondapak[®] C₁₈ em sistema de eluição gradiente composto por duas Fases móveis A e B (Tabela 2). O volume de injeção da amostra foi de 20 μ l sob um fluxo de eluição de 0,7 ml min.⁻¹ com detecção em ultravioleta à 205 nm.

Tabela 2. Sistema de eluição gradiente da fase móvel em função do tempo para a caracterização por CLAE das saponinas de *Ilex paraguariensis*.

Tempo (minutos)	Acetonitrila (%) (Fase A + B)
0,01	16,4
10	22,0
30	46,0
40	34,0
50	22,0
55	16,4
60	0

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema gradiente desenvolvido parte de uma proporção de 16% de acetonitrila, chegando a um máximo de 46% em 30 minutos. Durante este tempo de corrida cromatográfica, pelo percentual de acetonitrila empregado, foi possível identificar algumas saponinas relacionadas para os frutos de *I. paraguariensis*.

2.4.1 Perfil cromatográfico por CLAE das saponinas isoladas das folhas de *Ilex paraguariensis*.

Os cromatogramas em sistema gradiente das matessaponinas-1, 3, 5 e J3/4 isoladas das folhas de *I. paraguariensis* e empregadas como substâncias de referência, estão apresentados nas Figuras 8 a 11.

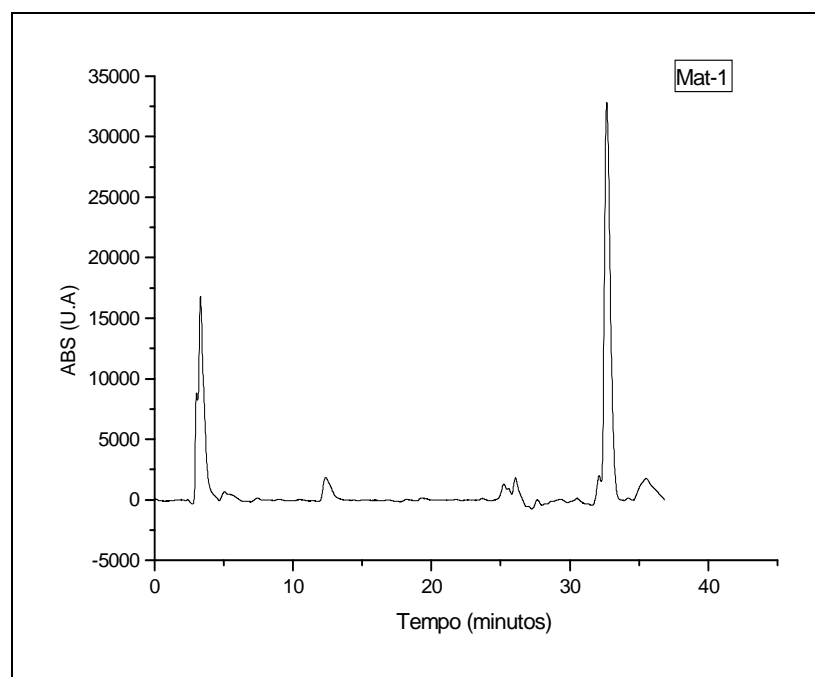


Figura 8. Cromatograma em sistema gradiente da matessaponina-1 isolada das folhas de *Ilex paraguariensis*. Tempo de retenção de 32,5 minutos. Detecção em 205 nm

A matessaponina-1 é uma saponina triterpênica bidesmosídica, relatada para as folhas de *Ilex paraguariensis* por GOSMANN (1989).

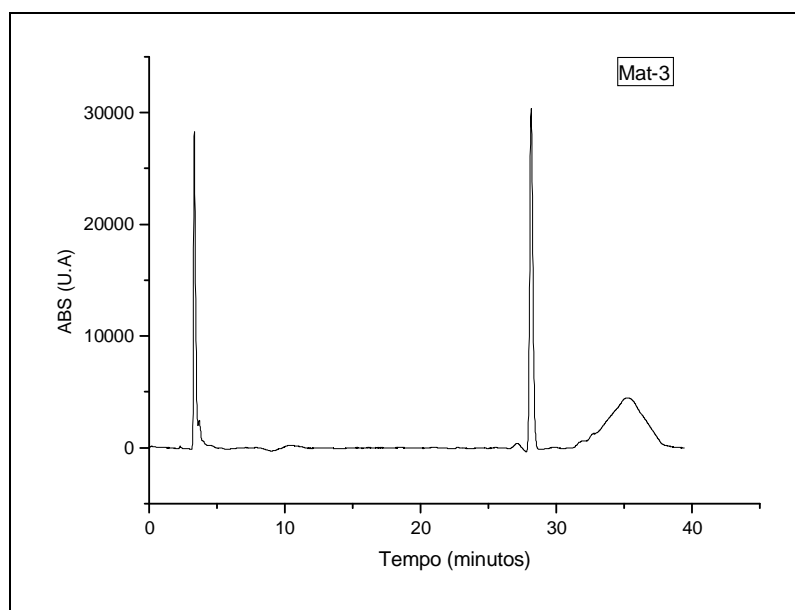


Figura 9. Cromatograma em sistema gradiente da matessaponina-3, isolada das folhas de *I. paraguariensis*. Tempo de retenção de 28,4 minutos. Detecção em 205 nm

A matessaponina-3 é uma saponina triterpênica bidesmosídica, relatada para as folhas de *Ilex paraguariensis* por GOSMANN (1989).

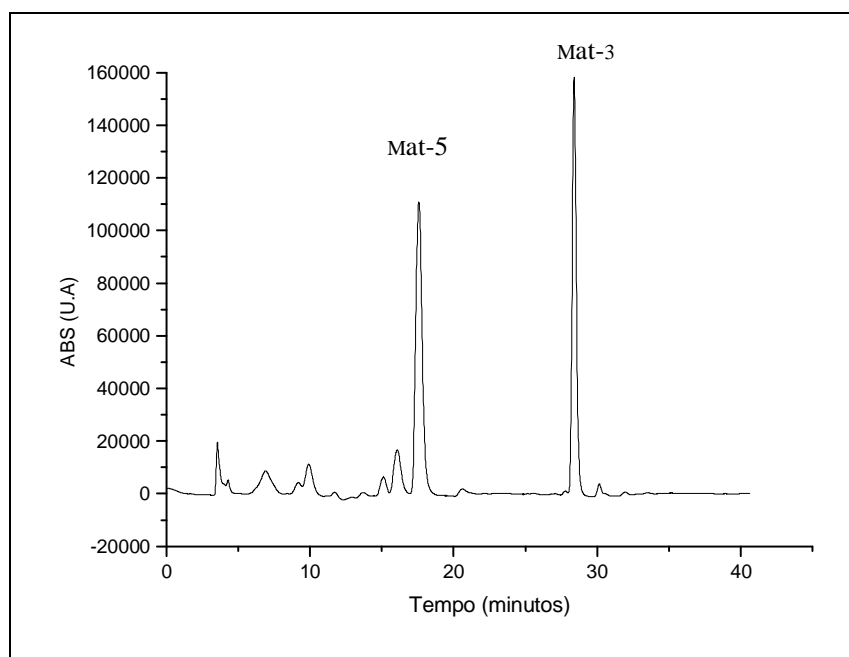


Figura 10. Cromatograma em sistema gradiente da matessaponina-5, isolada das folhas de *I. paraguariensis*. Tempo de retenção de 18,1 minutos. Detecção em 205 nm.

A matessaponina-5 é uma saponina triterpênica bidesmosídica, altamente polar, relatada para folhas de *I. paraguariensis* por KRAEMER (1997).

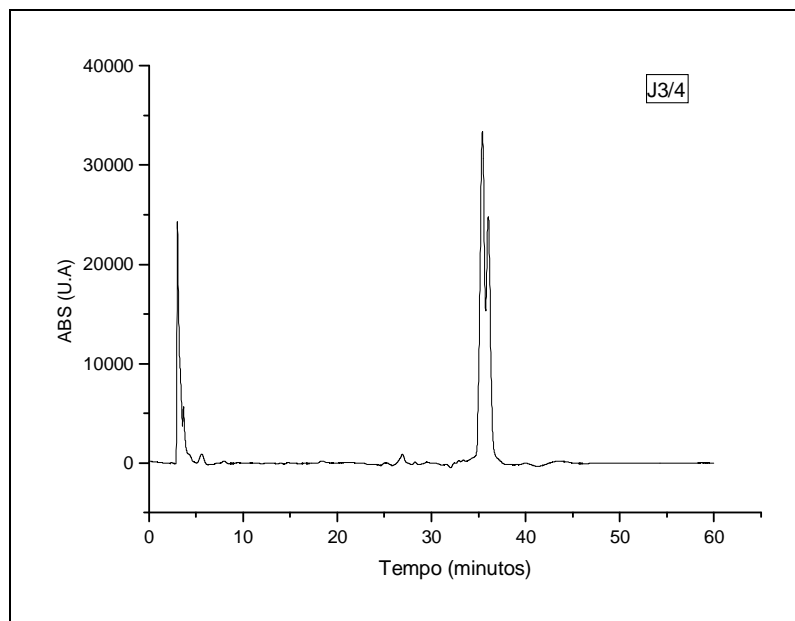


Figura 11. Cromatograma em sistema gradiente da saponina J_{3/4}, isolada das folhas de *I. paraguariensis*. Tempo de retenção de 35,0 minutos. Detecção em 205 nm

A saponina J₃ é triterpênica bidesmosídica, relatada para folhas de *I. paraguariensis* por MONTANHA (1990) na forma de mistura de dois glicosídeos, designados J_{3a} e J_{3b}. A saponina J₄ detectada, também, em mistura com J₃.

2.4.2. Perfil cromatográfico por CLAE do ácido clorogênico e rutina

Os cromatogramas em sistema gradiente dos padrões ácido clorogênico e rutina estão apresentados nas Figuras 12 e 13.

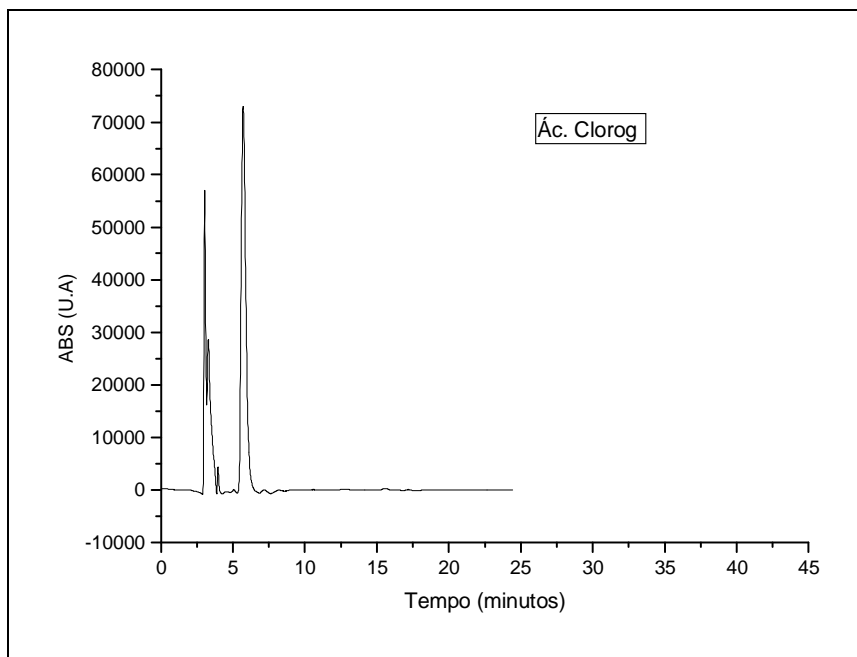


Figura 12. Cromatograma em sistema gradiente do ácido clorogênico. Detecção em 205 nm. Tempo de retenção de 6,0 minutos

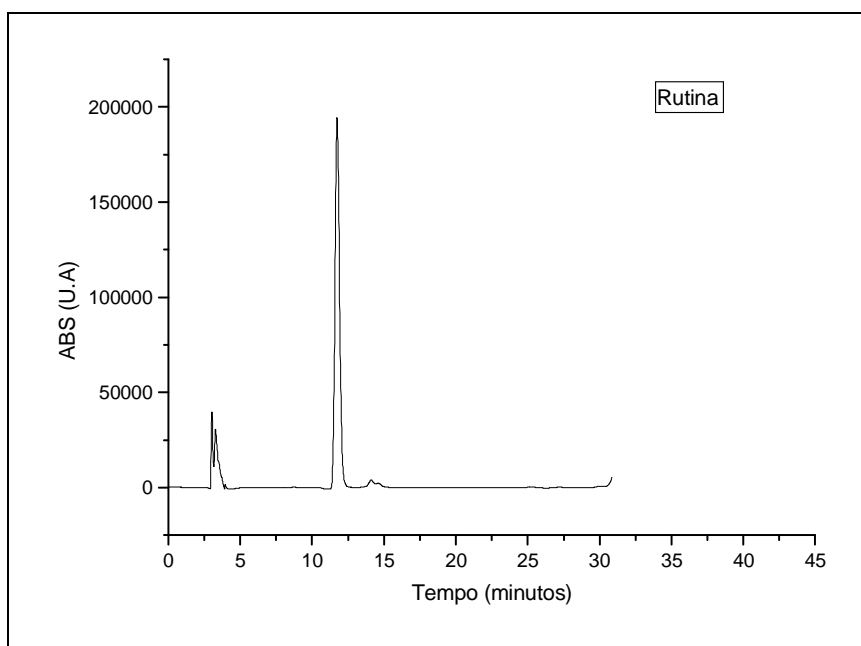


Figura 13. Cromatograma em sistema gradiente da rutina. Detecção em 205 nm. Tempo de retenção de 12,0 minutos.

2.4.3. Perfil cromatográfico por CLAE do extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*.

O perfil cromatográfico por CLAE em sistema gradiente (ítem 2.3.2.1.3) do EXL dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, está apresentados na Figura 14.

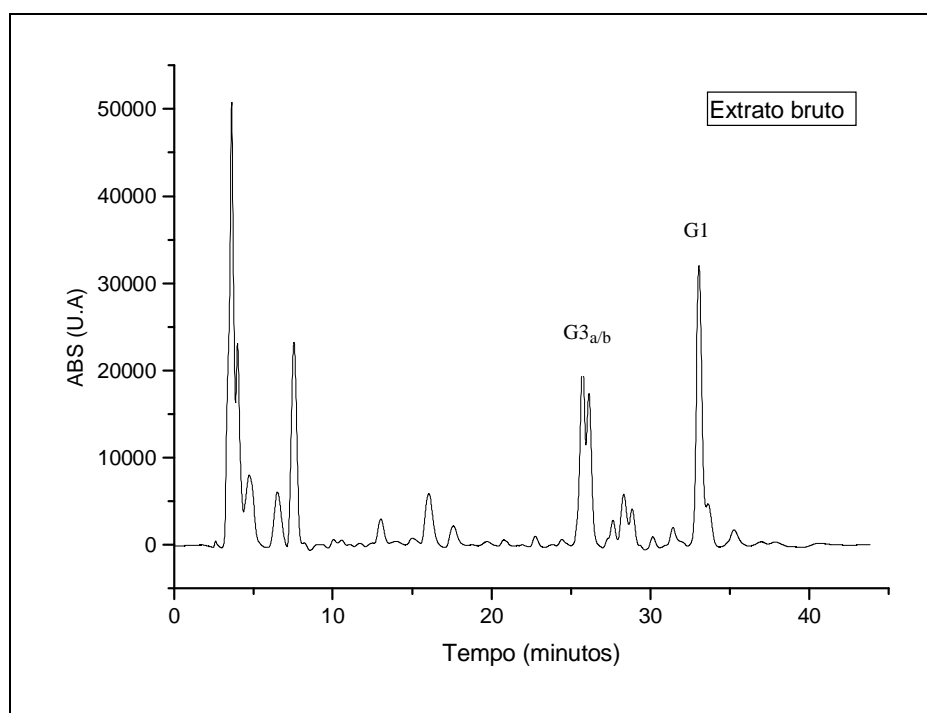


Figura 14. Perfil cromatográfico do EXL dos frutos imaturos de *I. paraguariensis* em sistema gradiente. Detecção em 205 nm.

Pela análise do perfil cromatográfico do EXL dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* frente aos cromatogramas das saponinas e dos compostos polifenólicos empregados como referência, pode-se constatar a presença da matessaponina-1, matessaponina-2 (G3a) e da matessaponina-3 (G3b).

A matessaponina-1 ocorre com um tempo de retenção de 32,5 minutos e sua presença é visível, também, no cromatograma por CCD do EXL (Capítulo 3), com um Rf aproximado de 0,8 no sistema clorofórmio:etanol:água (50:40:5 v/v/v).

O composto G3a/b, o qual se refere às matessaponinas-2 (G_{3a}) e 3 (G_{3b}), pôde ser visualizada no cromatograma do EXL pela presença de dois picos bem nítidos, nos

tempos de 25,5 e 26,0 minutos. Segundo KRAEMER (1997) a saponina G3 é majoritária em ramos e folhas de erva-mate.

A matessaponina-5 está presente em concentração muito baixa nas folhas de *I. paraguariensis* como relatado por KRAEMER (1997). Pela análise cromatográfica por CLAE neste sistema gradiente, não foi possível a sua detecção no perfil do EXL.

A matessaponina-4, confirmando o relatado por KRAEMER (1997) e ATHAYDE (2000) através da análise por CCD, também por CLAE, não foi detectada no EXL dos frutos imaturos.

A ocorrência da saponina J₃, representada pela mistura dos isômeros J_{3a} e J_{3b}, pôde ser constatada pela análise por CLAE do EXL dos frutos, confirmando o relatado por ATHAYDE (2000) através da análise por CCD dos frutos imaturos de erva-mate.

As saponinas J₁ e J₂, por serem monodesmosídicas, são mais apolares em relação à maioria das saponinas presentes em *I. paraguariensis*, e, por este fato, não foram detectadas durante o tempo de corrida cromatográfica utilizado neste trabalho.

Quanto aos compostos polifenólicos, pôde-se detectar claramente a presença do ácido clorogênico, que ocorre com um tempo de retenção de 6,0 minutos. Pelo contrário, a presença do flavonóide rutina, apesar de ter sido relatado por ATHAYDE (2000) nos extratos de folhas, não pôde ser confirmada no extrato dos frutos pela análise por CLAE.

Deste modo, a partir da análise dos cromatogramas das substâncias de referência, obteve-se um perfil das substâncias presentes no extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* (Figura 14). Pôde-se concluir, que o método de análise proposto por CLAE permitiu, não só estabelecer um bom perfil de algumas saponinas presentes no EXL, como também a presença do ácido clorogênico. Dessa forma, o método proposto abrangeu uma ampla faixa de polaridade, na qual se encontram algumas das principais saponinas relatadas para *Ilex paraguariensis*, o que o torna um instrumento de análise adequado para as exigências tecnológicas implícitas nos Capítulos subseqüentes deste trabalho.

2.5. REFERÊNCIAS

ATHAYDE, M.L. **Metilxantinas e Saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A.St. Hil.; Triterpenos e saponinas em outras espécies do Gênero *Ilex***. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2000. Tese de Doutorado.

GNOATTO, S. C. B. **Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e desenvolvimento de extrato seco por nebulização**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2002. Dissertação de Mestrado.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1989. Dissertação de Mestrado.

HE, X-G. On line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 203-232, 2000

KRAEMER, K. H. ***Ilex paraguariensis* St. Hil.(erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 1997. Tese de Doutorado.

LEONARD, S.; CAPOTE, R.; GERMONPREZ, N.; VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; VERMEERSCH, H.; ROSIRE, J.; MAES, L.; ROETS, E.; HOOGMARTENS, J. Liquid chromatographic method for analysis of saponins in *Maesa balansae* extract active against leishmaniasis. **Journal of Chromatography A**, v. 1012, p. 39-46, 2003.

MONTANHA, J. A. – **Estudo químico e Biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae**. Curso de Pós- Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1990. Dissertação de Mestrado.

SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. (Org) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003. Cap. 27, p. 711-740.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 147-162, 2002.

OLESZEK, W.; BIALY, Z. – Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002 - 2005). **Journal of Chromatography A**, v.1112, n. 1-2, p.78-91, 2006.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, 2004. Dissertação de Mestrado.

VERPOORTE, R.; MARASCHIN, M. Aplicações da cromatografia líquida e Espectrometria de massa na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina. **Plantas Mediciniais: Sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Editora Argos, 500p., 2001, Chapecó, SC.

Capítulo 3

Processo de obtenção e caracterização dos produtos purificados dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

3.1. INTRODUÇÃO

As saponinas usualmente ocorrem nas plantas como uma mistura de formas estruturalmente relacionadas com polaridades muito similares às substâncias interferentes ou contaminantes, como flavonóides, açúcares, corantes naturais, entre outros. Isso obriga, conseqüentemente, em uma eliminação seletiva através do desenvolvimento de processos específicos de acordo com as exigências aplicadas ao produto a ser obtido. Assim, a produção de uma fração purificada de saponinas, com eliminação de interferentes, sem formação de artefatos e com a garantia de um rendimento apropriado, depende diretamente da escolha do método (TAKETA, 2001). É, portanto, prática usual no isolamento destes compostos, o emprego de diferentes técnicas de separação como CCD, coluna cromatográfica, *flash* cromatografia, cromatografia por exclusão molecular e CLAE (SCHENKEL *et al.*, 2003; OLESZEK e BIALY, 2006).

A escolha dos líquidos extratores está condicionada, não somente às suas propriedades extrativas, mas também à adequação tecnológica, inocuidade fisiológica e impacto ambiental. Assim, para saponinas, sendo estes compostos glicosídeos de natureza polar, os solventes normalmente empregados são o etanol, metanol ou misturas hidroalcoólicas (SCHENKEL *et al.*, 2003).

Como técnicas de fracionamento utilizadas estão o fracionamento líquido-líquido, o emprego de membranas ultrafiltrantes, a precipitação das saponinas a partir do extrato solúvel pela formação de complexos com colesterol, a cromatografia por exclusão molecular, bem como o uso de resinas de troca-iônica e adsorventes (HOSTETTMAN e MARSTON, 1995; SCHENKEL *et al.*, 2003)

3.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Para a extração de saponinas, entre os processos comumente empregados estão a decocção, maceração, percolação ou a extração exaustiva sob refluxo. A turboextração é uma técnica que se baseia na extração com simultânea redução do tamanho de partícula, favorecendo rápida dissolução das substâncias extrativas e o

quase esgotamente da droga. Além da eficiência do processo, somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade (SONAGLIO *et al.*, 2003). PAVEI (2004) empregou este processo na extração de saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, a partir de uma solução hidroetanólica a 40% (v/v). O método se mostrou adequado e eficiente, além de garantir elevados teores de saponinas.

Entre os métodos de extração seletiva e de purificação mais utilizados na obtenção de extratos ricos em saponinas, estão a extração por partição líquido-líquido através do emprego da água e solventes orgânicos de polaridade crescente, como o clorofórmio, diclorometano e *n*-butanol (SCHENKEL *et al.*, 2003). Contudo, a desvantagem deste método, além do emprego de solventes orgânicos, é a retenção de saponinas altamente polares na fase aquosa remanescente, assim como a presença de flavonóides no *pool* de saponinas do extrato butanólico. Neste caso específico, os métodos propostos para a eliminação dos flavonóides mediante a formação de fenolatos em solução alcalina podem provocar hidrólise e promover a perda de saponinas polares para a fase aquosa da extração. Embora as saponinas sejam substâncias relativamente estáveis, algumas delas são passíveis de sofrer hidrólise enzimática dos açúcares durante a extração com água, esterificação dos grupos ácidos durante tratamento alcoólico, hidrólises dos grupos éster lábeis e reações de transacilação (TAKETA, 2001).

Recentes trabalhos com saponinas incluem a extração a quente do material vegetal com soluções hidroalcoólicas seguida da evaporação do álcool e extração das saponinas em butanol (extração líquido-líquido). Entretanto, a extração a quente pode desintegrar algumas funções lábeis (formas aciladas) e produzir mais artefatos que saponinas genuínas. Também, a extração com metanol em alguns casos, especialmente para saponinas esteroideais pode resultar na formação de metil derivados, não encontrados originalmente nas plantas. Para obter uma composição real de saponinas, extrações a frio com soluções etanol – água são as mais recomendadas (OLESZEK e BIALY, 2006).

Como alternativa para a extração líquido-líquido, a cromatografia por troca-iônica, tem sido empregada na purificação e fracionamento de saponinas, porém se torna uma técnica mais complexa em se tratando do fracionamento de substâncias

vegetais e nem sempre reproduzível (WOLF e THOMAS, 1970; KATSUZAKI *et al.*, 2003; PAVEI, 2004).

O emprego de resinas adsorventes, por sua vez, tem demonstrado ser uma técnica de fracionamento e purificação altamente eficiente, quando aplicada a extratos vegetais contendo saponinas (LARINA *et al.*, 2000, SUNG *et al.*, 2000).

No método de extração em fase sólida, a partir de vários adsorventes (C₁₈, C₈), o extrato de saponinas pode ser carregado em um adsorvente pré-condicionado e lavado com metanol-água. A relação metanol-água tem que ser otimizada individualmente em testes preliminares para as diferentes classes de saponinas. O procedimento é muito conveniente para a preparação de misturas de saponinas altamente purificadas (OLESZEK e BIALY, 2006).

PAVEI (2004) propôs o desenvolvimento de um método tecnológico aplicado à obtenção de uma fração rica em saponinas a partir dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* através da extração em fase sólida em coluna aberta, tendo como suporte sólido uma resina adsorvente e sistema de eluição com polaridade decrescente. Este método se mostrou bastante eficiente e reproduzível na separação da fração saponosídica da fração de polifenóis, incluindo polifenóis e flavonóides.

Nesse mesmo contexto, resultados decorrentes de estudos tecnológicos, relativos ao uso de matrizes poliméricas à base de PVP na adsorção e remoção de taninos, têm indicado que esse processo é capaz de remover polifenóis e flavonóides de modo bastante específico (VERZA, 2006). Um possível desdobramento dessa observação sugere que esse mesmo tipo de matriz possa servir na purificação de extratos ricos em saponinas, sendo os flavonóides e outros polifenóis retirados de forma seletiva.

Devido à complexidade e diversidade de substâncias presentes em um extrato vegetal, procedimentos brandos e controle por CCD devem ser efetuados nos processos de transformação tecnológica para a detecção das substâncias ativas ou de interesse, bem como para os possíveis produtos de degradação (PASCUAL, 2002). A cromatografia em camada delgada torna-se mais uma técnica de suporte na análise de frações de saponinas obtidas de colunas cromatográficas, bem como empregada para a

confirmação da pureza e identidade dos compostos isolados (TAKETA, 2001; OLESZEK e BIALY, 2006).

O presente Capítulo apresenta as etapas tecnológicas de obtenção e caracterização dos produtos purificados dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, através do emprego de dois processos de purificação do extrato bruto liofilizado.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Matéria-prima vegetal: Frutos imaturos (verdes) de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. As coletas foram realizadas na primeira semana do mês de janeiro nos ervais da Ervateira Barão Com. Ind. de Erva-Mate Ltda., localizada no município de Barão do Cotegipe no Estado do Rio Grande do Sul.

A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Bióloga Profa. Dr. Lílian Auler Mentz desta Universidade. Uma exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociência da UFRGS sob nº ICN 125105.

3.3.1.1. Secagem e moagem da matéria-prima vegetal

Os frutos foram separados manualmente dos galhos e, após, submetidos ao processo de secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40 ± 2 °C. O término desta operação teve por parâmetro um teor de umidade inferior a 5%, determinado através da análise da perda por dessecação. Após a secagem, os frutos foram moídos em moinho de facas provido de malha de 1,0 µm de abertura nominal. O pó obtido, foi acondicionado em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz, calor e umidade.

3.3.2. Reagentes e substâncias de referência

Acetonitrila (Ominisolv[®] Merck); ácido orto-fosfórico 85% (Merck), álcool etílico (Quimex), álcool metílico (Quimex), clorofórmio, acetato de etila, metanol, resina

adsorvente, polímero polivinílico (BASF), ácido clorogênico (MERCK®), rutina (MERCK®). Os reagentes utilizados apresentaram grau de pureza Merck ou equivalente, ou HPLC quando requerido.

3.3.3. Aparelhos e equipamentos

Evaporador rotatório R-114 (Büchi, Suíça); estufas para secagem com ar circulante (Heradeus, Alemanha); liofilizador modular Modulyo 4K (Edwards, Inglaterra); Ultra-Turrax T-25 basic (Ika-Werke, Alemanha); Potenciômetro (Mettler, Alemanha); Banho-de-água termostaticado (Biomatic, Brasil); prensa hidráulica manual 5,0 L (Hafico®, Alemanha); estufa de ar circulante TV-60 (Mement, Alemanha), Ultra-som Transsonic T-460 (Elma, Suíça); Cromatógrafo Shimadzu (Bomba LC 10AD; detector UV/VIS SPD10A; injetor automático SIL-10A; alça de 20 µL; módulo de comunicação CBM – 10A; Software Class LC 10); coluna cromatográfica de aço inoxidável com enchimento em fase reversa C-18 Nova-pak[®] 300 x 3,9 mm d.i, diâmetro de partícula de 4 µm (Waters); tamisador vibratório Retac 3D com conjunto de tamises; moinho de facas SKI (Retsch, Alemanha) abertura de malha de 1 mm; potenciômetro 330i (WTW, Alemanha); pesa-filtros; coluna de vidro (600 x 10 mm d.i); cromatoplasmas de sílica gel SAI - 20x20 cm, membrana hidrofílica HVLPO4700 (0,45 µm de poro x 47 mm de diâmetro (Millipore, Estados Unidos); membrana hidrofílica HVP01300 0,45 µm de poro x 13 mm de diâmetro, (Millipore, Estados Unidos); resina adsorvente (Supelco, Estados Unidos); polímero polivinílico (Sigma), Espectrofotômetro (Hewlett Packard, HP 8452 A); Câmera digital MVC FD71 (Sony).

3.3.4. MÉTODOS

3.3.4.1. Caracterização da matéria-prima vegetal

3.3.4.1.1 Determinação da perda por dessecação (F. Bras. IV, 1988)

Uma amostra de 1 g de material vegetal seco e moído, exatamente pesada, foi transferida para um pesa-filtro previamente tarado. A amostra foi colocada em estufa por um período de 2 horas à temperatura de 105 °C e após resfriada em dessecador durante 20 minutos e pesada. Este procedimento foi realizado, até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual pela média de três determinações.

3.3.4.1.2. Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g de frutos secos e moídos, exatamente pesado, foi extraído por decocção, durante 10 minutos com 100,0 ml de água destilada. Após, o extrato foi resfriado até temperatura ambiente, o volume foi reconstituído com água e a solução extrativa filtrada. Em pesa-filtro, previamente tarado, 20,0 g do filtrado foram evaporados à secura sobre banho de água, com agitação ocasional. O pesa-filtro, contendo o resíduo seco foi dessecado em estufa à 100 ± 5 °C, por duas horas. O resíduo foi colocado em dessecador durante 20 minutos, esfriado e pesado. Este procedimento foi repetido até obtenção de peso constante.

O teor de extrativo foi expresso pela média de três determinações com quatro repetições, a partir da seguinte equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m - \left(m \cdot \frac{Pd}{100}\right)} \quad (\text{eq. 1})$$

onde, TE é o teor de extrativos (% , m/m); g = massa (g) do resíduo seco; FD = fator de diluição (5); m = massa da amostra (g); Pd = perda por dessecação (% , mm).

3.3.4.1.3. Análise granulométrica (F. Bras. IV, 1988).

Cerca de 25 g de frutos secos e moídos exatamente pesados, foram submetidas à passagem por tamises, previamente tarados, com abertura nominal de malha de 0,800;

0,630; 0,315; 0,200, 0,125 e 0,063 mm. A tamisação foi realizada em tamisador automático à 60 vibrações por minuto, em movimentos horizontais rotativos e verticais durante 15 minutos. A seguir, as frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas e os dados analisados por método gráfico, a fim de se obter o diâmetro médio das partículas pela análise das curvas de retenção e passagem. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

3.3.4.1.4. Análise cromatográfica por CCD.

Para a avaliação do perfil cromatográfico por CCD da matéria-prima vegetal, foi preparado uma amostra a partir da extração de 1 g de fruto seco e moído em 10 ml de solução etanólica 40%, sob maceração durante 1 hora. O macerado foi filtrado e após concentrado à secura em evaporador rotatório à temperatura máxima de 50 °C. Do resíduo seco, uma amostra de 2 mg foi pesada e dissolvida em 1 ml de metanol. Desta solução, volumes de 20 µL foram aplicados sobre cromatoplasmas de gel de sílica GF₂₅₄ (20 x 20 cm) em bandas de 1cm de largura, mantendo-se uma distância de 1,5 cm das bordas laterais e inferior. Os cromatogramas foram desenvolvidos de forma ascendente em cuba pré-saturada com o sistema eluente composto por clorofórmio:etanol:água, na proporção de 40:40:5 v/v/v. Após secagem à temperatura ambiente, a detecção foi realizada mediante aspersão de uma solução de anisaldeído-ácido sulfúrico, seguida de aquecimento a 105 °C. A visualização das manchas foi realizada sob luz visível.

3.3.4.2. Obtenção do extrato bruto

3.3.4.2.1 Seleção do líquido extrator

Para a seleção do líquido extrator, foram utilizados volumes de 300 ml de cada líquido extrator, observando uma proporção droga:solvente de 1:10 (10%). Os sistemas-solvente utilizados foram misturas de etanol e água, com composições percentuais em etanol de 0, 20, 40, 60, 80 e 100%. A técnica de extração empregada

foi a turbo-extração (Ultra-turrax), a 11.000 rpm, durante 15 minutos, com períodos de repouso de dois minutos intercalados a cada 5 minutos. A solução extrativa, após um repouso de 30 minutos, foi filtrada por prensa hidráulica manual. O filtrado assim obtido, foi novamente filtrado a vácuo através de papel de filtro e o volume completado para 300 ml com o respectivo líquido extrator.

As melhores condições experimentais foram estabelecidas pelas análises do resíduo seco, perfil das saponinas por CCD e pelo volume de espuma produzido pelos extratos.

3.3.4.2.1.1. Determinação do volume de espuma

Para a determinação do volume de espuma dos extratos obtidos com os diferentes solventes (item 3.4.2.1.1), um volume de 20 ml de cada extrato foi concentrado à secura em evaporador rotatório sob pressão reduzida e à temperatura máxima de 50°C. Após, os resíduos foram retomados em 20 ml de água. Para a realização da análise, foram utilizados 10 ml de cada extrato e transferidos para uma proveta de 100 ml. O volume de espuma de cada extrato foi determinado após agitação manual de 10 segundos, pela altura da coluna de espuma (ml) na proveta. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

3.3.4.2.2. Preparação do extrato bruto (EXB)

Para a preparação do extrato bruto, 200,0 g de frutos secos e moídos foram inicialmente macerados com 2000 ml de uma solução etanólica a 40%, durante 40 minutos, ao abrigo da luz à temperatura ambiente. Posteriormente, o macerado foi submetido ao processo por turbo-extração, em aparelho de Ultra-Turrax, conforme o procedimento descrito no item 3.3.4.2.1. A solução extrativa obtida foi filtrada a vácuo e o volume completado para 2000,0 ml com o líquido extrator. Um volume de 1000,0 ml foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura de 50 °C. O extrato aquoso obtido foi fracionado em frascos apropriados, cobertos com papel filtro e congelados em freezer à temperatura de -10 °C para a realização da etapa de liofilização.

3.3.4.2.3 Caracterização do extrato bruto

3.3.4.2.3.1 Determinação do resíduo seco (F. Bras. III, 1977)

Uma amostra de 20,0 g de extrato bruto, exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado, foi concentrada em banho de água, a 90 °C, até resíduo. A seguir, o pesa-filtro foi colocado em estufa à temperatura de 105 °C, durante 2 horas. Após, este período, foi resfriado em dessecador por 20 minutos e pesado. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de resíduo seco (% , m/m), pela média de três determinações.

3.3.4.2.3.2 Determinação do pH (F. Bras. IV, 1988)

O pH do extrato bruto foi determinado em potenciômetro à 25 °C, calibrado com solução tampão de fosfato e acetato em pH 7,0 e 4,0, respectivamente. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

3.3.4.2.3.3 Determinação da densidade (F. Bras. IV, 1988)

A densidade relativa da solução extrativa foi determinada em picnômetro de vidro de 25,0 ml previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água destilada a 20 °C. Após, foi determinado a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi expressa pela média de três determinações segundo a equação:

$$\boxed{d_{25}^{25} = \frac{m_{SE}}{m_{\text{água}}}} \quad (\text{eq. 2})$$

onde: d_{25}^{25} é a densidade relativa; m_{SE} é a massa da solução extrativa e $m_{\text{água}}$ a massa da água.

3.3.4.2.3.4. Análise cromatográficas das saponinas

3.3.4.2.3.4.1. Perfil cromatográfico das saponinas por CCD

A metodologia utilizada para a obtenção do perfil cromatográfico por CCD, das saponinas presentes no extrato bruto, está descrita no item 3.3.4.1.4.

3.3.4.2.3.4.2. Perfil cromatográfico das saponinas por CLAE.

A metodologia por CLAE empregada para a obtenção do perfil cromatográfico das saponinas presentes no extrato bruto está descrita no item 2.3.2.1.3. do Capítulo 2.

3.3.4.3. Obtenção do extrato bruto liofilizado (EXL)

Para a obtenção do extrato bruto liofilizado, 600 ml de extrato bruto (item 3.3.4.2.2) foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à temperatura inferior a 50 °C, até obtenção de um terço do seu volume inicial. O concentrado foi fracionado em frascos apropriados, congelados e submetidos ao processo de liofilização. Este processo foi conduzido em liofilizador à temperatura de -40 °C. Os produtos liofilizados foram pesados e acondicionados em recipientes de vidro âmbar, hermeticamente fechados e armazenados em dessecador.

3.3.4.3.1. Caracterização do extrato bruto liofilizado (EXL)

3.3.4.3.1.1. Determinação da perda por dessecação (F. Bras. III, 1977).

Foram pesadas exatamente amostras de 300 mg de EXL. O procedimento empregado está descrito no item 3.3.4.1.1.

3.3.4.3.1.2. Determinação do pH

Para determinação do pH, foram dissolvidos 0,1g do EXL em 10 ml de água destilada e medido o pH de acordo com a metodologia descrita no ítem 3.3.4.2.3.2.

3.3.4.3.1.3. Perfil cromatográfico do extrato bruto liofilizado

O perfil cromatográfico do extrato bruto liofilizado por CCD e CLAE foi realizado de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.3.4.2.4.1 e 3.3.4.2.4.2.

3.3.4.3.2. Processos de purificação do extrato bruto liofilizado

3.3.4.3.2.1. Método I

Para a purificação do EXL foram empregados dois métodos distintos. O método I, desenvolvido por PAVEI (2004) consiste na purificação do EXL em coluna aberta, contendo como fase estacionária sólida, resina adsorvente e sistema linear de eluição composto por sistemas metanol/água. A partir deste processo, foram obtidas cinco frações, denominadas Fração água, Fração 30 (Fr 30), Fração 50 (Fr 50), Fração 70 (Fr 70) e Fração 90 (Fr 90). Cada fração, imediatamente após sua obtenção, foi concentrada em evaporador rotatório, a temperatura inferior à 50 °C para a total eliminação do metanol. As frações aquosas foram acondicionadas em recipientes apropriados e congeladas para posterior liofilização.

3.3.4.3.2.1.1. Preparação da amostra

As amostras foram preparadas pela dissolução de 400 mg de extrato bruto liofilizado em 30 ml de água Milli-Q[®].

3.3.4.3.2.1.2. Preparação dos eluentes

As fases eluentes consistiram de água e soluções metanólicas a 30, 50, 70 e 90% (v/v). Um volume de 200,0 ml de cada eluente foi preparado utilizando água tipo Milli-Q, acondicionados em frasco de vidro âmbar e degaseificados em ultra-som durante 20 minutos.

3.3.4.3.2.1.3. Obtenção das frações purificadas

Cerca de 30 g de resina foram pesadas e transferidas para um copo de béquer de 500 ml. Um volume suficiente de metanol foi adicionado, de modo a cobrir a resina. A mistura foi agitada suavemente durante 1 minuto e deixada em repouso durante 15 minutos. Após, substituir o metanol por água Milli-Q, a mistura foi agitada e mantida em repouso por mais 10 minutos. A resina hidratada foi transferida para uma coluna de vidro em borosilicato (600 mm de altura x 10 mm d.i.), contendo em torno de 2,5 cm de água na base da coluna. Após a colocação da resina no interior da coluna, o excesso de água foi lentamente drenado de modo a ficar uma camada de aproximadamente 2,5 cm acima do leito de resina. A seguir, foi realizada uma injeção lenta em contra-corrente de água, com a finalidade de retirar as bolhas de ar contidas no interior do leito da coluna. Após essa etapa preparatória, o leito de resina foi mantido em repouso, deixando-o sedimentar livremente. O excesso de água foi novamente drenado, mantendo-se um nível de água acima do leito de resina de aproximadamente 2,5 cm. O volume do leito foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Volume do leito da coluna} = \pi \cdot (1/2d)^2 \cdot h \quad (\text{eq. 3})$$

onde: d é o diâmetro interno da coluna e h é a altura do leito de resina.

A amostra foi aplicada cuidadosamente sobre a superfície do leito de resina, mantendo-se inicialmente um fluxo de eluição de 3 volumes-leito/hora. A eluição com os eluentes foi realizada seguindo um gradiente de polaridade decrescente, em um fluxo constante de 5 volumes-leito/hora.

As frações após obtidas foram imediatamente concentradas em evaporador rotatório à temperatura inferior a 50 °C, até a total eliminação do solvente orgânico (indicado pelo volume de metanol coletado e pela formação de espuma). As frações concentradas foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, cobertos com papel filtro e congeladas para posterior liofilização.

A fase de regeneração e equilíbrio da coluna de resina foi realizada através de eluição seqüencial com metanol; acetato de etila, metanol; solução metanólica a 50% e água Milli-Q. A seguir, esta seqüência foi invertida, iniciando com água até eluição com acetato de etila, mantendo um fluxo de 5 volumes-leito/hora. Como controle deste processo foi medido o pH dos eluentes antes da eluição e a retomada destes valores nos solventes aquosos empregados durante a regeneração da resina. A eficiência do processo de fracionamento foi acompanhada por CCD e CLAE, segundo os métodos descritos nos itens 3.3.4.2.4.5 e 3.3.4.2.4.6, respectivamente.

3.3.4.3.2.2. Método II

Este método de purificação foi desenvolvido durante este trabalho e consiste na purificação do extrato bruto liofilizado através do emprego de um derivado da polivinilpirrolidona (PVP).

3.3.4.3.2.2.1. Preparação da amostra

Foram pesados exatamente 0,4g de EXL e dissolvidos em 200,0 ml de água Milli-Q.

3.3.4.3.2.2.2. Obtenção do extrato purificado

A solução de extrato bruto obtida conforme o item anterior, foi colocada sob agitação em um agitador magnético e tratada com o material polimérico, de modo a

obter um extrato incolor, rico em saponinas². Posteriormente, o extrato foi liofilizado, segundo o procedimento convencional. O produto liofilizado foi codificado como extrato P6. Para a caracterização do extrato P6, foi realizada a determinação do pH e análise dos perfis cromatográficos por CCD e CLAE, conforme as metodologias descritas nos itens 3.3.1.2.4.5. e 3.3.1.2.4.6., respectivamente.

3.3.4.3.3. Avaliação do rendimento dos produtos purificados pelos Métodos I e II.

O rendimento das frações e do extrato P6, foi expresso pela diferença do peso em liofilizado purificado, em relação ao peso inicial de EXL, considerando-se a umidade residual.

3.3.4.3.4. Avaliação por CLAE da presença de polifenóis nas frações purificadas e no extrato P6.

Para a avaliação da presença de polifenóis nas frações purificadas e no extrato purificado P6, foram realizadas análises por CLAE utilizando um sistema cromatográfico desenvolvido por SILVA (2005)³. O método emprega coluna C₁₈, em sistema de eluição gradiente, composto por metanol/água, com detecção em 340 nm.

Para a análise cromatográfica, foram preparadas amostras em concentração de 0,5 mg/ml, utilizando como solvente uma mistura de acetonitrila: água na proporção de 25:75 v/v.

3.3.4.3.5. Avaliação por espectrofotometria no UV-VIS da presença de polifenóis nos produtos purificados.

Para a avaliação da presença de flavonóides e de outros polifenóis nos produtos purificados, foram obtidos inicialmente, espectros de absorção por varredura para uma solução de extrato bruto liofilizado, na faixa de comprimento de onda de 200 e 500

² Detalhes sobre a técnica são omitidos, de modo a resguardar pedido de patente encaminhado ao EITT-UFRGS.

³ Comunicação pessoal a partir de trabalho de tese em andamento junto ao PPGCF.

nm. A região de 325 nm foi selecionada como a de máxima absorção. Como critério de exclusão dos compostos polifenólicos, as absorvâncias das amostras dos produtos purificados, representadas pelas frações purificadas e pelo extrato P6, foram comparadas à absorvância do EXL. O desaparecimento das bandas de absorção em comprimentos de onda superiores a 300 nm, foi considerado como indicativo de exclusão da presença de compostos polifenólicos.

As amostras submetidas à análise espectrofotométrica foram preparadas de modo a obter uma concentração final de 0,1 mg/ml, sendo os resultados expressos pela média de três determinações.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Caracterização da matéria-prima vegetal

Os resultados dos ensaios de caracterização da matéria-prima vegetal, composta por frutos imaturos, secos e moídos de *I. paraguariensis*, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos ensaios de caracterização da matéria-prima vegetal.

Ensaio	Resultado ($\bar{x} \pm s$)
Teor de umidade (m/m) (n = 3)	4,99 \pm 0,05
Teor de extrativos (g%, m/m) (n = 4)	30,74 \pm 0,37

O teor de extrativos em água, representa um dos critérios de caracterização que permite avaliar, comparativamente, matérias-primas vegetais de várias procedências, bem como de diferentes órgãos de uma mesma planta (COUTO, 2005). PAVEI (2004), determinou o teor de extrativos em água e em solução hidroetanólica a 40% para os frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, obtendo um percentual de 43,03% e 49,73% para a água e etanol a 40%, respectivamente. Portanto, um valor superior ao obtido neste trabalho, em relação ao emprego da água como líquido extrator. Esta

diferença entre os valores pode estar relacionada à época de colheita dos frutos, bem como à granulometria do pó ou ainda ao teor de umidade dos mesmos. Em comparação as folhas de *Ilex paraguariensis*, CAMPOS (1996), encontrou teores extrativos entre 31,78% e 42,65%, dependendo do processo de secagem empregado.

As curvas cumulativas de retenção e passagem da distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal, constituída pelos frutos imaturos secos e moídos estão apresentadas na Figura 15.

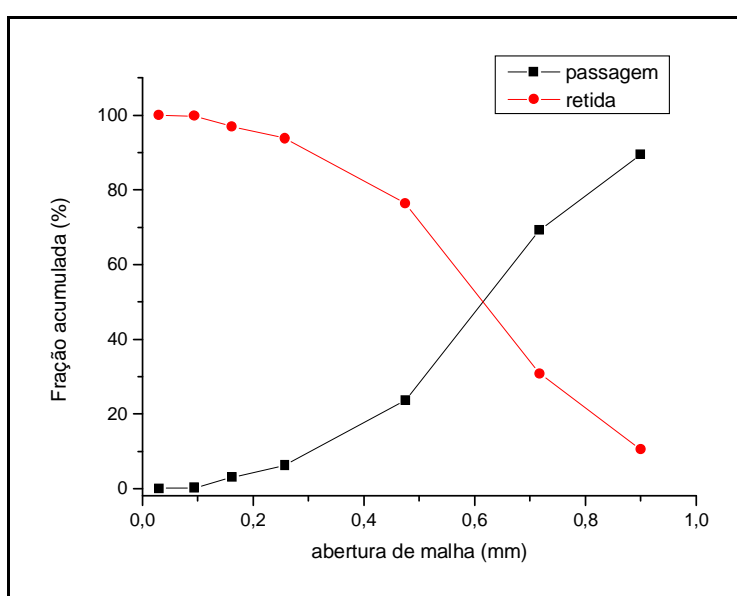


Figura 15. Curvas cumulativas de retenção e de passagem da matéria-prima vegetal, constituída por frutos imaturos secos e moídos de *I. paraguariensis*.

Pelo resultado da análise granulométrica, observou-se que a fração majoritária de partículas foi retida nos tamises com abertura de malha entre 0,315 e 0,635 mm. Extrapolando-se para 50% da frequência percentual, o que equivale ao ponto de interseção das curvas das frações de passagem e retida, foi estimado um tamanho médio de partícula de 0,62 mm.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por PAVEI (2004) o qual obteve um valor médio em torno de 0,58 mm, para os frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, com idêntico processo de moagem.

De acordo com a classificação dos pós preconizada pela Farmacopéia Brasileira IV edição quanto ao tamanho de partícula, esta granulometria obtida está classificado como pó moderadamente grosso.

3.4.2. Preparação do extrato bruto

As características físico-químicas e tecnológicas dos extratos brutos dos frutos imaturos obtidos com diferentes solventes, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Análises físico-químicas dos extratos brutos obtidos com diferentes solventes pelo processo de turbólise, na proporção droga-solvente 1:10 (m/v).

Sistema-solvente	pH ($\bar{X} \pm s$)	Densidade relativa	Resíduo seco (%, m/m)	Volume de espuma (ml)
Água	5,26 ± 0,01	1,00 ± 0,00	1,56 ± 0,08	3,0 ± 0,8
Etanol-água (20:80 v/v)	5,71 ± 0,01	0,982 ± 0,0	1,42 ± 0,01	14,0 ± 1,2
Etanol-água (40:60 v/v)	5,81 ± 0,01	0,960 ± 0,0	1,98 ± 0,01	23,0 ± 1,5
Etanol-água (60:40 v/v)	5,94 ± 0,02	0,928 ± 0,0	2,05 ± 0,01	25,0 ± 2,1
Etanol-água (80:20 v/v)	6,03 ± 0,00	0,881 ± 0,02	1,94 ± 0,01	22,0 ± 1,5
Etanol	-	0,816 ± 0,01	1,18 ± 0,01	18,0 ± 2,1

Pelos resultados das análises físico-químicas, as soluções etanólicas 40% e 60%, apresentaram o maior percentual em resíduo seco, sendo a presença de saponinas comprovada pela maior capacidade de formação de espuma em relação aos demais extratos.

O perfil cromatográfico por CCD em sistema eluente composto por clorofórmio:etanol:água (40:40:5 v/v/v), dos extratos brutos dos frutos imaturos obtidos com misturas hidroetanólicas em diferentes proporções, está apresentado na Figura 16.

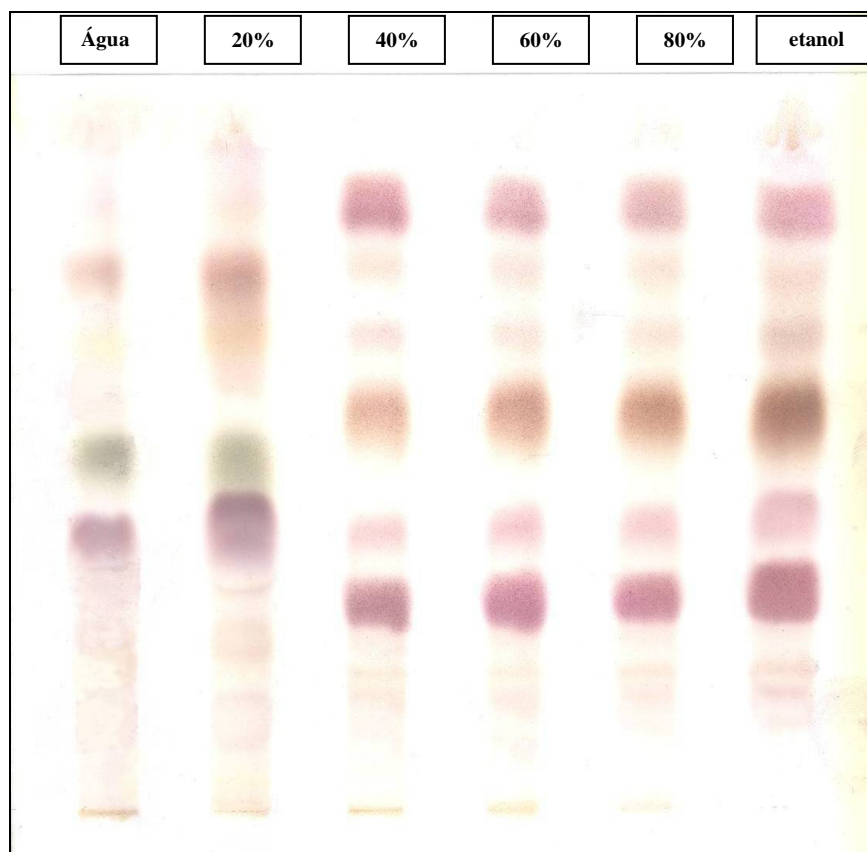


Figura 16. Perfil cromatográfico por CCD dos extratos brutos de *Ilex paraguariensis* obtidos em diferentes sistemas solventes.

Uma coloração púrpura se desenvolve após a reação das saponinas com uma solução de anisaldeído - ácido sulfúrico e aquecimento (TAKETA, 2001). Deste modo, pelos perfis cromatográficos, observou-se diferenças quanto ao número, intensidade e posição das manchas relacionadas às saponinas para os extratos obtidos com as soluções contendo água e etanol 20 %, em relação aos perfis dos demais extratos. Este fato, pode ter sido ocasionado pelo menor teor de saponinas nestes extratos como observado pelos baixos volumes de espuma gerado, como também, por um deslocamento nos valores de *r_f*. Embora os perfis cromatográficos dos extratos de 40% a 100% de etanol sejam semelhantes, a análise do volume de espuma indicou uma maior presença de saponinas nos extratos contendo 40 e 60% de etanol, os quais apresentaram, também, um maior percentual em resíduo seco. Neste sentido, considerando-se a maior relevância atribuída aos testes de resíduo seco e de formação de espuma, aliado à necessidade de menor volume de solvente orgânico, optou-se pela

mistura etanólica a 40% como a melhor alternativa tecnológica. Essa escolha coincide com o relatado por ATHAYDE (2000), a qual preconizou uma mistura hidroetanólica a 40%, como sendo o melhor líquido extrator para saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*.

3.4.2.1. Caracterização do extrato bruto (EXB)

O resultado das análises físico-químicas do extrato bruto, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado dos ensaios de caracterização do extrato bruto.

Ensaio	Resultado ($\bar{x} \pm s$)
Densidade relativa (n = 3)	0,96 \pm 0,0
pH (n = 3) (22,8 °C)	6,06 \pm 0,02
Resíduo seco (g%, m/m) (n = 3)	2,33 \pm 0,005

Tendo em vista que, para a preparação do extrato bruto foi empregada uma mistura hidroetanólica a 40%, os valores da densidade relativa e pH estão de acordo com os obtidos para o extrato a 40% de acordo com a Tabela 4. No entanto, o valor do resíduo seco, neste caso, foi superior. Este fato pode ser atribuído à diferenças entre os lotes da matéria-prima empregados nas análises.

3.4.3. Caracterização do extrato bruto liofilizado (EXL)

Os resultados das análises físico-químicas do EXL estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de caracterização do extrato bruto liofilizado.

Ensaio	Resultado $(\bar{x} \pm s)$
Teor de umidade (m/m) (n = 3)	6,40 ± 0,07
pH (n = 3, 25,0 °C)	5,85 ± 0,01

O elevado teor de umidade do extrato liofilizado revela o caráter altamente higroscópico do mesmo, sendo possível alterações do valor durante o manuseio das amostras.

O pH do EXL de 5,85 está próximo ao pH obtido para o EXB de 6,06. Estas variações podem estar associadas ao pH da água utilizada na dissolução do extrato, bem como à temperatura de análise.

3.4.4. Perfil cromatográfico por CCD da matéria-prima vegetal, EXB e EXL

Os cromatogramas por CCD da matéria-prima vegetal, extrato bruto, extrato bruto liofilizado e a substância de referência G1, obtidos com os três sistemas de eluição constituídos por misturas de clorofórmio, etanol e água, nas proporções de 70:40:5 v/v/v, 50:40:5 v/v/v e 40:40:5 v/v/v, estão apresentados, na seqüência, nas Figuras 17, 18 e 19, respectivamente.

Pela separação cromatográfica das amostras analisadas, observou-se uma semelhança entre os perfis cromatográficos para as substâncias presentes na matéria-prima vegetal, extrato bruto e EXL, sugerindo que as etapas do processamento da matéria-prima vegetal, como a extração e a liofilização não produziram modificações evidentes na sua constituição química.

Pela análise dos cromatogramas, a melhor separação foi obtida com o sistema eluente composto por clorofórmio, etanol e água na proporção 40:40:5 (v/v/v), tanto na matéria-prima, como nos extratos bruto e liofilizado. Isso confirma os resultados relatados por ATHAYDE (2002) e PAVEI (2004), os quais obtiveram para folhas e frutos de *Ilex paraguariensis*, o melhor perfil de separação cromatográfica com este sistema eluente.

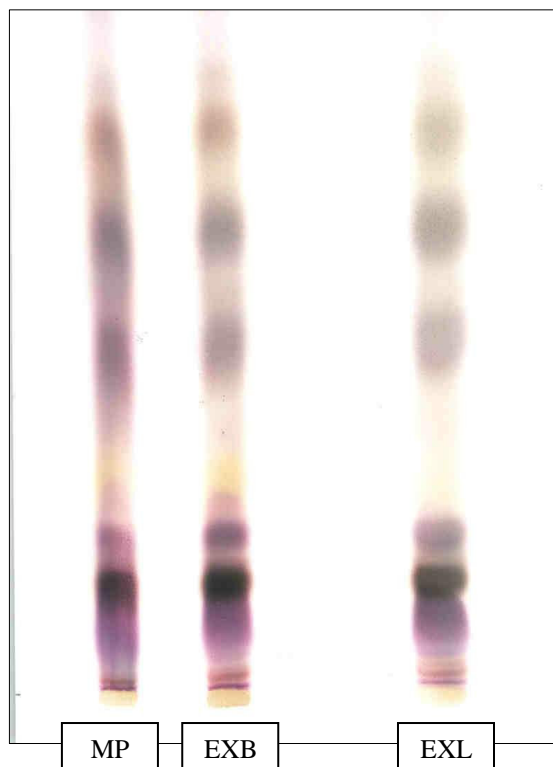


Figura 17. Cromatograma por CCD da matéria-prima vegetal (MP), extrato bruto (EXB) e extrato bruto liofilizado (EXL), em sistema CHCl_3 : EtOH: H_2O (70:40:5: v/v/v). Revelação: anisaldeído-sulfúrico, aquecimento a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e visualização sob luz visível.

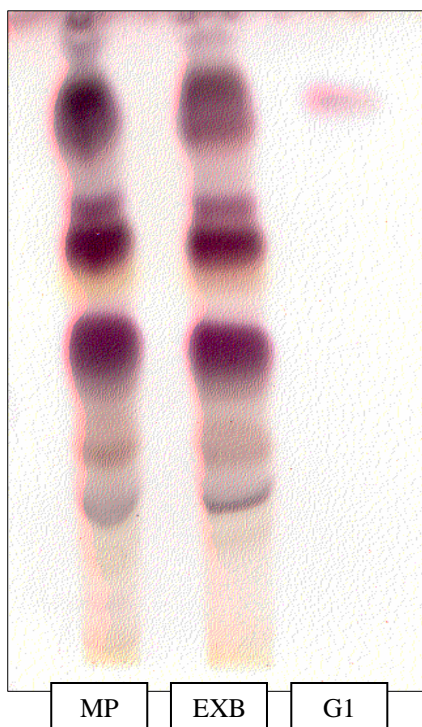


Figura 18. Cromatograma por CCD em sistema CHCl_3 : EtOH: H_2O (50:40:5 v/v/v)

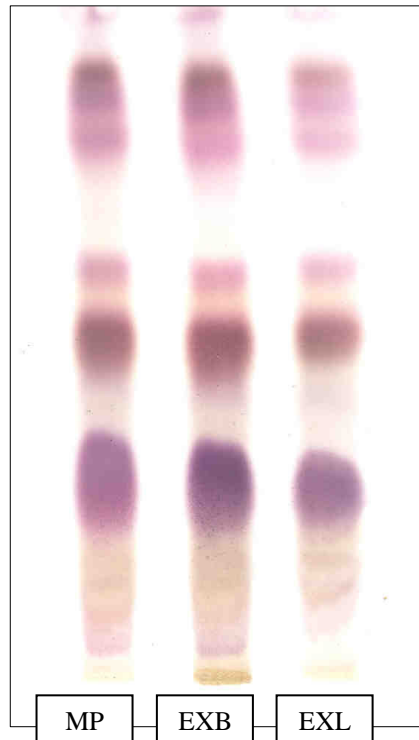


Figura 19. Cromatograma por CCD em sistema CHCl_3 : EtOH: H_2O (40:40:5 v/v/v).

Pela intensidade, resolução e número de manchas, esse sistema eluente demonstrou ser bastante apropriado no monitoramento posterior às etapas de transformação tecnológica, principalmente, nas etapas de fracionamento e purificação.

3.4.5. Perfil cromatográfico por CCD das frações purificadas e do extrato P6

Os perfís cromatográficos por CCD obtidos pelos métodos I e II em sistema CHCl_3 : EtOH: H_2O 40:40:5 (v/v/v/) estão apresentados nas Figuras 20A e 20 B.

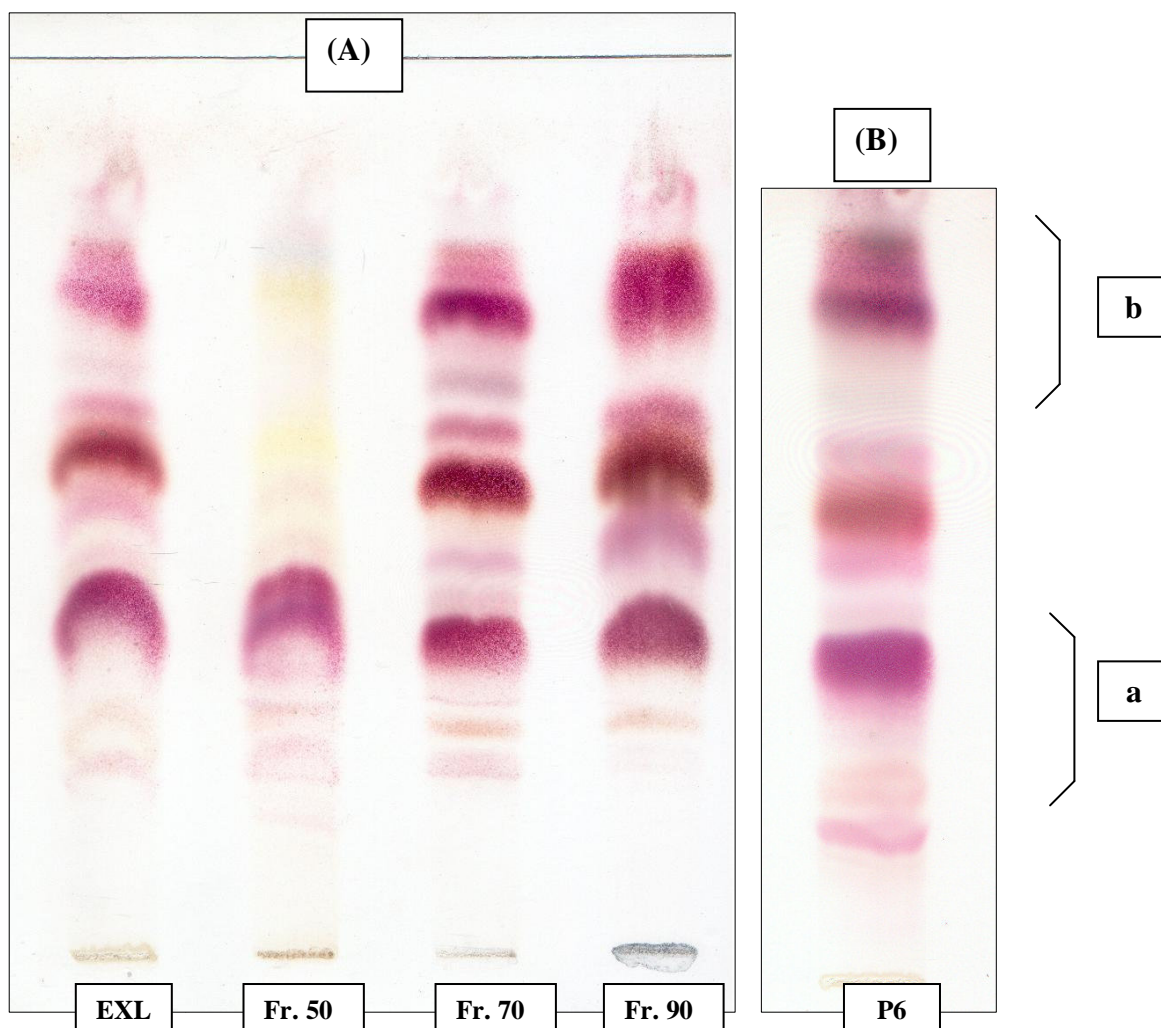


Figura 20. Cromatogramas por CCD das frações purificadas pelo método I (A) e II (B), em sistema eluente clorofórmio:etanol:água (40:40:5 v/v/v), especificando as bandas de baixo (a) e alto (b) valor de r_f .

Pela análise cromatográfica das frações purificadas, a presença de saponinas é predominante nas frações 70 e 90, as quais apresentam um perfil cromatográfico qualitativamente semelhante ao observado para o EXL. No entanto, pela intensidade das manchas, pode-se observar uma maior presença destes compostos nestas frações, principalmente as saponinas de menor polaridade.

A fração 50, por sua vez, apresenta um perfil diferenciado das duas frações e, conseqüentemente do EXL, a julgar pela posição no cromatograma das manchas predominantes na fração 50, as quais compreendem apenas as saponinas mais polares dos frutos de *Ilex paraguariensis*.

Pelos mesmos critérios de comparação adotados para as frações purificadas, pode-se afirmar que o extrato P6 apresenta um perfil de saponinas qualitativamente semelhante ao observado para o EXL. Este produto, porém, difere do perfil observado nas frações 70 e 90, no sentido de conter na sua composição, tanto as saponinas mais polares quanto as menos polares, como observado pela intensidade das manchas correspondentes aos valores de alto [a] e baixo [b] rf.

A análise por CCD indica que as frações purificadas 70 e 90 e o extrato P6 seriam qualitativamente similares, porém, sugere-se diferenças em termos de composição quantitativa entre esses produtos.

3.4.6. Rendimento das frações purificadas e do extrato P6

O rendimento das frações purificadas e do extrato P6, tendo como valor de referência a quantidade inicial de EXL purificado pelos Métodos I e II, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado do rendimento ponderal das frações purificadas (Método I) e do extrato P6 (Método II) em relação ao EXL.

Produto purificado	Rendimento (%)
Fração água	6,64
Fração 30	12,5
Fração 50	20,0
Fração 70	30,22
Fração 90	26,06
Extrato P6	54,8

Pela comparação dos rendimentos, fica evidente que o Método I permite a obtenção de uma maior massa total de produto, ou seja, 95,4 % da massa de extrato bruto liofilizado utilizado como matéria-prima, enquanto que a massa de extrato P6 corresponde a 54,8 % da mesma. Ainda que apenas as massas referentes às frações 50,

70 e 90 mais ricas em saponinas fossem consideradas, a massa de fração purificada corresponderia a aproximadamente 76 % da massa de extrato bruto liofilizado. Deste modo, pode-se afirmar que o Método I foi o mais eficiente, além de permitir a separação concomitante de polifenóis e, provavelmente, de outras substâncias de elevada polaridade, as quais se encontram em maior teor nas frações contendo água e metanol 30%.

Do ponto de vista tecnológico, se destaca além da simplicidade e rapidez implícitas no Método II, o fato deste dispensar o emprego de solvente orgânico. Embora, esse método apresente um rendimento inferior comparado ao método I e não leve à separação de uma fração líquida contendo polifenóis, o perfil mais abrangente em termos de polaridade das saponinas, a sua reprodutibilidade e o tempo de processo o tornam um método muito mais viável.

3.4.7. Análise comparativa por CLAE do extrato bruto liofilizado, das frações purificadas e do extrato P6

Os cromatogramas por CLAE em sistema gradiente, referentes ao EXL, frações purificadas (Método I) e do extrato P6 (Método II) estão apresentados nas Figuras 21 a 27.

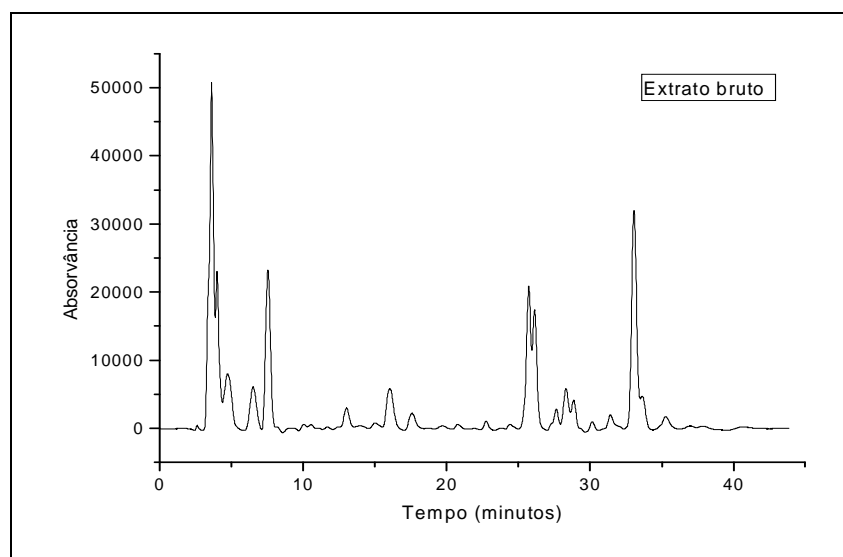


Figura 21. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente do EXL. Detecção em 205 nm

Pelo perfil cromatográfico por CLAE do EXL, observa-se uma separação satisfatória dos picos mais proeminentes do cromatograma. Pela avaliação dos tempos de retenção, observa-se também, que existem dois grupos de compostos com polaridades distintas, representados pelos compostos polifenólicos (com tempos de retenção de 6,5 min para o ácido clorogênico e de 12,0 min para a rutina) e pelas matessaponinas-2/3 e matessaponina-1 com tempos de retenção em torno de 26 minutos e 34 minutos, respectivamente. Deste modo, pode-se considerar que o sistema garantiu uma boa separação dos dois grupos de substâncias responsáveis pelas principais propriedades biológicas e farmacológicas atribuídas à erva-mate.

A comparação dos cromatogramas das frações purificadas, obtidas pelo Método I, reafirma o relatado por PAVEI (2004), ao mesmo tempo em que valida a reprodutibilidade de purificação e fracionamento do método. A principal característica desse processo é a separação da fração saponosídica da fração que contém a maioria dos polifenóis relatados para os frutos e folhas de *I. paraguariensis*.

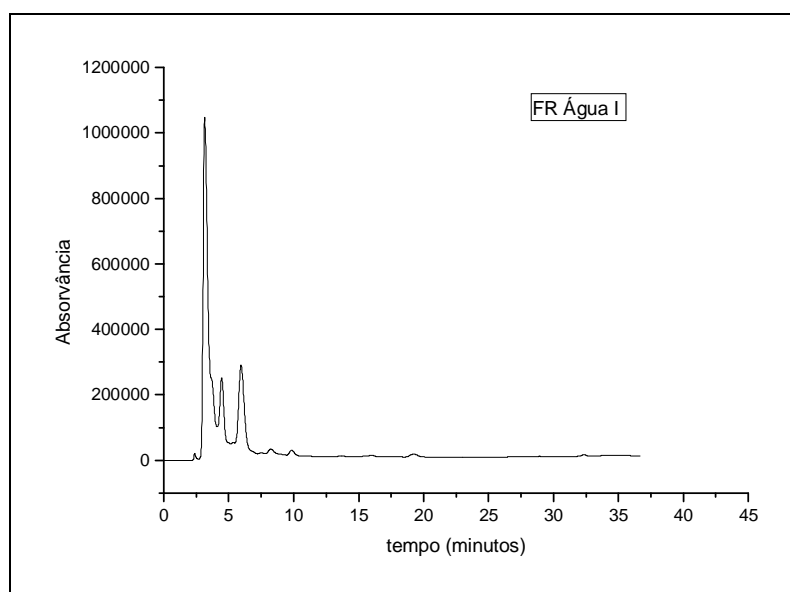


Figura 22. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente da fração água.
Detecção em 205 nm

Neste cromatograma destaca-se apenas a presença de substâncias com tempos de retenção máxima de 7 minutos, ou seja, que apresentam uma elevada polaridade.

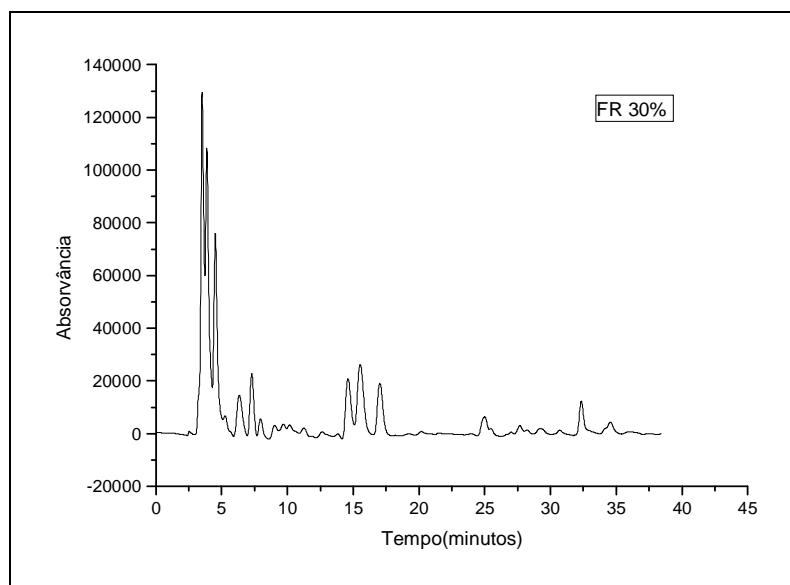


Figura 23. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente da Fração 30. Detecção em 205 nm

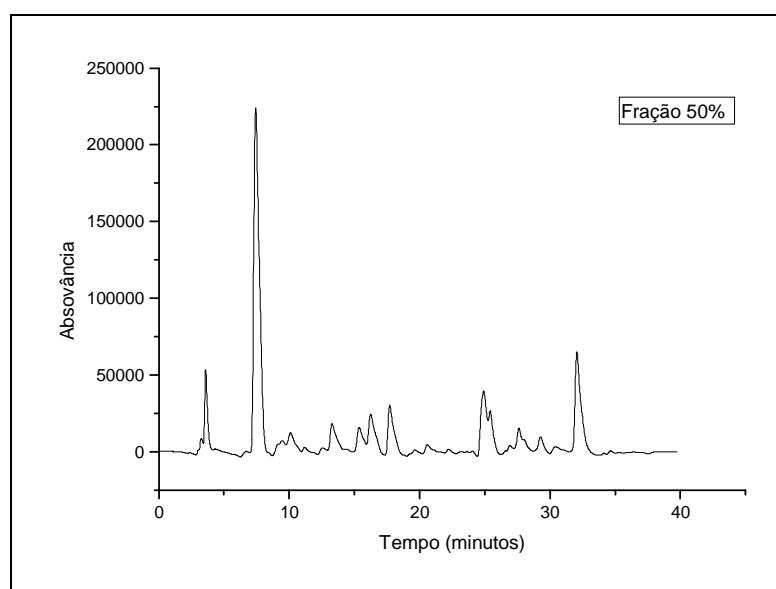


Figura 24. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente da Fração 50. Detecção em 205 nm.

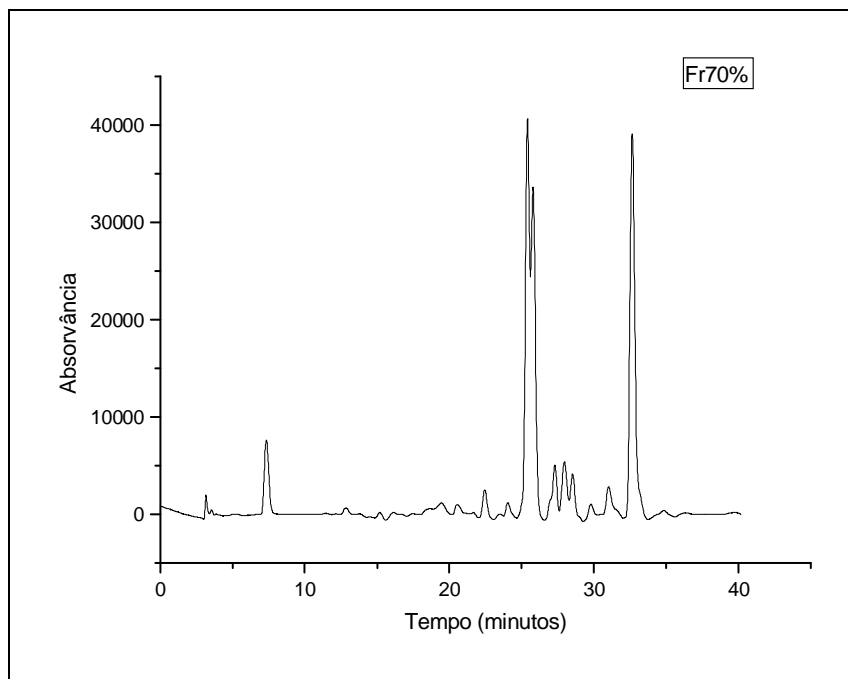


Figura 25. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente da Fração 70.
Detecção em 205 nm

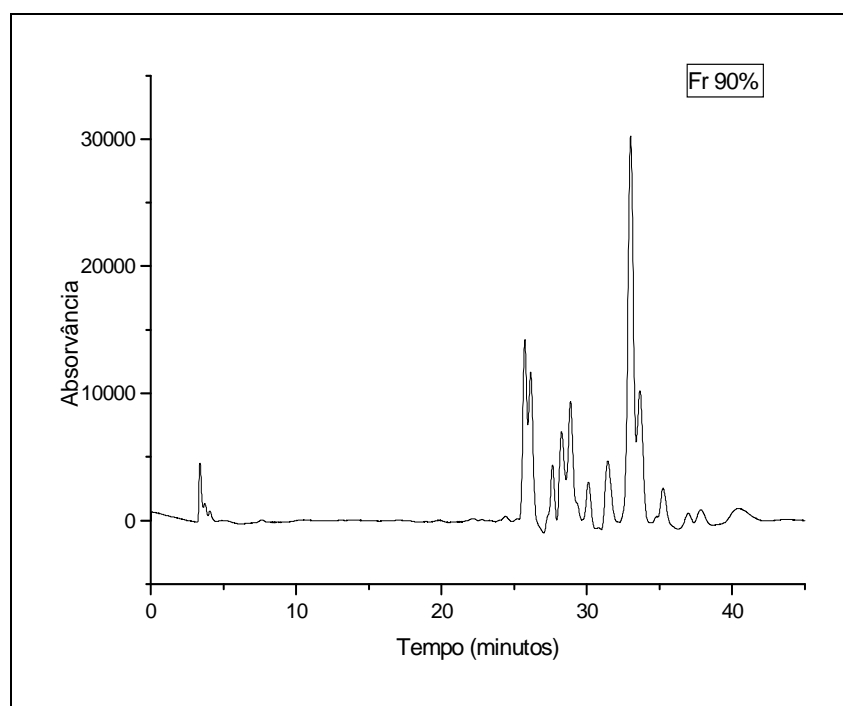


Figura 26. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente da Fração 90.
Detecção em 205 nm.

Pela análise destes cromatogramas, pôde-se constatar o gradual desaparecimento da quase totalidade dos picos com tempos de retenção inferior a 10 minutos das frações com a diminuição da polaridade dos eluentes, os quais incluem os ácidos orgânicos e outros compostos não-saponosídicos de elevada polaridade (PAVEI, 2004).

O pico com tempo de retenção de 8,2 min, presente nos cromatogramas das frações 50 e 70, como sendo o ilexosídeo II, a saponina mais polar detectada por TAKETA (2001) nos frutos de *I. paraguariensis*, ainda encontra-se em fase de estudo.

A comparação do cromatograma obtido para a fração 50 com aqueles obtidos para as frações 70 e 90 reafirma o observado na análise por CCD, demonstrando o predomínio de compostos triperpênicos mais polares na fração 50, juntamente com os compostos polifenólicos.

O perfil cromatográfico por CLAE do extrato P6 (Figura 27) mostra aspectos diferenciados em relação ao EXL e às frações 70 e 90 obtidas pelo Método I (Figuras 25 e 26).

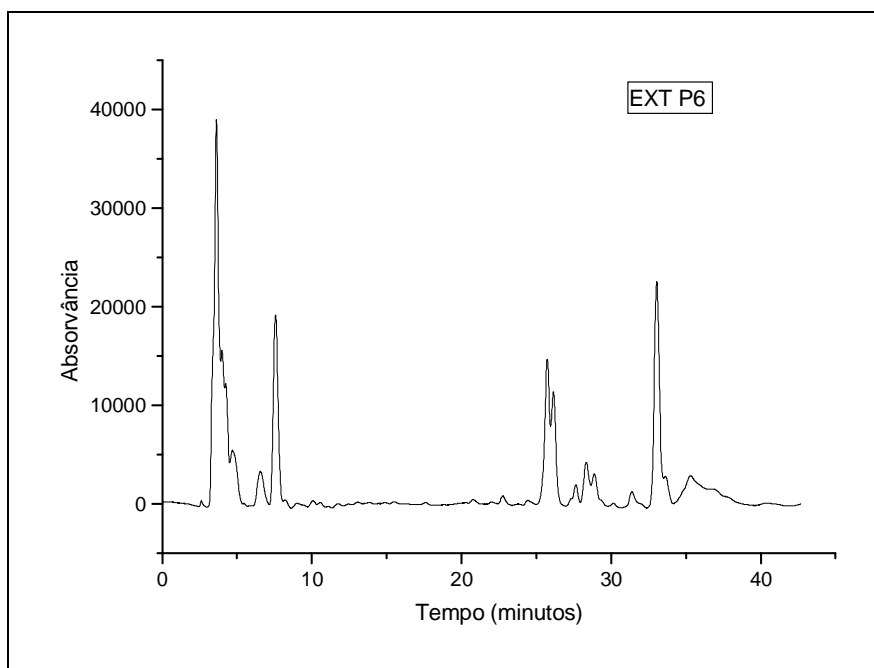


Figura 27. Cromatograma por CLAE em sistema gradiente do extrato P6. Detecção em 205 nm.

Pela análise do perfil cromatográfico do extrato P6, observa-se claramente os picos referidos como saponinas. Também, fica constatada a ausência dos compostos intermediários, os quais estão associados às substâncias polifenólicas. Da mesma forma, a comparação dos cromatogramas por CLAE do extrato P6 e das frações 70 e 90, vem ao encontro do observado pela análise por CCD para esses produtos. Deste modo, pode-se concluir que o Método II leva à obtenção de um produto purificado, no qual contém predominantemente saponinas de diferentes polaridades, porém, num único produto e em uma única etapa.

3.4.8. Caracterização por espectrofotometria no ultravioleta do EXL e dos produtos purificados

Este estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer uma forma alternativa de caracterizar os produtos purificados obtidos pelos Métodos I e II, tendo em vista que os principais compostos polifenólicos presentes nos frutos de *I. paraguariensis* apresentam uma absorção máxima em torno de 325 nm.

Os resultados das absorvâncias das soluções de EXL, Fr. 50, Fr. 70, Fr. 90 e P6, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Absorvância em 325 nm para o EXL, Fr 50, 70 e 90 e extrato P6.

Absorvância	Produto ($\bar{x} \pm s$)				
	EXL	Fr 50	Fr 70	Fr 90	P6
	0,232 $\pm 0,003$	0,505 $\pm 0,004$	0,043 $\pm 0,20$	0,048 $\pm 0,14$	0,046 $\pm 0,07$

Os respectivos espectros UV-VIS, obtidos por varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm, para o EXL, frações purificadas e extrato P6, estão apresentados na Figura 28.

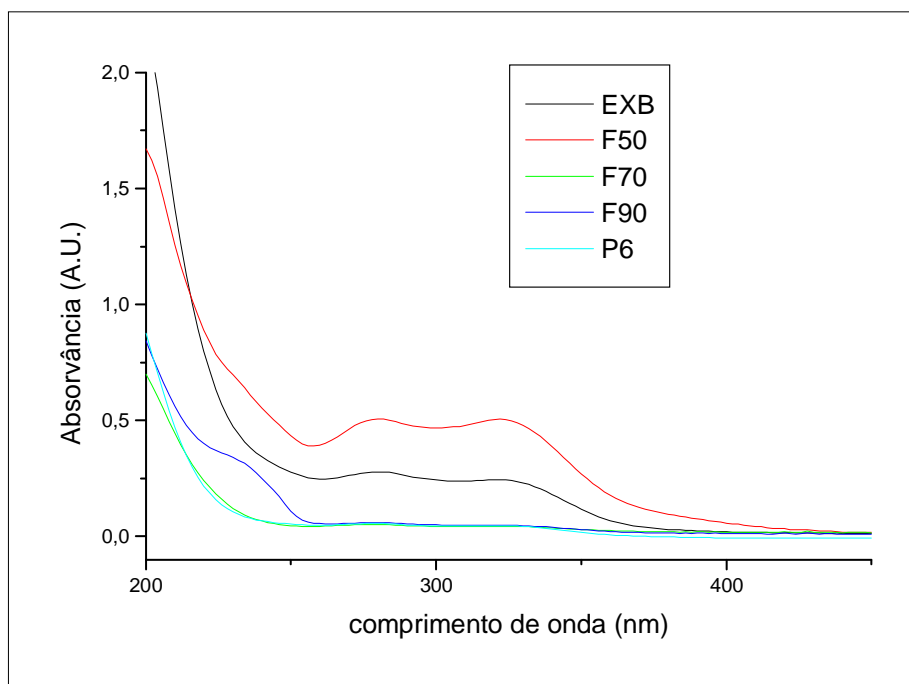


Figura 28. Espectro de absorção no UV-VIS do EXL, Fr. 50, Fr. 70, Fr. 90 e P6.

Pela análise dos espectros pôde-se avaliar a eficiência na eliminação dos compostos polifenólicos e de outras substâncias com absorção significativa acima de 220 nm. Como esperado, os máximos de absorção observados para o extrato bruto liofilizado podem ser facilmente detectados na Fr 50, porém, nesta, em maior concentração, o que coincide com as análises realizadas por CCD e CLAE. Os espectros relativos ao extrato P6 e a Fr 70 se sobrepõem, demonstrando uma eficiência semelhante em termos de remoção dos polifenóis, o que não ocorre completamente com a Fr 90. No espectro dessa fração, observa-se uma nítida absorção em torno de 240 nm. Neste caso, no entanto, um estudo mais aprofundado seria necessário para uma conclusão mais fundamentada.

3.4.9. Análise por CLAE da presença de compostos polifenólicos nas frações purificadas e no extrato P6.

Os cromatogramas por CLAE do EXL, das frações purificadas e do extrato P6, estão apresentados nas Figuras 29 a 35.

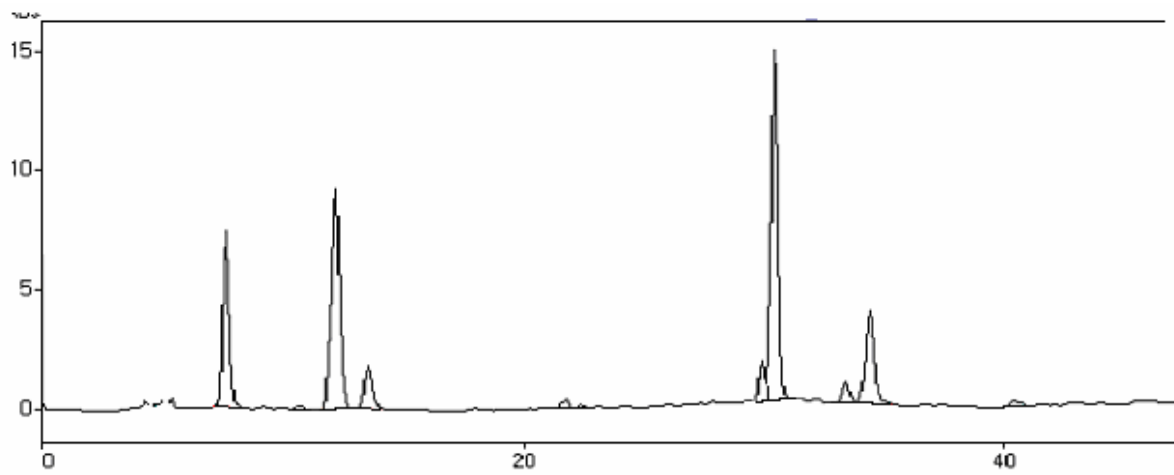


Figura 29. Cromatograma por CLAE do EXL. Detecção em 340 nm

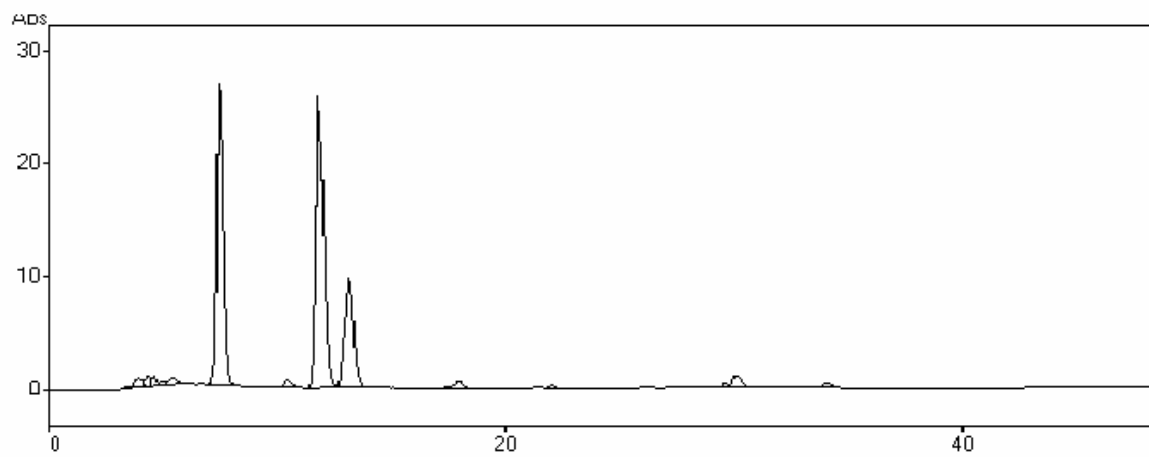


Figura 30. Cromatograma por CLAE da Fr Água. Detecção em 340 nm.

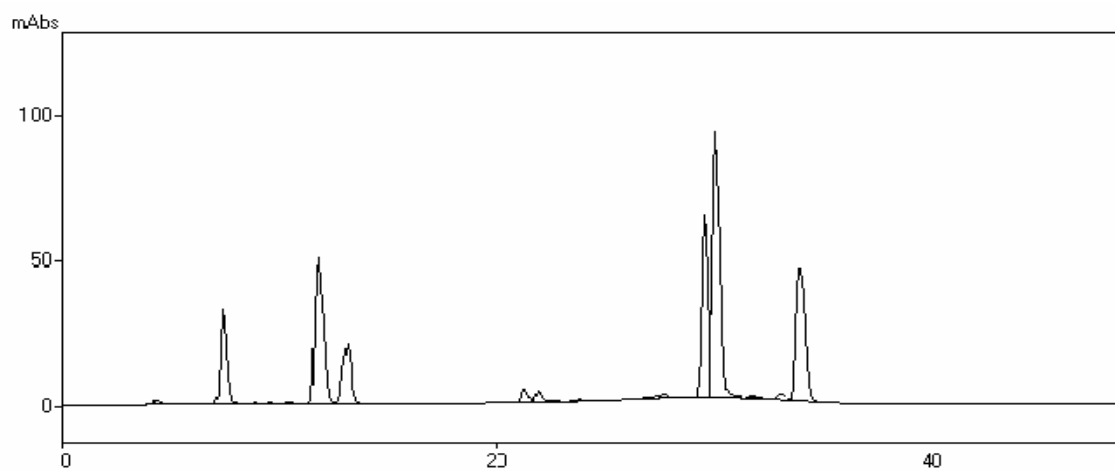


Figura 31. Cromatograma por CLAE da Fr 30. Detecção em 340 nm

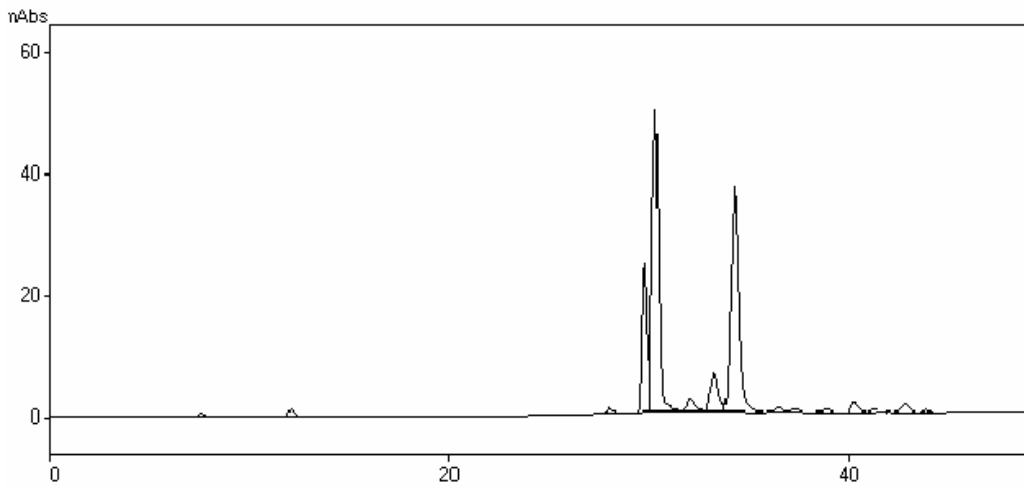


Figura 32. Cromatograma por CLAE da Fr 50. Detecção em 340 nm.

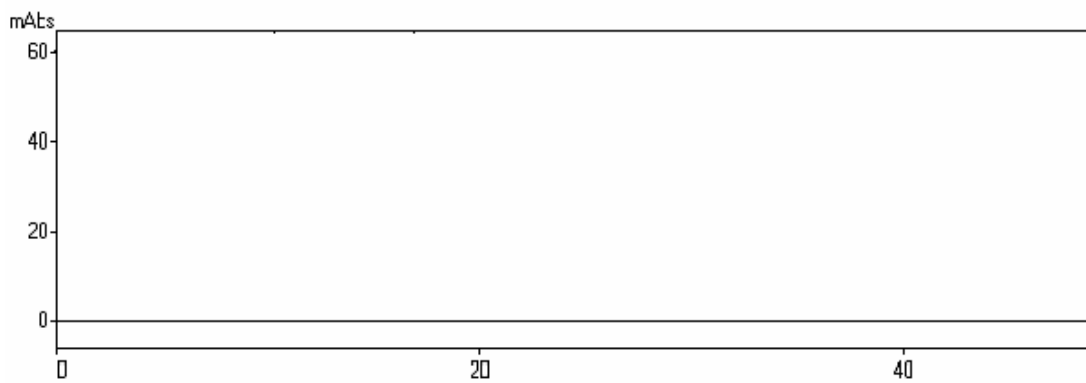


Figura 33. Cromatograma por CLAE da Fr 70. Detecção em 340 nm.

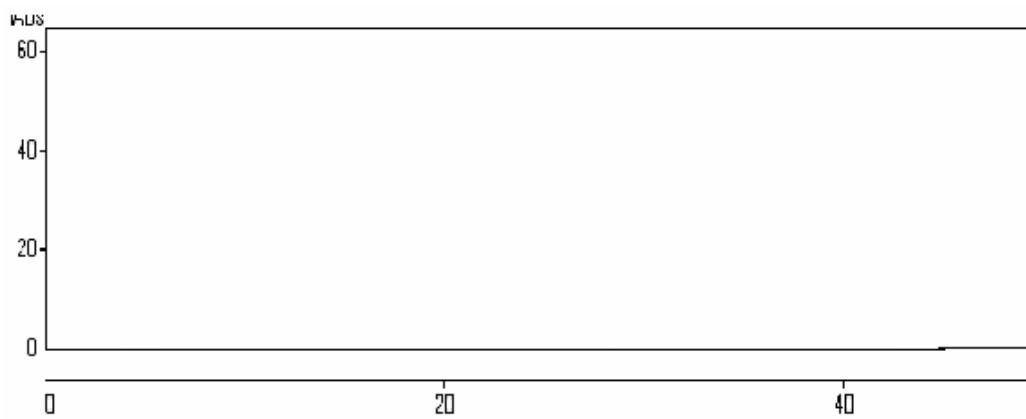


Figura 34. Cromatograma por CLAE da Fr 90. Detecção em 340 nm.



Figura 35. Cromatograma por CLAE do extrato P6. Detecção em 340 nm.

De acordo com o sistema gradiente proposto por SILVA (2005) para a identificação por CLAE dos compostos polifenólicos nos extratos de folhas de *Ilex paraguariensis*, os ácidos clorogênico e *iso*-clorogênico ocorrem com tempos de retenção em torno de 10 minutos, enquanto que a rutina em 35 minutos.

Pela análise cromatográfica das frações purificadas, verificou-se na fração obtida com água, apenas a presença do primeiro grupo de compostos, os quais se referem aos ácidos orgânicos. Na Fr. 30, contudo, já se observa a presença de um segundo grupo de picos caracterizados por um tempo de retenção similar ao da rutina e em maior intensidade comparado aos picos referentes aos ácidos orgânicos. Na Fr. 50, no entanto, prevalecem apenas os picos relacionados à rutina, com uma intensidade ainda maior que na Fr. 30. Nas frações 70 e 90, pelo contrário, observa-se a ausência dos picos referentes aos ácidos orgânicos como aos dos flavonóides, ou seja, a ausência total de picos indica que nestas frações não há a presença de nenhuma substância com absorção em 340 nm.

Esta constatação permite considerar o Método I de fracionamento como uma alternativa tecnológica para a separação de frações ricas em ácidos orgânicos (Fr. água) e em flavonóides (Fr. 50) contidos nos frutos de erva-mate.

O cromatograma por CLAE do extrato P6 (Figura 35), mostra claramente a eficácia do Método II de purificação na remoção dos polifenóis presentes no EXL, tendo em vista a ausência de picos. Este resultado, juntamente com o observado pela

análise espectrofotométrica desse mesmo produto, assinala que o Método II de purificação, constitui uma alternativa tecnológica eficiente, viável e simples para a remoção dos ácidos orgânicos e dos flavonóides presentes no extrato bruto dos frutos imaturos da erva-mate.

Uma visualização direta dos produtos obtidos pelos Métodos de purificação I e II, está apresentado na Figura 36.

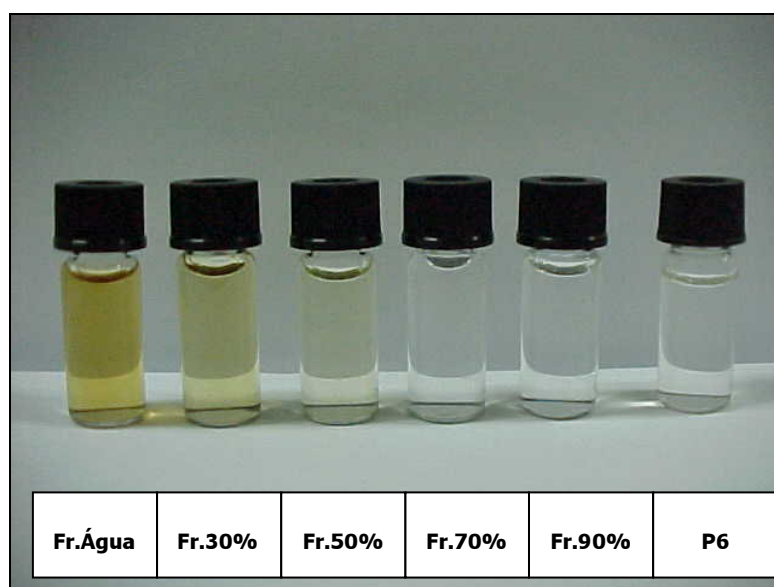


Figura 36. Comparação visual dos produtos purificados obtidos pelos Métodos I e II.

Através da coloração das respectivas frações pode-se observar que na etapa inicial do fracionamento, ou seja, a eluição com solventes de maior polaridade, houve a retirada de quase a totalidade dos compostos corados presentes no EXL, como constatado pela coloração da Fr água e da Fr. 30. A seguir, com a diminuição da polaridade dos eluentes, nota-se uma significativa diminuição da coloração das frações à ausência total de cor como demonstrado pelas frações 50, 70 e 90.

Pela ausência de cor do extrato P6, pôde-se constatar, também, uma eliminação praticamente total dos compostos corados, o que confirma a eficácia deste método de purificação do EXL dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*.

Os métodos I e II, portanto, se mostraram eficazes quanto a remoção dos compostos polifenólicos, produzindo tanto frações como um produto purificado rico

em saponinas. A eficiência destes métodos na purificação do EXL foi comprovada pelos perfis cromatográficos por CCD e CLAE, análise espectrofotométrica, bem como pela coloração dos produtos purificados.

O desenvolvimento destes dois processos de purificação para o extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, oferece uma alternativa aos processos de separação líquido-líquido, ainda amplamente empregado.

3.5. REFERÊNCIAS

ATHAYDE, M. L. – **Saponinas e Triterpenos em algumas espécies do gênero *Ilex***. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 1993. Dissertação de Mestrado.

ATHAYDE, M. L. **Metilxantinas e Saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A.St. Hil.; Triterpenos e saponinas em outras espécies do Gênero *Ilex***. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2000. Tese de Doutorado.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

BROWN, G. H.; SALLEE, E. M. **Química Quantitativa**. Editorial Reverte S.A., 1967. p. 544-551.

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1996. Dissertação de Mestrado.

CHOI, J.; HUH, K.; SUK-HWAN K. Antinociceptive and anti-rheumatoid of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 199-204, 2002.

FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C.- **Erva mate, biologia e cultura no cone Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade (UFRGS), 1995. P. 251 - 256.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1989. Dissertação de Mestrado.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. R. Choleric effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2-3, p. 291-294, 2001.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins – Chemistry and Pharmacology of natural Products**. Cambridge: University, 1995.

KAUFFMANN, C. **Constituição química e avaliação da atividade imunoadjuvante de *Quillaja brasiliensis***. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2002. Dissertação de Mestrado.

KRAEMER, K. H. ***Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate): Distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 1997. Tese de Doutorado.

LARINA, L.; CHO, B. G.; TEM, L.; PARK, H. Isolation of Saponin-free Fraction from Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and its Effects on the function of Neutrophils. **Korean journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 6, p. 986-991, 2001.

MARCIANI, D. J.; PATHAK, A. K.; REYNOLDS, R. C. Altered immunomodulating and toxicological properties of degraded *Quillaja saponaria* Molina saponins. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 813-818, 2001.

MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of temperature, Salt and pH on Solution Properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 45, p. 1587 -1595, 1997.

MONTANHA, J. A. **Estudo químico e Biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A St. Hil. – Aquifoliaceae**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1990. Dissertação de mestrado.

NAVARRO, P.; GINER, R. M., RECIO, M. C. *et al.*. *In vivo* anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. **Life Sciences**, v. 68, p. 1199-1206, 2001.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 147-162, 2002.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 3 ed. Livros Técnicos e Científicos, 1981. p. 227-237.

ORTEGA, G. G.; NETZ, P.A. **Fundamentos de Físico-Química – Uma abordagem conceitual para as Ciências Farmacêuticas**. Ed. Artmed, 2002.

OSBOURN, A. E. – Saponins in Cereals. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1- 4, 2003.

PASCUAL. M. E.; CARRETERO, M. E.; SLOWING, K. V. & VILLAR, A. Simplified screening by TLC of Plant Drugs. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 139-143, 2002.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 2004. Dissertação de Mestrado.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. **Saponinas. In: Farmacognosia – Da planta ao Medicamento**. Simões, C.M.O.; Schenkel, E. P.; Gossmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. Porto Alegre: Editora da Universidade (UFRGS), 2000. Cap.27. P. 597-622.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Org) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003. Cap. 27, p.711-740.

SUNG, J. H.; CHAE, H. J.; KIM, E. Y. Development of Separation Method of Ginseng Saponins using Ion Exchange Resin. **Chromatography**, v. 21, n. 3, p. 203 – 208, 2000.

VERZA, S. G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação do teor de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. UFRGS, 2006. Dissertação de Mestrado.

WOLF, W. J. & THOMAS, B. W. Ion-exchange chromatography of soybean saponins. **Journal of Chromatography**, v. 56, p. 281-293, 1971.

Capítulo 4

Caracterização das propriedades físico-químicas e avaliação da atividade espumógena das saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

4.1. INTRODUÇÃO

O interesse na busca de alternativas para a substituição de tensoativos derivados do petróleo tem aumentado a cada ano, tendo em vista o inevitável aumento nos custos e a previsão de escassez para os produtos de origem petroquímica. Neste sentido, a necessidade de tensoativos derivados de fontes naturais renováveis tornou-se crescente. A busca tem-se dirigido para a síntese de produtos obtidos de origem natural, contendo, como parte hidrófoba do tensoativo, os óleos de palma, amêndoas e amendoim, e como opções para a parte hidrofílica, carboidratos como a glicose do amido do milho, a sacarose da cana de açúcar e a lactose do leite (DRUMMOND e WELLS, 1998).

Deste modo, nos últimos anos a indústria química tem-se voltado à síntese de tensoativos não-iônicos contendo açúcares. Estes tensoativos pertencem a uma classe relativamente nova de compostos com atividade superficial. Eles são atóxicos e biodegradáveis, o que é especialmente desejável do ponto de vista ambiental. Além disso, possuem boas propriedades superficiais o que os fazem apropriados para emprego no processamento de alimentos, detergentes, cosméticos, na agricultura e formulações farmacêuticas (COPPOLA *et al.*, 2002; SARNTHEIN-GRAF e LA MESA, 2004; JAREK, *et al.*, 2006).

Neste sentido, estudos orientados em aperfeiçoar o comportamento de tensoativos obtidos de origem natural demonstram que as saponinas são extremamente promissoras (MITRA e DUNGAN, 1997; GARTI, 1999; KAUFFMANN, 2002; OSBOURN, 2003).

As saponinas se destacam pelas suas propriedades tensoativas e, devido a sua elevada atividade superficial, produzem uma espuma abundante e persistente em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações e, à diferença da produzida pelos sabões, sua espuma é estável na presença de ácidos minerais diluídos, sendo, esta atividade espumógena, a propriedade a mais característica deste grupo de compostos (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995).

Em quase todas as áreas nas quais sistemas contendo tensoativos são usados, a atividade espumógena exerce uma importante influência. As espumas são sistemas dispersos ar-líquido, e pelo seu caráter anfifílico, possuem grande afinidade por superfícies de diferentes materiais, o que está associado a várias das suas aplicações industriais como na flotação mineral, processamento de alimentos, processamento de têxteis, produtos para o cuidado pessoal, extintores de incêndio, entre outros (HILGENFELDT *et al.*, 2001; GRANER, 2002; PANDEY *et al.*, 2003). O conhecimento das propriedades físico-químicas das espumas, particularmente os fatores os quais influenciam a sua estabilidade, é muito importante na otimização da eficiência operacional de um sistema (KARAKASHEV e MANEV, 2001). Neste sentido, a partir do ponto de vista da física e da química dos colóides, parâmetros como tensão superficial, elasticidade superficial, viscosidade superficial, entre outros, são essenciais para o ajuste das propriedades da espuma desejada (NGUYEN *et al.*, 2003; TCHOUKOV, *et al.*, 2004; HARVEY *et al.*, 2005; NEETHLING, *et al.*, 2005).

Apesar das saponinas serem amplamente estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, há poucos relatos na literatura sobre as propriedades coloidais destes tensoativos, estando ainda pouco caracterizadas (VOCHTEN *et al.*, 1967; MITRA E DUNGAN, 1997; MITRA e DUNGAN, 2001).

Pelos estudos já realizados com os frutos de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000; TAKETA, 2001; PAVEI, 2004), somados às avaliações realizadas neste trabalho, pôde-se observar que os frutos imaturos apresentam um alto teor de saponinas, sendo a maioria muito polar.

Nesse contexto, este Capítulo tem como objetivo avaliar as propriedades tensoativas e espumógenas das saponinas presentes nos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, visando estabelecer parâmetros físico-químicos e propriedades de uso tecnológico.

As propriedades tensoativas serão estudadas empregando técnicas clássicas, que incluem a caracterização mediante isothermas de abaixamento da tensão superficial, concentração micelar crítica e outros parâmetros micelares, como a concentração de excesso de superfície e a área superficial ocupada pelo grupo polar do tensoativo. Estes parâmetros serão também avaliados frente à presença de eletrólitos. Para a

avaliação do perfil espumógeno das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* quanto a sua capacidade espumógena e de parâmetros físico-químicos associados à espuma, foram desenhados ou adaptados da literatura alguns aparelhos, a fim de estabelecer técnicas padronizadas, reproduzíveis e passíveis de documentação fotográfica.

4.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As saponinas destacam-se pelas suas propriedades tensoativas e, devido a sua elevada atividade superficial, produzem uma espuma abundante e persistente em meio aquoso mesmo em baixas concentrações e, à diferença da produzida pelos sabões, sua espuma é estável à presença de ácidos minerais diluídos, sendo esta atividade espumógena, a mais característica deste grupo de compostos (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995; SCHENKEL, *et al.*, 2003).

As *saponinas* destacam-se por sua atividade superficial, sendo esta propriedade que as diferencia de outros glicosídeos naturais (SPARG *et al.*, 2004).

Pelo seu caráter anfifílico, os tensoativos e, conseqüentemente, as saponinas em solução aquosa tendem a se localizar preferencialmente na interface líquido-vapor, com o grupo polar dirigido para a fase aquosa e o grupo apolar para a fase vapor. Este fenômeno de adsorção superficial dos monômeros dos tensoativos tem, como finalidade, reduzir a energia livre total do sistema, através da substituição das moléculas de água presentes na superfície pelo grupo hidrofóbico do tensoativo (FLORENCE, 2003). Neste sentido, como as forças atrativas intermoleculares entre esses grupos e as moléculas de água, ou mutuamente entre esses grupos, são menores que as existentes entre as moléculas de água, o poder de contração da superfície será reduzido e, dessa forma, também a tensão superficial (AULTON, 2005). A tensão superficial pode ser interpretada, então, como a força por unidade de comprimento que se opõe ao aumento da superfície, ou como a variação da energia livre do sistema devido ao aumento de área (NETZ e ORTEGA, 2002) Portanto, qualquer tentativa em expandir a superfície deverá envolver um aumento da energia livre (FLORENCE, 2003).

A interpretação via energia livre permite entender a interação entre o líquido e o ar. Assim, a aspersão de líquidos com elevada tensão superficial levará à formação de gotículas maiores, em comparação com líquidos com menor tensão superficial. Isto se deve ao fato, dos líquidos mais apolares apresentarem uma maior afinidade pelo ar do que a água, razão pela qual, o volume das gotas dos mesmos é menor do que o volume de uma gota d'água (NETZ e ORTEGA, 2002; STANLEY, 2001). Portanto, quando a interface separando duas fases é curva, a pressão será sempre maior na fase contida no interior de uma superfície convexa. Esta relação entre as pressões depende da tensão superficial e do raio de curvatura da superfície, sendo expressa através da equação de Young-Laplace:

$$\boxed{\Delta P = 2\gamma / r} \quad (\text{eq. 4})$$

onde, ΔP são as pressões nas duas fases, γ é a tensão superficial e r é o raio de curvatura.

Os dados da medida da tensão superficial na interface ar-água, como uma função da concentração do tensoativo, podem ser usados para estimar o *excesso de superfície* (Γ) de um tensoativo, ou seja, a sua densidade molar na interface. Este parâmetro quando positivo, indica que a concentração do soluto por unidade de área na região da interface é superior à presente no interior do líquido. Da mesma forma, um excesso de superfície negativo, traduz uma concentração do soluto na área interfacial inferior ao meio líquido (STANLEY, 2001; NETZ e ORTEGA, 2002). A partir da densidade de superfície, pode-se estimar a área superficial ocupada pelo seu grupo polar (FLORENCE, 2003).

Quando a molécula de uma substância tensoativa se dissolve em água, há o surgimento de interações desfavoráveis entre o seu grupo apolar e o solvente aquoso, ou seja, se produz um aumento da energia livre do sistema. A variação de energia livre depende das variações da entropia, ΔS , e da entalpia, ΔH , relacionadas por meio da expressão $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Assim, as mudanças na entalpia e na entropia que acompanham este processo, se devem ao alto grau de estruturação da água devido às

ligações hidrogênio entre suas moléculas. Deste modo, a presença de grupos apolares no meio aquoso, faz com que as moléculas de água formem uma estrutura adicional ao redor da região hidrofóbica, levando a um grande aumento na energia livre do sistema. As moléculas do tensoativo, então, passam a concentrarem-se nas interfaces, de forma que seus grupos hidrofóbicos estejam direcionados para fora da água e assim, minimizar a energia livre da solução. Essa tendência de materiais hidrofóbicos serem removidos da água como resultado da forte atração das moléculas de água entre si, é chamado de *efeito hidrofóbico*.

A concentração de saturação na superfície é alcançada, quando as moléculas estão estreitamente empacotadas mediante fortes interações laterais entre os grupos hidrofóbicos (HUNTER, 2002). Assim, perante um aumento da concentração de tensoativo, os monômeros começam a associarem-se no interior da solução em dímeros, trímeros e tetrâmeros, como uma forma alternativa de *proteger* os grupos hidrofóbicos do meio aquoso (PIRES, 2002). Um posterior aumento da concentração do tensoativo, produz acréscimos da energia livre do sistema, que tende espontaneamente a diminuir através da formação de agregados moleculares de dimensões coloidais, chamados de *micelas* (AULTON, 2005).

A estrutura micelar em meio aquoso é composta por um núcleo, formado pelos grupos hidrofóbicos do tensoativo, os quais estão voltados para o interior da micela, enquanto os grupos hidrofílicos se encontram direcionados para a água. Pela agregação das moléculas tensoativas, elas podem experimentar uma repulsão eletrostática de outras moléculas do tensoativo com carga similar, no caso de tensoativos com grupos polares iônicos. Estas forças aumentam a energia livre do sistema e se opõe à micelização. Assim, a formação da micela depende do balanço das forças entre os fatores que favorecem a micelização (van der Waals e forças hidrofóbicas) e àquelas que se opõe, como a energia cinética das moléculas e a repulsão eletrostática (PATIST *et al.*, 2002).

O efeito hidrofóbico, será portanto, equivalente à remoção parcial do hidrocarboneto do ambiente aquoso, bem como a uma conseqüente perda da estruturação da água que cerca as moléculas hidrofóbicas. O aumento na entropia e a diminuição da energia livre (ΔG negativo) que acompanham a perda desta estrutura

fazem com que o efeito hidrofóbico seja um processo energeticamente favorável (FLORENCE, 2003).

A razão primária, portanto, para a formação de micelas é a obtenção de um estado mínimo de energia livre. Para um sistema micelar à temperatura normal, o termo entropia, é o mais importante, constituindo aproximadamente 90 a 95% do valor de ΔG (AULTON, 2005).

Uma explicação alternativa para a diminuição de energia livre enfatiza o aumento dos graus de liberdade internos dos grupos hidrofóbicos, que ocorre quando esses grupos são transferidos do ambiente aquoso para o interior da micela. Tem-se sugerido que o aumento da mobilidade dos grupos hidrofóbicos e, certamente, sua atração mútua, constituem o principal fator hidrofóbico na micelização (AULTON, 2005). Uma vez que o grupo polar permanece circundado pela água, sua contribuição para a energia da micelização é muito menor, mas seu papel é essencial para o tamanho e a forma da estrutura do agregado (HUNTER, 2002).

A concentração mínima de tensoativo necessária para a formação das micelas é denominada de **concentração micelar crítica** (CMC). O início da formação dos agregados moleculares pode ser detectado através de uma mudança brusca nas propriedades físicas das soluções tensoativas nas proximidades da concentração micelar crítica como a tensão superficial, pressão osmótica condutividade elétrica, índice de refração, solubilidade (como uma função da temperatura), intensidade de espalhamento de luz, entre outras, quando registradas graficamente como uma função da concentração de tensoativo, sendo tais propriedades, também empregadas para determinar a CMC (PIRES, 2002; FLORENCE, 2002).

Há um estado de equilíbrio dinâmico entre as micelas formadas e os monômeros em solução, onde as velocidades de adsorção e desorção se equivalem (PATIST *et al.*, 2002; FLORENCE, 2003). A passagem das moléculas de tensoativo da solução para a micela e vice-versa requer tempos da ordem de 1-10 μ s. A entrada ou saída de um monômero ocorre, presumivelmente, a partir de uma série de passos de difusão (por exemplo, um grupo metileno a cada vez). A superfície deve, por esta razão, estar desordenada numa escala de tempo de nanossegundos (HUNTER, 2002). A

concentração de monômeros e micelas muda com as condições de equilíbrio, como pressão, temperatura, concentração de tensoativo ou de sal (PATIST *et al.*, 2002).

Na micela em meio aquoso, a parte hidrofóbica está localizada no centro, sendo, rodeada por uma camada concêntrica de grupos hidrofílicos que minimizam sua interação com a água, junto a $(1-\alpha) N$ contra-íons. Esta região compacta é chamada de **camada de Stern**, cuja distância está a cerca de um raio de um íon hidratado da superfície. Para a maioria das micelas iônicas, o grau de ionização, α , está entre 0,2 e 0,3; isto é, 70 a 80% dos contra-íons podem ser considerados ligados à estrutura micelar, sendo as forças repulsivas laterais entre estes grupos fortemente reduzidas (FLORENCE, 2003; AULTON, 2005). A superfície externa da camada de Stern é a **superfície limitante da micela**. Assim, o centro e a camada de Stern constituem juntos a chamada **micela cinética**. Circundando a camada de Stern, há uma camada difusa, a dupla camada elétrica de Gouy-Chapman, que contém o restante dos contra-íons solvatados necessários para neutralizar as cargas na micela cinética.

Além dos íons na camada de Stern, uma certa quantidade de solvente também estará ligada aos íons e à superfície carregada. Esta camada solvatante é mantida junto à superfície, e as bordas dessa camada, chamada de superfície ou **plano de cisalhamento**, representa o limite do movimento relativo entre o material agregado e o líquido. O potencial no plano de cisalhamento é chamado de **potencial zeta** ou eletrocinético (AULTON, 2005). A variação do potencial ocorre de modo linear desde ψ_0 (potencial superficial) até ψ_δ (potencial de Stern), decaindo exponencialmente até zero na dupla camada difusa. A distância sobre a qual isto ocorre é $1/k$, chamada de comprimento de Debye-Huckel ou espessura da dupla camada elétrica. O parâmetro k depende da concentração de eletrólito no meio aquoso, sendo que quanto maior a concentração de eletrólito, maior o valor de k e, conseqüentemente, menor o valor de $1/k$, ou seja, ocorre uma compressão da dupla camada elétrica. Deste modo, uma vez que o potencial superficial permanece constante, o potencial zeta irá diminuir (FLORENCE, 2003; AULTON, 2005).

A partir destas observações surgiu a teoria da dupla camada elétrica, também conhecida como teoria DLVO, a qual sugere que a estabilidade de uma partícula em solução é dependente da sua energia potencial total, sendo a estabilidade determinada

principalmente pela soma das forças atrativas de van der Waals e das forças repulsivas da dupla camada elétrica. Entretanto, para manter a estabilidade do sistema coloidal, as forças repulsivas devem ser dominantes, as quais ocorrem por um mecanismo estérico ou eletrostático, o qual tem a vantagem de estabilizar um sistema, pela simples alteração da concentração de íons ao sistema. Neste sentido, o potencial zeta é um bom índice da magnitude da interação entre as partículas coloidais e é comumente usado para avaliar a estabilidade destes sistemas. Entre as técnicas empregadas para medir o potencial zeta, a eletroforese é a de mais fácil utilização e a que possui maior aplicabilidade farmacêutica (AULTON, 2005).

As micelas não-iônicas possuem um centro hidrofóbico cercado por uma camada de grupos polares, denominada camada paliçada. As moléculas de água estão ligadas por ligações hidrogênio aos grupos polares, sendo esta camada capaz de conter um grande número de moléculas de água. As micelas destes tensoativos, como conseqüência, tendem a ser altamente hidratadas. Esta superfície externa da camada paliçada forma a superfície limitante, isto é, as moléculas hidratantes formam parte da micela cinética (AULTON, 2005). Por esta razão, em alguns casos, os tensoativos não-iônicos formam, em geral, micelas maiores que as suas contrapartes iônicas. Isto é atribuído à inexistência de trabalho elétrico envolvido no processo de micelização e, como conseqüência de seu tamanho maior, as micelas não-iônicas são muitas vezes assimétricas (FLORENCE, 2003).

Entre os fatores que afetam a CMC e o tamanho micelar estão: a estrutura do grupo hidrofóbico, a natureza do grupo hidrofílico, a natureza do contra-íon, a presença de eletrólitos e a temperatura (FLORENCE, 2003; AULTON, 2005).

O *número de agregação*, representa o número de moléculas do tensoativo na micela, o qual tende a aumentar com o aumento do comprimento do grupo hidrofóbico e diminuir com o aumento do tamanho do grupo hidrofílico. Portanto, os fatores que aumentam o número de agregação tendem a diminuir a CMC. (STANLEY, 2001; PATIST, *et al.*, 2002).

Em tensoativos que possuem a mesma cadeia hidrofóbica, a variação da natureza do grupo hidrofílico não provoca grandes alterações no valor da CMC.

Entretanto, a natureza do grupo hidrofílico é um fator importante na determinação do tamanho micelar e na reatividade de reações catalisadas por soluções micelares aquosas (MANIASSO, 2001; PIRES, 2002). Assim, tensoativos iônicos apresentam uma CMC superior aos tensoativos não-iônicos, como também um menor número de agregação, devido a repulsão entre os grupos ionizados, os quais impedem um empacotamento mais estreito na micela (STANLEY, 2001).

O contra-íon associado ao grupo carregado de tensoativos iônicos também exerce um efeito significativo nas propriedades micelares. Para sistemas aquosos, o aumento da ligação dos contra-íons ao tensoativo, causa uma diminuição na CMC e um aumento no número de agregação (PANDEY, *et al.*, 2003). O efeito é explicado em termos da redução na magnitude das forças de repulsão entre os grupos polares do tensoativo, reduzindo, deste modo, o trabalho necessário para a sua formação (AULTON, 2005). A extensão da ligação dos contra-íons aumenta com um aumento na polarizabilidade e valência dos contra-íons e diminui com um aumento no seu raio de hidratação (PANDEY, *et al.*, 2003). Para íons de mesma valência, a série liotrópica exerce um papel fundamental na explicação de pequenas variações (a série liotrópica ordena os íons de mesma valência, de acordo com o seu tamanho) (NETZ e ORTEGA, 2002; HUNTER, 2002).

Para os tensoativos não-iônicos, a concentração de eletrólitos necessária para produzir efeitos significativos é comparativamente muito maior e a discussão de cada comportamento introduz as noções de “*salting in*” e “*salting out*”, ou seja, da competição entre o tensoativo (sobretudo o grupo polar) e o eletrólito para associarem-se com a água. Assim, uma dessolvatação do monômero pelo eletrólito (efeito *salting out*), a micelização é termodinamicamente favorecida e a CMC é reduzida. A situação inversa se aplica no caso de um efeito “*salting in*” (HUNTER, 2002; AULTON, 2005).

A temperatura, usualmente, exerce uma fraca influência na alteração da CMC de um tensoativo. Com o aumento da temperatura do meio, o valor da CMC para tensoativos não-iônicos, normalmente diminui, enquanto para os tensoativos iônicos ocorre um aumento. Por outro lado, a temperatura exerce uma importante influência no tamanho das micelas, as quais normalmente tornam-se maiores com o aumento da

temperatura. Este efeito, pode ser atribuído a uma mudança na forma e na hidratação da micela (MITRA e DUNGAN, 1997).

As possibilidades de arranjos moleculares dos tensoativos variam, desde soluções molecularmente dispersas, à fases cristalinas altamente ordenadas. Entre estes extremos, há uma variedade de fases, cuja natureza depende intimamente da estrutura química do tensoativo, da composição total da fase contínua e das condições do sistema, como temperatura, pH, presença de co-solutos, eletrólitos, entre outros fatores, os quais podem alterar o tamanho, forma, número de agregação e a estabilidade das micelas (PATIST *et al.*, 2002; FLORENCE, 2003; VASILCSCU *et al.*, 2004). Assim, a estrutura de uma micela pode variar de esférica para bastão ou na forma de disco para lamelar à fases cristalina líquidas ou mesofases à altas concentrações de tensoativos (PATIST *et al.*, 2002).

A *estrutura da micela* depende da temperatura e concentração de tensoativo, como também das características estruturais destes, como a presença de grupos polares carregados (carboxilato, sulfato ou amônio quaternário), zwitteriônicos ou grupos hidrofílicos volumosos (polioxietileno, amino óxido ou resíduo açúcar), capazes de participar significativamente nas ligações de hidrogênio com a água, bem como nas interações dipolares com a mesma. A estrutura também depende da natureza do grupo apolar, como do número de carbonos na cadeia hidrocarbonada, presença de ramificações, duplas ligações ou anéis aromáticos (HUNTER, 2002; FLORENCE, 2003).

Vários modelos foram propostos na tentativa de explicar as propriedades e características das micelas. Tendo como exemplo micelas de laurilsulfato de sódio, admiti-se que a penetração de água alcança no máximo os dois primeiros grupos metilenos mais próximos ao grupo hidrofílico. Este modelo, leva em consideração a mobilidade das cadeias carbônicas, sendo possível, dentro de um intervalo de tempo, localizar segmentos dos monômeros (até mesmo o grupo metila terminal da cadeia) na superfície micelar. Isto explica o contato hidrocarboneto-água, o que motivou a teoria de uma estrutura bastante porosa para as micelas (HUNTER, 2002).

O modelo mais aceito foi discutido por GRUEN (1985), e é representado para uma micela de dodecilsulfato de sódio (Figura 37).

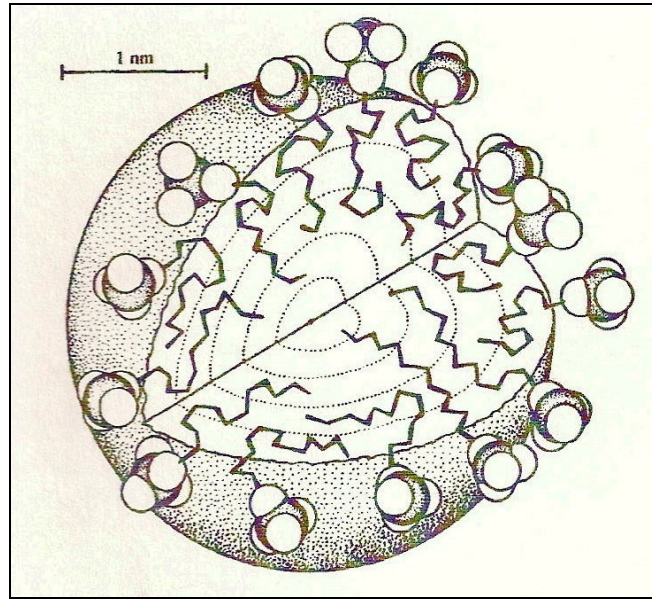


Figura 37. Modelo da micela esférica de dodecilsulfato de sódio (GRUEN, 1985).

As características das micelas, de acordo com esse modelo, são:

- i) na média, todos os grupos apolares do tensoativo na micela estão no núcleo micelar;
- ii) os grupos polares iônicos e a água, são quase totalmente excluídos do núcleo micelar;
- iii) os grupos hidrofóbicos apresentam desordem conformacional (estado “líquido”), e preenchem o núcleo micelar com densidade aproximadamente igual à dos respectivos *n*-alcanos líquidos;
- iv) a interface água-grupos hidrofóbicos é fina, de apenas alguns Å;
- v) a camada contendo os grupos polares é pouco rugosa.

Embora, atualmente, tem-se preferido à descrição “como disco” uma vez que o peso da evidência do transporte e propriedades de equilíbrio sugere que as estruturas micelares sejam melhor descritas como esferóides oblatos. Porém, esta visão não é universalmente aceita, devendo-se levar em conta o fato de que as forças que controlam a estrutura micelar são delicadamente balanceadas, podendo ocorrer facilmente distorções da forma (devido aos processos de cisalhamento ou flutuações) (HUNTER, 2002).

Desse modo, o modelo proposto por Gruen é capaz de explicar a maior parte dos fenômenos conhecidos sobre as micelas em meio aquoso. Sua estrutura bem definida e regular faz com que medidas de parâmetros micelares, como raio micelar, possam ser determinadas com razoável precisão e, graças às suas características dinâmicas, explica vários resultados de espalhamento de nêutrons a baixo ângulo e de ressonância magnética nuclear de próton (HUNTER, 2002).

A estrutura e estabilidade das micelas influenciam significativamente as propriedades dinâmicas do sistema. Neste sentido, considerando o equilíbrio dinâmico da estrutura micelar, as quais estão continuamente se desintegrando e se reestruturando, tem-se proposto a existência de dois processos de relaxação envolvido nas soluções micelares. O primeiro é um processo de relaxação rápida referido como τ_1 (geralmente na ordem de microsegundos) o qual é associado com a rápida troca dos monômeros entre as micelas e o meio circundante. O segundo tempo de relaxação, τ_2 considerado lento (na ordem de milissegundos), é atribuído ao processo de formação e dissolução das micelas, isto é, o tempo de vida da micela. Estes dois tempos de relaxação, podem ser usados para calcular dois importantes parâmetros de uma solução micelar: (a) o tempo de residência de uma molécula do tensoativo em uma micela e (b) o tempo de vida médio ou a estabilidade de uma micela (PATIST, *et al.*, 2002).

Os tempos de relaxação micelar ou de quebra das micelas são importantes em vários processos tecnológicos que envolvem um aumento na área interfacial. Neste sentido, tem-se constatados uma forte correlação de τ_2 com os processos dinâmicos como a espumabilidade, umectância, volume da bolha, tamanho da gota de emulsão e velocidade de solubilização micelar (PATIST, *et al.*, 2002). Assim, durante o processo de formação da espuma, por exemplo, os sistemas com menor tensão superficial, são capazes de produzir menores áreas superficiais por unidade de área, sendo o aumento de área interfacial estabilizado pela formação de um filme de moléculas de tensoativo adsorvido na nova interface. Há dois fatores que respondem por esse fenômeno, um relacionado com o tempo requerido para a expansão da área interfacial e que tem caráter competitivo entre espécies químicas diferentes, e um outro relacionado com o transporte difusional dos monômeros do tensoativo e a capacidade das micelas se romperem, assegurando o fluxo necessário para estabilizar a nova interface ar/água

originada durante a formação da espuma. Neste último caso, quando os monômeros difundem para a nova interface, a condição de equilíbrio entre monômeros e micelas é rompido. Este desequilíbrio leva à desorganização das micelas, cedendo monômeros para a interface. Assim, micelas muito estáveis não rompem rápido o suficiente para aumentar o fluxo necessário de monômeros para estabilizar as novas interfaces ar/água, resultando em uma alta tensão superficial dinâmica e por esta razão, menor espumabilidade (PATIST, *et al.*, 2002; HARVEY, *et al.*, 2003).

As cinéticas de relaxação micelar, demonstram dependência da temperatura, pressão e concentração, bem como da adição de outras espécies na solução. Estudos demonstram que os valores de τ_1 e τ_2 são bem definidos para cada sistema tensoativo (PATIST *et al.*, 2002).

Para a **caracterização dos agregados moleculares** dos tensoativos em água, vários métodos experimentais têm sido empregados, como a tensiometria, condutometria, potenciometria, calorimetria, ressonância magnética nuclear, espalhamento da luz estático e dinâmico e a polaridade microscópica da região interfacial das micelas em meio aquoso por sondas solvatocrômicas (PIRES, 2002). Entre os vários parâmetros caracterizados estão a CMC, número de agregação (N_{ag}), raio hidrodinâmico (R_h), área ocupada na interface micela-água pelo grupo hidrofílico (σ) e grau de dissociação micelar (α), que informa o quanto os contra-íons se encontram ligados à micela. A estrutura molecular do tensoativo, ou seja, as naturezas dos grupos hidrofílico e hidrofóbico, assim como a dos contra-íons, associados às condições experimentais, como temperatura, pressão e presença de aditivos, influem diretamente no valor de cada um dos parâmetros citados (PIRES, 2002).

O espalhamento de luz dinâmico tem sido particularmente um método adequado para determinar o tamanho de partículas, sua forma e suas interações (HUNTER, 2002). Este método é baseado no deslocamento da frequência da luz laser, quando esta é espalhada por uma partícula em movimento – o chamado deslocamento Doppler. Uma vez que a maioria dos colóides apresenta turbidez bastante baixa, é mais conveniente e preciso medir a luz espalhada a um ângulo (em geral 90°) relativo ao feixe incidente, ao invés de medir a luz transmitida, que pode diferir apenas marginalmente do feixe incidente. Esta técnica mede, portanto, o coeficiente de difusão

do agregado, o qual pode ser relacionado ao tamanho micelar através da equação de Stokes-Einstein (AULTON, 2005).

Medidas de espalhamento de luz dinâmico, também têm sido empregadas para avaliar o tamanho dos agregados micelares das saponinas da quilaia (MITRA e DUNGAN, 1997).

Entre as propriedades características dos tensoativos estão o abaixamento da tensão superficial ou interfacial de um sistema, a propriedades de detergência, de umectância e de formação de espuma. A magnitude destas propriedades varia de acordo com a natureza do tensoativo (LACHMAN, 2003; AULTON, 2005).

Quanto as saponinas, a propriedade tensoativa mais característica deste grupo de compostos é a atividade espumógena (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995).

Do ponto de vista termodinâmico, espumas são sistemas metastáveis, que compreendem bolhas de gás, contendo geralmente ar, dispersas em um volume relativamente pequeno de líquido, usualmente menor que 10% do volume total. Tipicamente, são compostas de *bolhas de gás poliédricas*, separadas por finos filmes líquidos estabilizados por moléculas de tensoativos adsorvidas na interface gás/líquido. Sua unidade estrutural é constituída pelas *bordas de Plateau*, onde três filmes líquidos se encontram, formando um ângulo de 120° e os *vértices* do poliedro, onde quatro bordas de Plateau encontram-se à ângulos de $109,6^\circ$ (Figura 38) (BHAKTA e RUCKEINSTEIN, 1997; PANDEY *et al.*, 2003; HARVEY *et al.*, 2005).

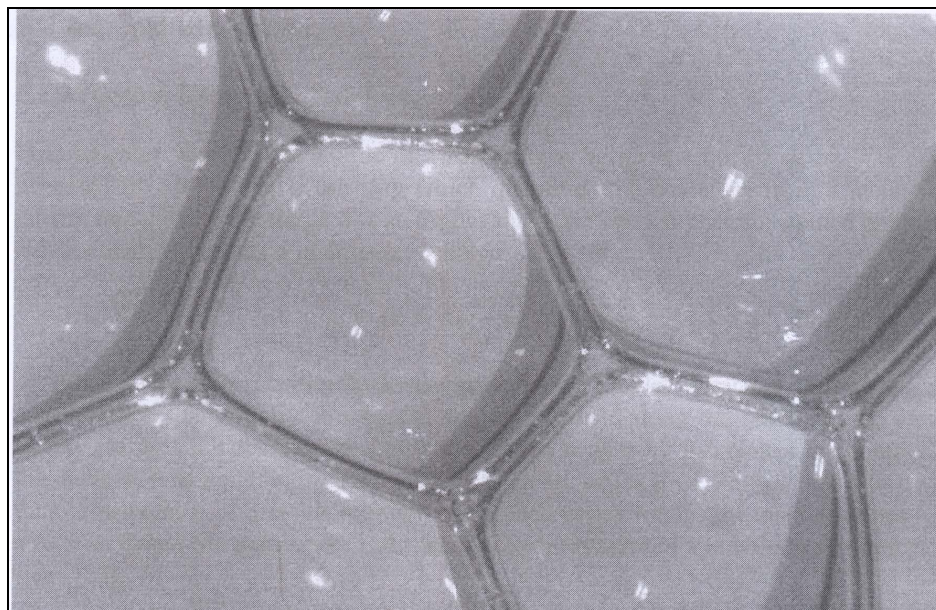


Figura 38. Ilustração bidimensional das bordas de Plateau (GRANER, 2002).

Os filmes líquidos e as bordas de Plateau formam uma rede pela qual, por efeito das forças da gravidade, superficial e de capilaridade, o líquido é drenado para fora da espuma. (HILGENFELDT, *et al.*, 2001; HARVEY, *et al.*, 2005). Este processo pode ser ilustrado através da formação de um filme líquido vertical isolado (Figura 39). A drenagem ocorrerá, inicialmente, através de fluxos de líquido por todo o filme, sob ação da gravidade. Depois de atingida uma espessura de alguns micrômetros, o fluxo gravitacional na parte lamelar do filme passará a se processar com extrema lentidão (mesmo com líquido de baixa viscosidade), e o mecanismo de drenagem predominante a seguir envolverá a remoção do líquido da região lamelar central e a formação de colunas relativamente largas de líquido escoando pelas regiões adjacentes, conhecidas como *bordas de Plateau*. Como resultado da drenagem, o filme terá uma maior espessura na parte inferior do que na parte superior. Por esta razão, aparecerão as cores espectrais em consequência da interferência entre a luz refletida entre as superfícies do filme. Assim, a medida que a drenagem prossegue, essas bandas coloridas se moverão para baixo, aumentando o espaçamento entre elas até se desenvolver um filme prateado e por fim preto, que por ser suficientemente fino não haverá interferência construtiva para todos os comprimentos de onda visíveis entre a luz refletida pelas superfícies do filme. A transferência do líquido da parte central da região lamelar para

as bordas de Plateau é governada pela diferença de pressão do líquido nessas duas regiões (SHAW, 1975; HUNTER, 2002).

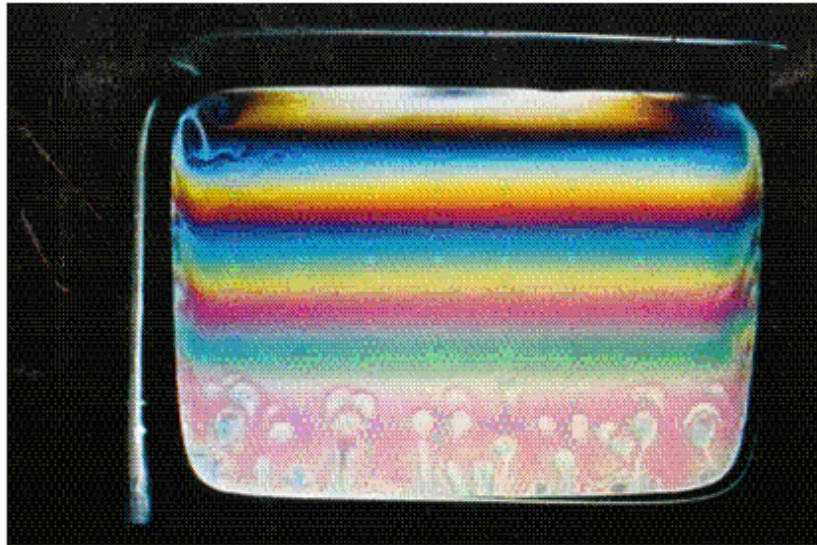


Figura 39. Filme vertical líquido (NIERSTRASZ e FRENS, 1999).

A espessura do filme resulta, portanto, do equilíbrio entre as forças externas e as interações entre as superfícies do filme, as quais causam uma pressão adicional no filme, conhecida como *pressão de disjunção* (MISHRA *et al.*, 2005). Em muitos casos, as interações no filme pode ser descritas por duas forças, a repulsão da dupla camada elétrica nas superfícies dos filmes e as forças de atração de van der Waals (Teoria DLVO). Na presença de repulsão da dupla camada, a espessura de equilíbrio dos filmes diminui de várias centenas de nanômetros para uns poucos nanômetros com o aumento da concentração de eletrólitos. Geralmente, filmes com uma espessura abaixo de 50 nm, que aparecem como cinza ou preto quando observados sob a luz refletida, são chamados *filmes pretos comuns (FPC)* (Figura 40). Em concentrações muito altas de sal (na ordem de 10^{-1} mol/L), as duas camadas elétricas estão praticamente neutralizadas e a atração de van der Waals é a única interação de longa distância entre as interfaces do filme. Sob estas condições, os filmes líquidos reduzem a sua espessura até a repulsão estérica entre os grupos polares do tensoativo nas interfaces, o que ocorre à uma espessura de filme em torno de 3-6 nm, dependendo das dimensões das moléculas do tensoativo. Os filmes que atingem este estado de equilíbrio são denominados *filmes pretos de Newton (FPN)* (MISHRA *et al.*, 2005).

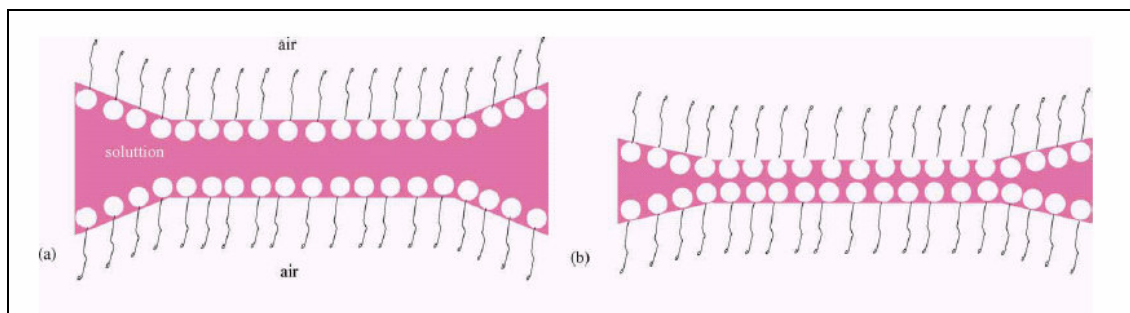


Figura 40. Representação esquemática: (a) Filme preto comum (FPC); (b) Filme preto de Newton (FPN) (MISHRA *et al.*, 2005).

Uma pressão positiva estabiliza a espuma, enquanto que uma pressão negativa desestabilizá-a. Em geral, a pressão de disjunção positiva surge a partir da força de repulsão da dupla camada, enquanto a pressão negativa das forças atrativas de van der Waals e possivelmente da interação hidrofóbica (WANG e YOON, 2006).

A durabilidade dos filmes pretos exercem, portanto, um decisivo papel no tempo de vida da espuma (KARAKASHEV E MANEV, 2001).

A estabilidade de uma espuma, portanto, pode ser influenciada por muitos fatores, mas está primariamente ligada à drenagem do líquido da espuma, a qual é uma função da viscosidade de cisalhamento superficial e, posteriormente, pelo processo de ruptura dos filmes líquidos que é uma função de outras propriedades interfaciais, como a propriedade de dilatação interfacial (TAMURA *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 2003; HARVEY *et al.*, 2005).

A *viscosidade de cisalhamento superficial* resulta da interação entre as moléculas adjacentes do tensoativo na superfície do filme com a fase lamelar líquida. Deste modo, uma alta viscosidade superficial significa uma forte interação entre as moléculas tensoativas com a água, o que reflete em um mais lento processo de drenagem nas espumas (PANDEY *et al.*, 2003).

A *elasticidade superficial de Gibbs-Marangoni* é uma propriedade de dilatação interfacial a qual está diretamente relacionada no controle de ruptura dos filmes líquidos, com substancial influência do tempo de vida da espuma (HARVEY, *et al.*, 2005). Este é, portanto, um efeito de estabilização importante nas espumas. Assim, se um filme for submetido a um estiramento localizado, como conseqüência de alguma

perturbação externa, o aumento de área resultante será acompanhado por um decréscimo na concentração de excesso de superfície do tensoativo. O resultado é o surgimento de um aumento localizado da tensão superficial (*efeito Gibbs*). Sendo assim, será necessário determinado tempo para que as moléculas do tensoativo sofram difusão até essa região superficial, para restabelecer sua tensão original (*efeito Marangoni*). Como uma ampliação deste efeito, sugeriu-se um mecanismo de transporte superficial, no qual o gradiente de tensão superficial criado pelo afinamento da película faz com que o tensoativo se "espalhe" pela superfície, arrastando consigo uma parte significativa da solução subjacente, opondo-se assim ao processo de afinamento (SHAW, 1975; NIERSTRASZ e FRENS, 1999).

A razão principal para líquidos puros não formarem espumas é a ausência do efeito Gibbs-Marangoni. Com relação a esse efeito, é interessante notar que espumas moderadamente concentradas de sabões, detergentes, entre outros, são em geral menos estáveis que as espumas formadas por soluções mais diluídas. Nas soluções mais concentradas, o aumento de tensão superficial, resultante de um adelgaçamento localizado do filme, é compensado mais rapidamente pela difusão de moléculas de agente tensoativo, proveniente da solução. Em consequência a compensação de variações da película na espuma pelas correspondentes variações na tensão superficial será menos eficiente (SHAW, 1975, NIERSTRASZ e FRENS, 1999).

Portanto, um dos mais importantes fatores que controlam o comportamento espumógeno é o efeito Marangoni, onde a drenagem da água entre as bolhas é retardada a partir da espalhabilidade dos tensoativos nas superfícies das bolhas. Não somente a concentração dos tensoativos e sua velocidade de difusão na interface ar-água influencia a estabilidade da espuma mas também sua habilidade de se ligar às moléculas de água (TAN *et al.*, 2005).

Portanto, o filme entre as bolhas na espuma afinam devido a drenagem ou deformação mecânica. O filme pode ser estabilizado somente pela drenagem lenta do líquido do filme. Isto somente pode ser obtido por compostos que acumulam preferencialmente na interface gás/líquido. Portanto, o tensoativo adicionado, exerce uma importante influência na estabilidade da espuma. Eles se adsorvem na interface ar-líquido, alterando as propriedades interfaciais e resultando em diferentes

comportamentos da drenagem do líquido e ruptura do filme líquido (STEVENSON, 2005; HARVEY *et al.*, 2005).

Outro fator a considerar na estabilidade das espumas é o fenômeno da difusão de gás entre as bolhas. Este fenômeno é causado pela diferença de pressão interna entre as bolhas, a qual depende da permeabilidade do filme superficial aos gases, diferença no tamanho das bolhas, tensão interfacial, propriedades do gás e a fração líquida da espuma ($V_{\text{líquido}}/V_{\text{espuma}}$). De acordo com a teoria da curvatura de superfície de Young-Laplace e assumindo igualdade nas tensões superficiais, a transferência de gás ocorrerá das bolhas menores para as maiores (GANDOLFO e ROSANO, 1997; BLAKA e RUCKENSTEIN, 1997; CERVANTES-MARTINEZ *et al.*, 2005). Deste modo, quando os volumes de ar são iguais, as duas lâminas tornam-se esferas iguais. No entanto, se os volumes de ar são desiguais, as duas lâminas tornam-se esferas de diferentes diâmetros, exercendo uma pressão desigual nos dois volumes de ar. Conseqüentemente, a partição quando sujeita a pressão igual em ambos os lados, não é curva, mas plana; e quando sujeita à pressão desigual, ela é distorcida em um lado, a partição diminui até a pressão produzida pela curvatura côncava contrabalançar a elasticidade do ar (Figura 41) (BERCKMAN, 1941).

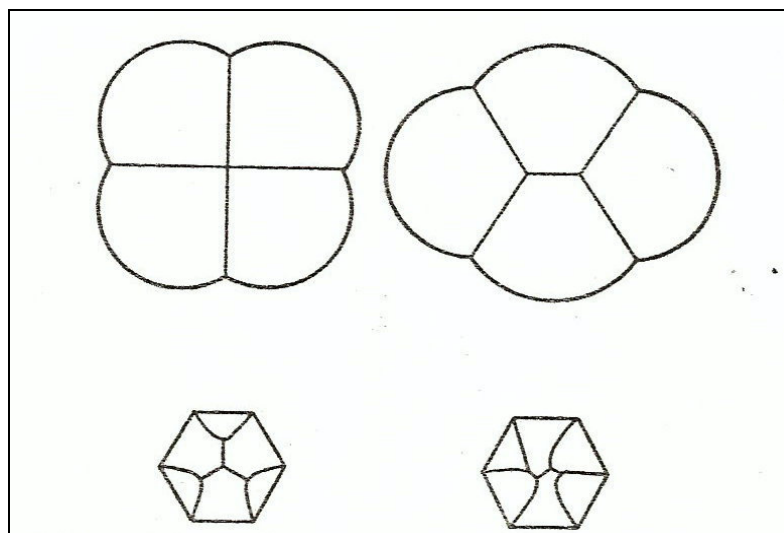


Figura 41. Projeção de agregação das lâminas curvas (BERCKMAN, 1941)

Espumas com gases de alta solubilidade e difusividade coalescem mais rapidamente. Devido a isso, em alguns casos o CO₂ tem sido substituído por gases menos solúveis, como o N₂ (HILGENFELDT *et al.*, 2001).

A presença de componentes voláteis e a diferença de temperatura entre o gás e a fase líquida (altas temperaturas aumentam a pressão nos canais de Gibbs-Plateau) também desfavorecem a estabilidade da espuma (VARDAR-SUKAN, 1998). A ruptura do filme têm, portanto, duas consequências: quando ela ocorre no topo da espuma, a altura da espuma diminui; quando, porém, ela ocorre dentro da espuma, ela causa coalescência das bolhas. Além disso, o tensoativo adsorvido no filme colapsado é liberado dentro do líquido nos canais das bordas de Plateau e move-se para fora da espuma. (BHAKTA e RUCKENSTEIN, 1997).

A estabilidade e tempo de vida das espumas são governadas, portanto, pelas propriedades da sua unidade estrutural (o que inclui os finos filmes líquidos e as bordas de Plateau), assim como pelas propriedades reológicas da interface gás-líquido (que depende do tipo, concentração e distribuição do tensoativo) e pelas energias de interação entre os filmes adjacentes (ANGARSKA *et al.*, 1998; COONS *et al.*, 2005; NEETHLING *et al.*, 2005). Deste modo, dependendo do equilíbrio entre essas forças, um filme pode tornar-se cada vez mais fino até romper-se, ou atingir uma espessura de equilíbrio. Assim, a formação de uma espessura de equilíbrio é característica dos filmes estáveis, enquanto a formação de uma espessura crítica de ruptura caracteriza os os filmes instáveis (Figura 42). Portanto, se o equilíbrio entre as forças de atração de van der Waals, repulsão de duplas camadas elétricas, pressão capilar, etc., favorecer o estabelecimento de uma espessura de equilíbrio, as variações ao acaso na espessura do filme tendem a ser compensadas em todos os casos (SHAW, 1975, TCHOUKOV *et al.*, 2004; NEETHLING e GRASSIA, 2005; WANG e YOON, 2006).

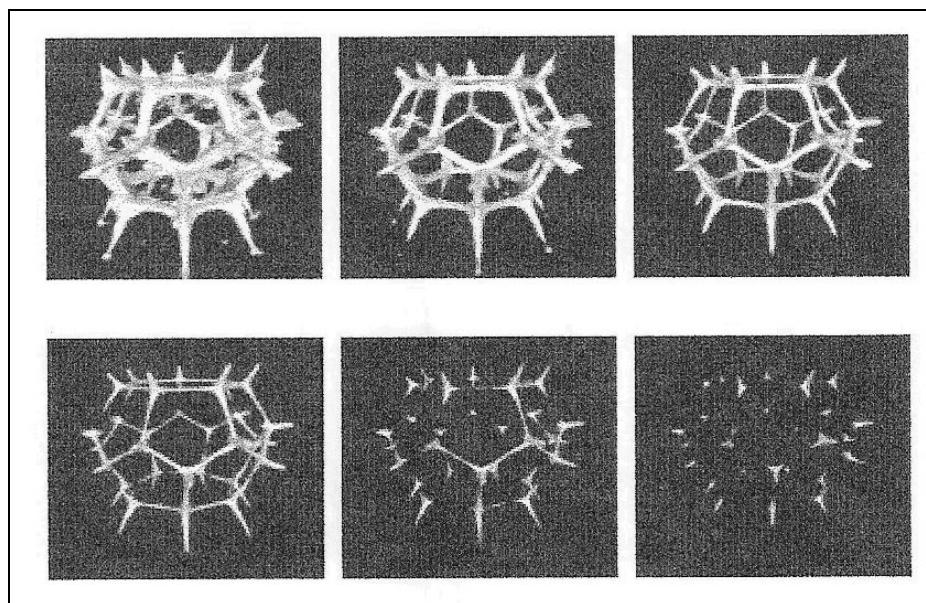


Figura 42. Visualização por tomografia óptica do processo de afinamento dos filmes líquidos (THOMAS *et al.*, 2005).

É possível, contudo, fazer uma distinção entre estruturas de espumas instáveis e metaestáveis. *Espumas instáveis* são exemplificadas pelas espumas formadas por soluções aquosas de ácidos ou álcoois saturados de cadeia curta. A presença dessas substâncias moderadamente tensoativas retarda até certo ponto a drenagem e ruptura do filme, mas não impede a ocorrência contínua desses fenômenos, até a destruição completa da espuma. As *espumas metaestáveis* podem ser exemplificadas por espumas formadas de soluções de sabões, detergentes sintéticos, proteínas, saponinas, etc., onde o equilíbrio de forças é tal que a drenagem do líquido cessa quando atinge uma determinada espessura de película, e na ausência de perturbações externas (vibrações, tensões, evaporação, difusão de gás de bolhas pequenas para bolhas grandes, calor, vibrações de temperaturas, presença de pó e outras impurezas) essas espumas permanecem quase indefinidamente (SHAW, 1975).

A estabilidade da espuma pode, então, ser influenciada por dois fatores independentes: (1) o empacotamento molecular no filme de tensoativo adsorvido e, logo, a viscosidade do filme na interface ar/água e a estruturação das micelas dentro do meio aquoso na lamela da espuma (PANDEY *et al.*, 2003). A estrutura micelar dentro do fino filme líquido da lamela da espuma foi avaliada, e demonstraram que a estratificação dos finos filmes líquidos pode ser explicada a partir de um afinamento

de camada por camada de estruturas ordenadas de micelas dentro do filme (PATIST *et al.*, 2002).

A presença de eletrólitos pode, portanto, influenciar tanto positivamente como negativamente as propriedades de viscosidade como as de dilatação superficiais. Neste sentido, de acordo com as características dos tensoativos, os eletrólitos poderão apresentar diferentes efeitos devido às interações específicas entre os íons e as moléculas do tensoativo (ANGARSKA *et al.*, 1998; KARAKASHEV e MANEV, 2001).

Devido a inexistência de interações iônicas entre os grupos polares dos tensoativos não-iônicos, não seria esperado o efeito de eletrólitos sobre os filmes de espuma destes tensoativos. No entanto, a influência dos eletrólitos sobre estes sistemas espumógenos ocorre através de uma redução na hidratação dos seus grupos hidrofílicos. Assim, o efeito dos eletrólitos na estabilização dos filmes de espumas dos tensoativos não-iônicos, estão associados aos fenômenos de *salted out* e *salted in* (SCHICK, 1997; HUNTER, 2002).

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. MATERIAL

4.3.1.1. Material vegetal

Extrato bruto liofilizado dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, Fr. 7090 liofilizada, Extrato bruto purificado (P6) liofilizado, obtido pelo Método II de purificação.

4.3.1.2. Reagentes e substâncias de referência

laurilsulfato de sódio (Merck), polissorbato 80 (Merck), cloreto de sódio (Nuclear), brometo de potássio (Synth), nitrato de potássio (Quimex); cloreto de magnésio hexaidratado (Vetec), fosfato de sódio dibásico anidro (Nuclear).

4.3.1.3. Equipamentos e aparelhos

Tensiômetro de anel Le Comte DuNoüy, modelo 8600 (KRÜSS, GERMANY); Coluna em vidro borossilicato (355 mm altura x 35 mm d.i.); Fluxômetro PROTEC (0-15 L/min); Termo-Higrômetro digital TFA (Germany); Compressor de ar NEVONI; Conjunto em acrílico e placas de vidro (20 x 20 cm); Balança eletrônica digital BIOPRECISA; Viscosímetro Capilar de Ostwald - Braun-Biotech Internacional; ZETA PLUS – Zeta potential Analyzer, BTC - Brookhaven Instruments Corporation (New York, USA); Espectrômetro de correlação de fótons (Instituto de Química – UFRGS)

- Fonte de luz laser: íons He-Ne, 35Mw, $\lambda_0 = 632,8$ nm: Spectra-Physics (Califórnia, EUA) e Coherent (Califórnia, EUA).
- Goniômetro: BI-200M, versão 2.0 (Brookhaven Instruments – New York, USA)
- Correlacionador digital: BI-9000AT (Brookhaven Instruments – New York, USA)
- Detector: BI-9863 (Brookhaven Instruments- New York, USA)

4.3.2. MÉTODOS

Tendo em vista que a maior parte das saponinas presentes no EXL se concentram nas frações 70 e 90, optou-se pela união destas duas frações, com a finalidade de obter um único produto purificado e com elevado teor de saponinas. Este produto foi denominado de Fr. 7090.

Para a realização dos estudos de caracterização físico-química e avaliação da atividade espumógena das saponinas dos frutos imaturos de *I. paraguariensis*, foram empregados como substâncias de referência para efeito comparativo, tensoativos sintéticos. Os tensoativos utilizados para esta finalidade foram o laurilsulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$, M: 288,38) como tensoativo aniônico e o polissorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$, M: 1310) como não-iônico.

4.3.2.1. Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)

As isotermas de abaixamento da tensão superficial versus o logaritmo natural da concentração molar das soluções tensoativas foram realizadas pelo método estático, utilizando o tensiômetro de anel Le Comte DuNöuy. As soluções aquosas de cada tensoativo foram preparadas a partir de uma solução concentrada, seguido da diluição às concentrações entre 0,001 a 20,0 g/L. A temperatura durante o experimento foi mantida em 20 ± 2 °C e a umidade relativa do ar entre 55 a 65 %. Cada valor expressa a média de, no mínimo, três determinações.

O valor da CMC foi calculado com auxílio de isotermas de tensão superficial (γ) versus o logaritmo natural da concentração molar do tensoativo ($\ln C$). Para as saponinas, a concentração molar foi expressa em termos de massa molecular da matessaponina-1. A regressão linear foi realizada para os valores da porção descendente (acima do ponto de inflexão da curva), e uma segunda reta foi projetada para os pontos da curva localizados após o ponto de inflexão da mesma. O valor da CMC determinado corresponde ao ponto de intersecção destas duas retas.

Os parâmetros de concentração de excesso de superfície ou de densidade superficial (Γ) e da área ocupada pelo grupo polar do tensoativo (A) na superfície solução/ar foram calculados com auxílio das equações **1** e **2** abaixo, derivadas da equação de adsorção de Gibbs:

$$\Gamma = -(1/RT) (d\gamma/d \ln C) \quad (\text{eq. 5})$$

onde, Γ é a densidade superficial (mmol/cm^2); R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T a temperatura absoluta (K); γ a tensão superficial (mNm^{-1}) e C a concentração do tensoativo (mmol L^{-1}).

$$A = 1/(\Gamma N_{AV}) \quad (\text{eq. 6})$$

Onde, A é a área superficial ocupada pelo grupo polar da molécula de tensoativo (\AA^2) e N_{AV} a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

4.3.2.2. Avaliação da atividade espumógena das saponinas de *Ilex paraguariensis*

4.3.2.2.1. Caracterização do perfil espumógeno

A capacidade espumógena das soluções tensoativas foi avaliada através do grau de espumabilidade das soluções. Para isso, foi realizada a determinação do volume máximo de espuma (VE), como medida do potencial espumógeno.

4.3.2.2.1.1. Determinação do grau de espumabilidade

O grau de espumabilidade das soluções tensoativas foi determinado através do volume máximo de espuma (VE) expresso através da medida da altura da coluna de espuma gerada sob condições experimentais padronizadas, em equipamento desenhado no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) desta universidade (Figura 43).

Um volume de exatamente 20,0 ml de solução tensoativa, na concentração de 10 vezes a sua concentração micelar crítica (CMC), foi cuidadosamente vertido dentro de uma coluna (C) de vidro borossilicato (355 mm de altura x 35 mm d.i.), provida de uma escala de leitura em milímetros (E) e fechada na base por um septo de vidro sinterizado G₂. A espuma foi gerada por insuflação de ar atmosférico com ajuda de um compressor (B), através do septo (S). A pressão de entrada do ar foi monitorada por um manômetro acoplado à saída do compressor e o fluxo de ar regulado através de um fluxômetro (F) de modo a obter uma pressão de saída de 0,05 Kgf cm⁻² e um fluxo de ar de 2 L min⁻¹. O tempo de fluxo do ar foi padronizado em exatamente 20 segundos. Após este período, o suprimento de ar foi interrompido através do fechamento da válvula (V) e a altura da coluna de espuma registrada imediatamente.

As condições externas foram mantidas em 20 ± 2 °C e umidade relativa do ar entre 55 e 65%. Cada valor expressa a média de, pelo menos, três determinações.

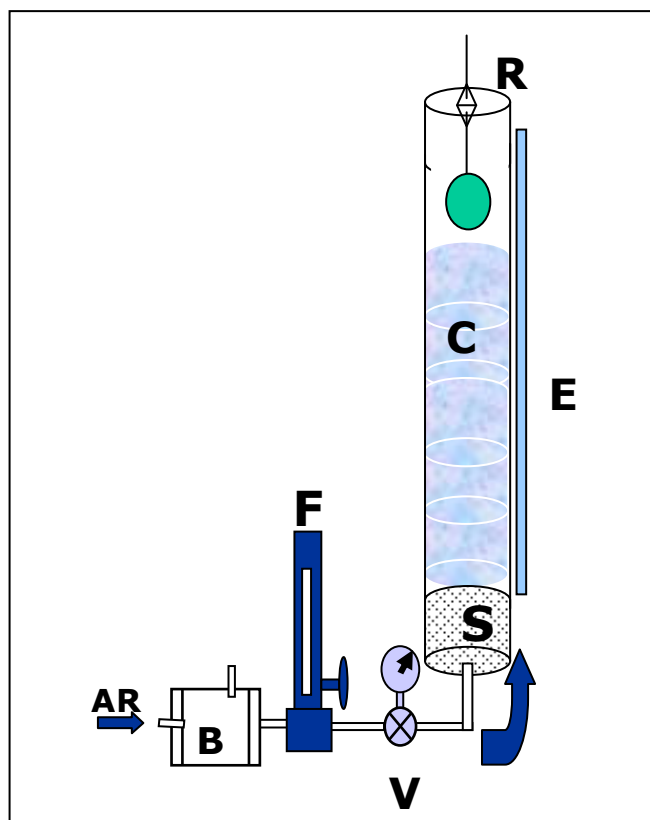


Figura 43. Esquema do aparelho para a caracterização espumógena

O sistema de lançamento (**R**) de uma esfera, esta relacionado ao teste de resistência da espuma, descrito no item 3.2.2.4.

4.3.2.2.1.2. Caracterização do perfil de drenagem da espuma

O perfil de drenagem das soluções tensoativas foi avaliado a partir do teste de determinação do grau de espumabilidade. Após a formação da espuma, o volume de líquido drenado da espuma foi registrado em função do tempo.

4.3.2.2.1.3. Determinação do volume de drenagem da espuma em função do tempo

Para esta avaliação, foi registrado o volume de líquido drenado da espuma em função do tempo, considerando como volume inicial o volume de solução residual

presente na base da coluna da espuma no tempo zero (após o fechamento da entrada de ar). A seguir, nos intervalos de 1, 5, 10, 30 e 60 minutos, o aumento do volume de líquido na base da coluna de espuma foi registrado em função do tempo. O volume de líquido drenado foi expresso pelo somatório ao volume inicial (tempo zero), aos volumes acrescidos a cada intervalo de tempo.

4.3.2.2.1.3.1. Determinação do volume de líquido retido na espuma em função do tempo (VLE %)

O volume de líquido retido na espuma (VLE) em cada intervalo de tempo foi expresso pela diferença entre o volume inicial de solução e o volume drenado no tempo t , de acordo com a seguinte equação:

$$VLE = \frac{V_t - V_d(t)}{V_t} \cdot 100 \quad (\text{eq.7})$$

Onde, VLE é a porcentagem de líquido retido na espuma; V_t o volume inicial (20 ml) e $V_d(t)$ o volume drenado no tempo t .

4.3.2.3. Avaliação da estabilidade da espuma

A estabilidade da espuma foi avaliada através do tempo de permanência da espuma em função do tempo. Após a formação da espuma, como descrito no item 2.2.2.1.1., a altura da coluna de espuma foi medida em intervalos de tempo de 1 minuto nos primeiros 5 minutos, sendo após registrados em intervalos de 5 minutos até 15 minutos e, a seguir em 15 e 30 minutos até a primeira hora de avaliação. Após, as leituras foram realizadas a cada 60 minutos até 480 minutos (8 horas).

Cada avaliação corresponde, no mínimo, três determinações, sob temperatura de 20 ± 2 °C e umidade relativa do ar entre 55 – 65%.

4.3.2.4. Avaliação da resistência da espuma

A resistência da espuma foi avaliada em termos da velocidade de queda livre de uma esfera de massa e dimensões conhecidas. A formação da espuma foi realizada conforme descrito no item 2.2.2.1.1. O tempo de fluxo de ar foi mantido até a espuma atingir uma altura de 20 cm na coluna de vidro. Imediatamente após, foi colocado no topo da coluna de espuma uma esfera (oca) de vidro de 30 mm de diâmetro e peso de 5,1404 g. O tempo de queda da esfera ao longo da coluna de espuma até tocar o líquido na base da coluna foi cronometrado. A velocidade de deslocamento da esfera foi calculada através da equação 8 e os resultados expressos em cm s^{-1} .

$$v = d / t \quad (\text{eq. 8})$$

onde, v é a velocidade de deslocamento da esfera, d , a distância percorrida pela esfera (20,0 cm) e t o tempo em segundos.

4.3.2.5. Análise bidimensional da espuma

Para a análise bidimensional da espuma os experimentos foram realizados em um equipamento projetado e confeccionado para esta finalidade. O equipamento consiste de uma cuba de acrílico, provida na base de um ducto perfurado adaptado à uma válvula para controle da entrada de ar. Dentro da cuba foram fixadas duas placas paralelas de vidro (20 x 20 cm), dispostas a uma distância de 1 cm entre elas. Para a geração da espuma, 100,0 ml de solução tensoativa à concentração de 1,0 % foi vertida no interior da cuba e o ar diretamente insuflado nesta com o auxílio de um compressor de ar acoplado a um fluxômetro. A pressão do ar foi mantida em $0,05 \text{ kgf cm}^{-2}$ à uma vazão de 2 L min^{-1} . A entrada do ar permaneceu ativada durante tempo suficiente para uma distribuição completa e homogênea da espuma entre as placas de vidro. A espuma formada foi então fotografada em intervalos de 10 segundos até o seu colapso. Para o registro fotográfico, a câmera foi disposta à mesma distância do objeto mantendo-se o mesmo campo visual.

Após a documentação fotográfica, o número de bolhas de ar da espuma dentro do campo foi contado, bem como o número de arestas de cada bolha. Após, o número de arestas foi dividido pelo número de bolhas, para se ter o número médio de arestas em função do tempo.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar entre 50 a 60 %.

Os critérios de avaliação e de comparação, levaram em consideração o número de vértices e a curvatura (pressão interna) das bolhas de espuma, de acordo com as seguintes equações:

$$K_{ij} + K_{jk} + K_{ji} = \left[\frac{P_i - P_j}{\gamma} + \frac{P_j - P_k}{\gamma} + \frac{P_k - P_i}{\gamma} \right] = 0 \quad (\text{Lei de Plateau}) \quad (\text{eq. 9})$$

$$\Phi_i = \sum_j \frac{1}{\gamma} (P_i - P_j) \psi_{ij} = \sum K_{ij} \ell_{ij} = (6 - n_i) \frac{\pi}{3} \quad (\text{Teorema de Gauss}) \quad (\text{eq. 10})$$

Onde, K indica vértices; P a pressão interna associada à curvatura de uma esfera (Princípio de Laplace); Φ índice de forma (convexo = instável; côncavo = estável); n = número de lados; Ψ comprimento do arco de curvatura; e i , j , e k referem-se aos vértices específicos, conforme figura abaixo.

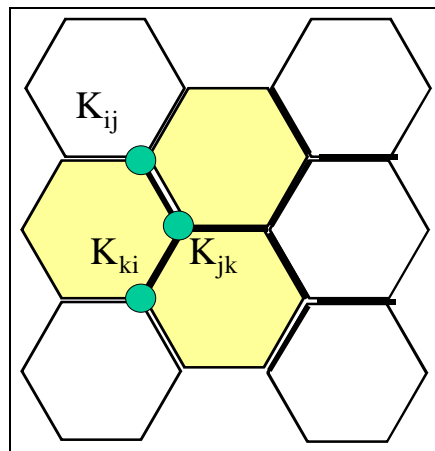


Figura 44. Representação bidimensional de uma espuma ideal, mostrando os vértices K_{ij} , K_{jk} e K_{ki} e os respectivos lados associados aos arcos de curvatura.

4.3.2.6. Determinação da viscosidade das soluções tensoativas

A viscosidade das soluções tensoativas à concentração de 0,25% foi determinada em viscosímetro capilar do tipo Ostwald, à temperatura de 20 ± 2 °C, utilizando a equação abaixo. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

$$\eta = t \cdot k \quad (\text{eq. 12})$$

Onde, η é a viscosidade, em centipoise; t o tempo de escoamento do líquido, em segundos; k a constante de Ostwald no valor de 0,0212, relacionado aos parâmetros de construção do aparelho.

4.3.2.7. Avaliação da influência de eletrólitos sobre o comportamento espumógeno das saponinas

Para a avaliação da influência de eletrólitos inorgânicos sobre o comportamento espumógeno das soluções tensoativas, testes referentes ao perfil de drenagem, perfil espumógeno, avaliação da estabilidade e resistência da espuma foram realizados de acordo com os experimentos citados anteriormente. As soluções tensoativas foram preparadas pela dissolução dos tensoativos sintéticos e dos extratos vegetais liofilizados, à concentração de 10 CMC em água recentemente destilada ou nas respectivas soluções salinas.

A seleção dos eletrólitos foi baseado na literatura (ANGARSKA, 1998; KARAKASHEV e MANEV, 2001) e com a finalidade de avaliar a influência dos íons univalentes e divalentes, bem como a influência de diferentes cátions e ânions sobre o comportamento espumógeno das soluções.

Os eletrólitos inorgânicos empregados foram o cloreto de sódio (NaCl), brometo de potássio (KBr), nitrato de potássio (KNO₃), cloreto de magnésio (MgCl₂) e fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄). As soluções salinas foram preparadas pela

dissolução dos respectivos sais em água destilada, sendo a concentração de cada sal, calculada com a finalidade de manter uma força iônica (I) de 0,024M (ANGARSKA, 1998), de acordo com a seguinte equação:

$$I = 1/2 \left(\sum Z_1^2 \cdot C_1 \right) \quad (\text{eq. 13})$$

onde, I é a força iônica (0,024 M), Z a valência do íon e C a concentração molar

À força iônica (I) de 0,024 M, as soluções de eletrólitos correspondem às seguintes concentrações: NaCl (0,14026 %), KBr (0,2856 %), KNO₃ (0,2426 %), MgCl₂ (0,1626 %) e Na₂HPO₄ (0,2470 %).

4.3.2.8. Obtenção do diâmetro efetivo das micelas de saponinas.

O diâmetro efetivo das micelas dos tensoativos foram obtidos por Espalhamento de luz dinâmica (ELD).

Para a realização do experimento, foram preparadas soluções aquosas de EXL, Fr. 7090, laurilsulfato de sódio e de polissorbato 80 à concentração de 10 vezes a sua concentração micelar crítica (CMC). Os parâmetros foram analisados em amostras sem eletrólitos e com a presença de eletrólitos. As soluções contendo eletrólitos foram preparadas nas concentrações descritas no item 2.2.5 deste capítulo.

As amostras foram previamente submetidas a um processo de filtração esterilizante através de membrana Millipore® (0,45 µm) diretamente dentro de células óticas com características específicas de emprego no equipamento. As medidas foram realizadas em triplicata, à 21,0 ± 0,1 °C, mantida constante através de um termostato acoplado ao aparelho.

A função obtida a partir das flutuações de luz espalhada tempo, está relacionada a uma integral de Laplace de acordo com a seguinte equação:

$$g_1(t) = \int w(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \quad (\text{eq.14})$$

onde, t é o tempo.

$w(\Gamma)$ = função de distribuição das taxas de relaxação

A função realmente medida está relacionada à equação acima através da relação de Siegert:

$$g_2(t) = B \left[1 + \beta (g_1(t))^2 \right] \quad (\text{eq. 15})$$

onde, B é a linha de base da função de correlação e β a constante ótica

Relacionando-se Γ com o ângulo (θ), pode-se determinar o coeficiente de difusão translacional (D_T) das partículas em solução conforme a seguinte equação:

$$D_T = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (\text{eq. 16})$$

O vetor de espalhamento q , representado pela seguinte equação, pode ser relacionado às dimensões do objeto observado.

$$q = \left(\frac{4\pi x}{\lambda_o} \right) \text{sen} \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (\text{eq. 17})$$

onde, $x = n_o$ (índice de refração do solvente)

Extrapolando-se D_T para o ângulo (θ) e concentração (c) zero, obtém-se o valor do coeficiente de difusão a diluição infinita (D_o), através da seguinte equação:

$$\boxed{D_c = D_o (1 + K_D C)} \quad (\text{eq. 18})$$

Onde, D_c é o coeficiente de difusão a ângulo zero e K_D o coeficiente de difusão virial

O coeficiente de difusão virial relacionado à temperatura (T) e a viscosidade (η_o) do solvente, permite o cálculo do diâmetro hidrodinâmico (D_r) das espécies em solução, através da utilização da relação de Stokes-Einstein:

$$\boxed{D_r = \frac{K T}{3\pi\eta (T)d}} \quad (\text{eq. 19})$$

onde, K é a constante de Boltzmann e η a viscosidade na temperatura absoluta T (K).

O diâmetro d , representa um equivalente esférico de diâmetro hidrodinâmico.

O índice de polidispersão (variância da distribuição dos coeficientes de difusão, dividido pelo quadrado da média), foi calculado pela seguinte equação:

$$\boxed{\text{Polidispersão} = \frac{\left(\overline{D_T^2}\right) - \left(\overline{D_T}\right)^2}{\left(\overline{D_T}\right)^2}} \quad (\text{eq. 20})$$

Se a amostra for monodispersa, a polidispersão será igual ou menor a 0,02.

4.3.2.9. Determinação do potencial zeta das soluções de saponinas

A determinação do potencial zeta foi realizado para a Fr. 7090. As amostras foram preparadas pela dissolução da fração à concentração de 10 CMC em água

destilada ou nas respectivas soluções salinas. Após preparadas, as amostras foram acondicionadas em vidros âmbar, hermeticamente fechados e conservados sob refrigeração.

A amostra a ser analisada foi colocada em uma cubeta de vidro e submetida à leitura direta no equipamento, sendo potencial zeta determinado pela média de 5 leituras.

4.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) das soluções tensoativas.

As isotermas de tensão superficial em função do logaritmo natural da concentração das soluções tensoativas de laurilsulfato de sódio (LSS), polissorbato 80 (Poli. 80), extrato bruto (EXL), fração 7090 (Fr.7090) e extrato P6 estão contidas nas Figuras 45, 46, 47, 48 e 49, respectivamente.

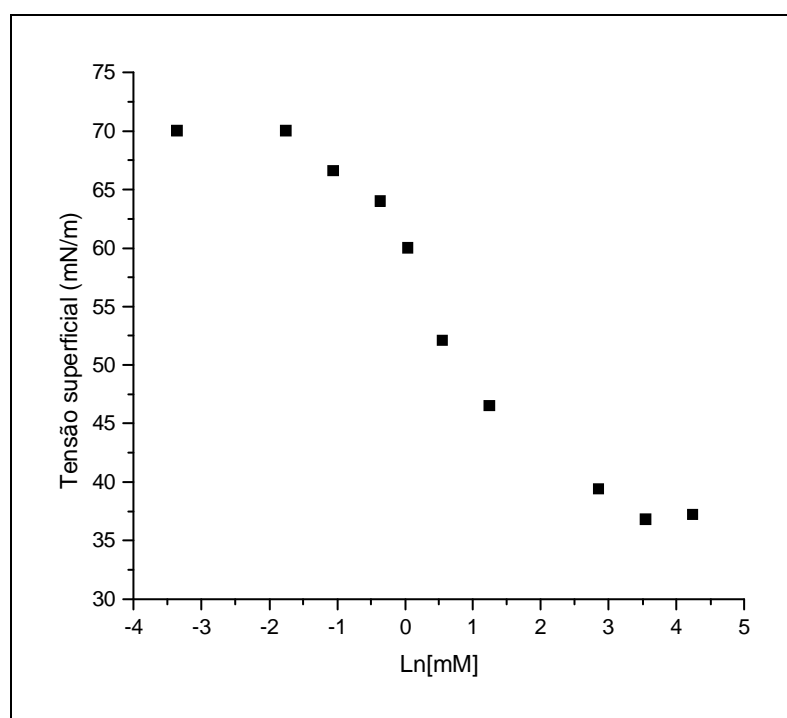


Figura 45. Isoterma de abaixamento da tensão superficial do LSS a 20 °C.

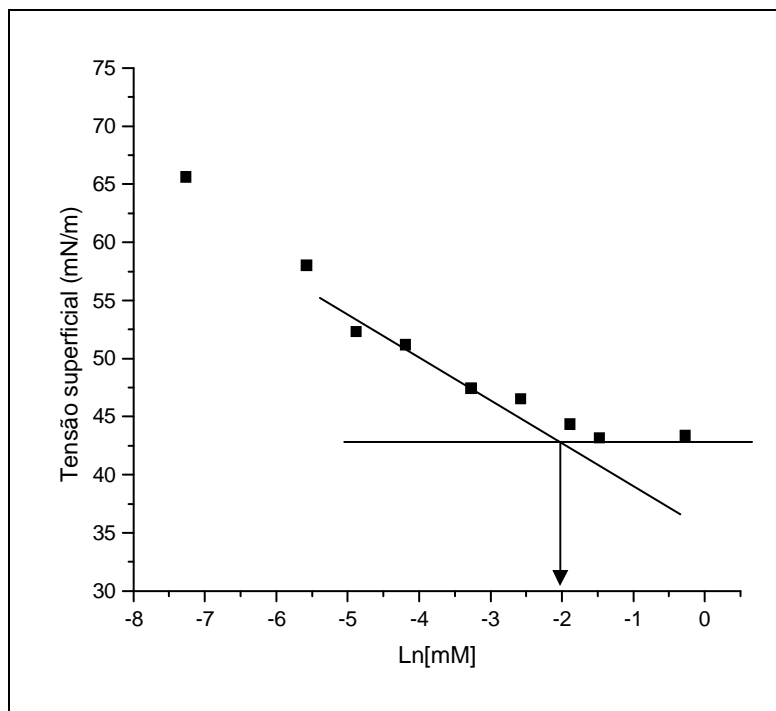


Figura 46. Isoterma de abaixamento da tensão superficial do Poli. 80 a 20 °C com a sistemática de cálculo da CMC.

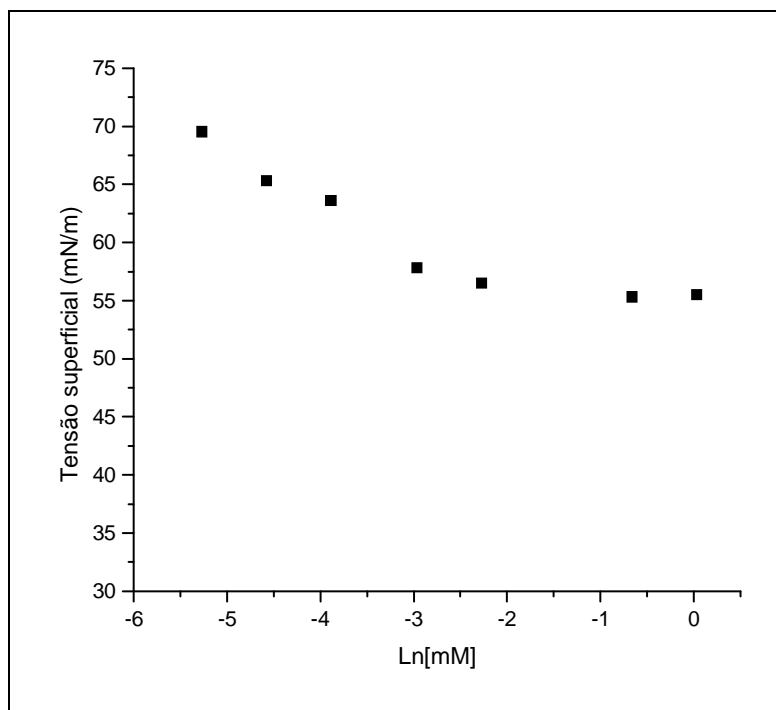


Figura 47. Isoterma de abaixamento da tensão superficial do EXL a 20 °C

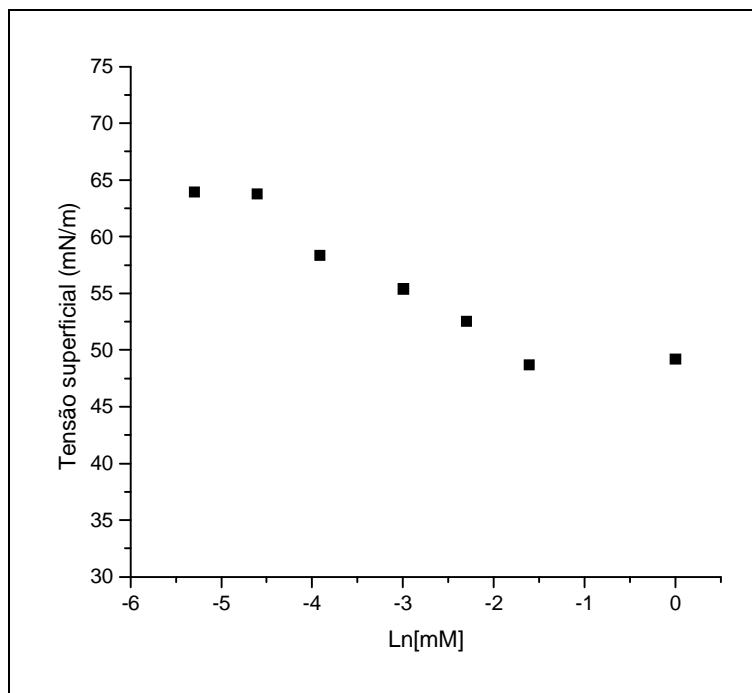


Figura 48. Isoterma de abaixamento da tensão superficial da Fr.7090 a 20 °C.

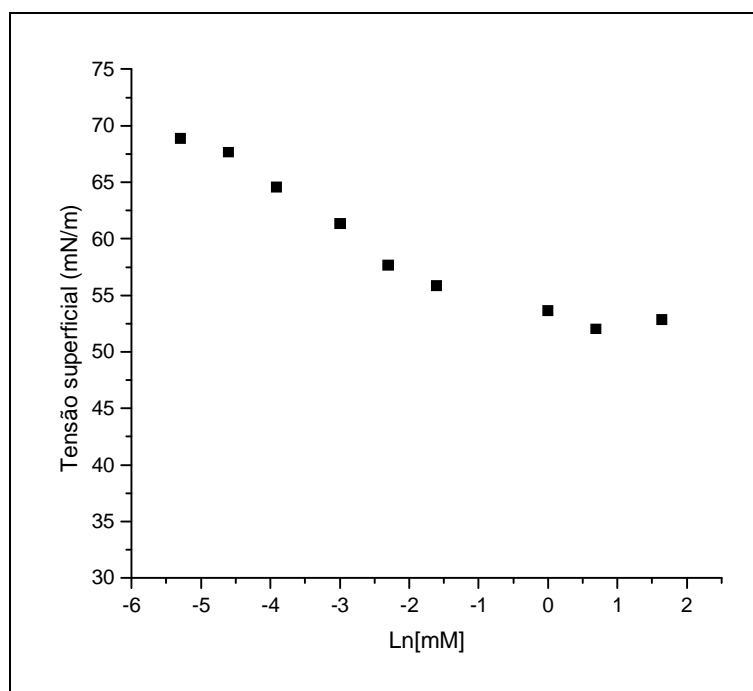


Figura 49. Isoterma de abaixamento da tensão superficial do extrato P6 a 20 °C.

Os valores dos parâmetros da regressão linear, calculados a partir da porção linear descendente das isotermas de tensão superficial das soluções tensoativas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros da regressão linear das isotermas de tensão superficial das soluções tensoativas.

Parâmetros	LSS	Poli. 80	EXL	Fr. 7090	P6
R ²	0,9800	0,9890	0,9903	0,9850	0,9966
Erro padrão	2,4555	1,2188	0,8265	1,1816	0,4562
Coefficiente angular (mNm ⁻¹ mol ⁻¹)	7,2380	4,6538	4,8985	4,2993	4,0049
Coefficiente linear (mN m ⁻¹)	58,5024	31,4498	43,5060	42,2612	49,0524
Equação da reta	Y = 58,502 - 7,2380 ln C	Y = 31,449 - 4,6538 ln C	Y = 43,506 - 4,8985 ln C	Y = 42,261 - 4,2993 ln C	Y = 49,052 - 4,0049 ln C

O resultado dos valores da CMC, concentração de excesso (Γ) e de superfície molecular (A) das soluções tensoativas de LSS, Poli.80, EXL, Fr.7090 e extrato P6 estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Valores da CMC, concentração de excesso (Γ) e de superfície molecular (A) das soluções tensoativas.

Solução tensoativa	CMC (mM)	γ_{CMC} (mN m⁻¹)	Γ (mmol m⁻²)	A (Å²)
LSS	8,58	37,0	2,87	57,87
Poli 80	0,60	44,0	1,84	90,27
EXL **	0,11	55,6	1,94	85,62
Fr.7090 **	0,15	52,8	1,70	97,71
P6 **	0,20	52,5	1,58	105,1

(**) valores correspondentes à concentração molar expressa como matessaponina-1 (M: 996,45)

Pelos resultados dos valores da CMC, concentração de excesso (Γ) e de superfície molecular (A), observou-se nítidas diferenças quanto às características superficiais das saponinas em relação ao LSS e Poli.80.

As diferenças expressam o comportamento superficial de moléculas tensoativas, as quais estão associadas às suas características estruturais, principalmente quanto às suas propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (FLORENCE, 2003).

Neste sentido, pelo caráter hidrofóbico das agliconas das saponinas dos frutos de *I. paraguariensis*, pôde-se constatar para o EXL, Fr.7090 e extrato P6 baixos valores de CMC. Do mesmo modo, o Poli. 80 em função da natureza do seu grupo apolar (64 átomos de carbono) apresentou, também este, um baixo valor de CMC. De modo geral, uma CMC reduzida indica que o afastamento da porção hidrofóbica do tensoativo da fase aquosa constitui o fator dominante, o que confere aos compostos uma elevada atividade superficial. Por outro lado, quanto maior a hidrofília da molécula, maior será os valores de CMC, uma vez que as forças que se opõe à agregação são mais significativas (STANLEY, 2001). Deste modo, devido o caráter iônico do grupo polar do LSS, este apresentou um maior valor de CMC, cuja presença das forças de repulsão entre os seus grupos polares, promovem o envolvimento de trabalho elétrico na formação das micelas (FLORENCE, 2003).

O excesso de superfície (Γ) representa fisicamente, a quantidade de saturação de tensoativo na região superficial. Deste modo, a densidade de superfície está diretamente relacionada à área superficial ocupada pelo grupo polar do tensoativo bem como ao arranjo molecular na interface (PANDEY *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2005). Assim, quanto menor a área superficial ocupada pelo grupo polar do tensoativo, maior será a densidade ou excesso de superfície e, conseqüentemente, maior será o abaixamento da tensão superficial (FLORENCE, 2003).

De acordo com a literatura, a área superficial ocupada pelo grupo polar da molécula de LSS na superfície ar/água é de 51,5 Å (PANDEY, *et. al.*, 2003). Este resultado está de acordo com o encontrado a partir dos dados experimentais de abaixamento da tensão superficial para a área de 57,8 Å, ocupada pelo grupo polar de LSS na superfície ar/água. Pela comparação com as áreas superficiais ocupadas pelos grupos polares das saponinas e do Poli. 80, verificou-se que o LSS ocupa a menor área superficial, o que resultou, em uma maior densidade superficial. Tendo em vista, que a tensão superficial está relacionada ao número de moléculas do tensoativo por unidade de área adsorvida na interface ar/água (MITRA e DUNGAN, 1997; PANDEY

et al., 2003), a solução de LSS, foi, neste caso, a que apresentou um maior abaixamento da tensão superficial.

Os produtos purificados (Fr. 7090 e P6) apresentaram uma CMC semelhante ao extrato bruto liofilizado, como também, valores similares da tensão superficial na CMC, de excesso de superfície e da área superficial ocupada pelo grupo polar na interface solução-ar. Para o EXL e produtos purificados pelo fato de se tratarem de misturas de saponinas a sua concentração molar, CMC e demais parâmetros físico-químicos foram expressos em termos de matessaponina-1. Assim, para o EXL, o valor de CMC foi de 0,11 mM, ou seja, 125 mg L⁻¹, valor muito próximo ao encontrado para uma sapaalbina, uma mistura de saponinas triterpênicas derivadas do ácido oleanólico extraída das raízes da *Gypsophila struthium*, cujo valor de CMC relatado foi de 123 mg L⁻¹ (VOCHTEN *et al.*, 1967). No entanto, o valor da CMC encontrado para o extrato P6 foi levemente superior ao encontrado para o EXL e Fr. 7090. Este fato, pode ser atribuído, à presença no extrato P6 de uma maior porcentagem de saponinas mais polares comparado à Fr. 7090, cujo predomínio é de saponinas de menor polaridade.

Em comparação com o LSS e o Poli. 80, as saponinas apresentam-se como substâncias anfifílicas de elevada atividade superficial. Isso explica, os resultados obtidos em relação ao rápido abaixamento inicial da tensão superficial, mesmo em baixa concentração, e o seu baixo valor de CMC.

Pelos resultados obtidos, observou-se, também, que os grupos polares das saponinas ocupam uma maior área superficial em relação aos grupos polares das moléculas de LSS e do Poli. 80, o que resultou em uma menor densidade superficial, levando às soluções de saponinas a apresentarem um menor abaixamento da tensão superficial na CMC em relação aos tensoativos sintéticos. A área superficial média encontrada para as saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* de 85,6 Å², assemelha-se ao valor de 83 Å² relatado para as saponinas da quilaia, porém, bem acima do valor de 45,2 Å², estimado para alguns tensoativos não-iônicos típicos (C₁₅E₈) a 25 °C. No caso das saponinas da quilaia, este fato foi atribuído à presença das várias moléculas de açúcares na sua porção hidrofílica, o que explicaria a razão para o tamanho

anômalo, ocupada por seus grupos polares na região superficial (MITRA e DUNGAN, 1997).

Pode-se constatar que as saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* apresentam algumas características superficiais típicas de tensoativos não-iônicos, sendo comparáveis, sob vários aspectos às propriedades de outras saponinas relatadas na literatura.

4.4.2. Caracterização do perfil espumógeno das saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*

4.4.2.1. Determinação do perfil de drenagem da espuma das saponinas

Os perfis de drenagem das soluções de saponinas (EXL, Fr.7090 e extrato P6), LSS e do Poli.80, na concentração de 10 vezes a sua CMC, foram expressos através da porcentagem do volume de líquido retido na espuma (**VLE%**) em função do tempo, considerando como critério de medida o volume cumulativo de solução abaixo da coluna de espuma.

O perfil de drenagem das soluções do EXB, Fr.7090, LSS e Poli. 80 na concentração de 10 CMC, está apresentado na Figura 50.

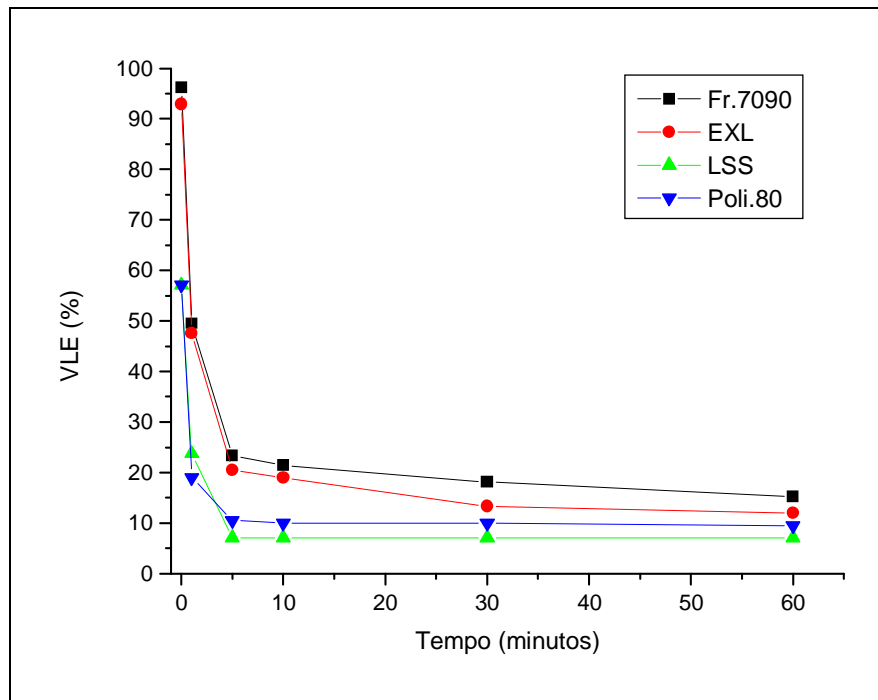


Figura 50. Perfil de drenagem das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80, na concentração de 10 CMC.

Pela avaliação gráfica das curvas dos volumes de drenagem do líquido da espuma em função do tempo, observa-se que houve diferenças entre as soluções tensoativas analisadas. No tempo zero, as soluções de LSS e Poli. 80 apresentaram 57,1% do volume inicial da solução retidos na espuma, enquanto o EXL e a Fr.7090 apresentaram, respectivamente, valores de 92,9 e 96,2 %. O EXL e a Fr.7090 mostram, portanto, perfis de drenagem qualitativamente semelhantes. No entanto, após os primeiros 5 minutos de avaliação, observou-se uma rápida drenagem nas espumas das soluções tensoativas, chegando a valores de 20,5 % e 23,3 % para o EXL e Fr.7090 e de 7,15 % e 10,5 % para o LSS e Poli.80 de líquido retido na espuma (VLE %), respectivamente. Após 5 minutos, houve uma tendência à estabilização no processo de drenagem destas soluções. No entanto, para as soluções de saponinas, a drenagem se processou mais lentamente e somente a partir de 30 minutos houve a estabilização do processo de drenagem, enquanto para as soluções de LSS e Poli. 80 esta estabilização ocorreu a partir de 5 minutos.

A drenagem da espuma começa a cessar, quando o gradiente da pressão capilar contrabalança com a gravidade (BHAKTA e RUCKENSTEIN, 1997). Assim, em 60

minutos de avaliação, obteve-se volume de 12,0 % e 15,2 % de líquido na espuma para o EXL e Fr.7090 e de 7,1% e 9,5% para o LSS e Poli.80, respectivamente.

Pela avaliação do perfil de drenagem destas soluções tensoativas, pode-se observar que as espumas das saponinas, tanto na forma bruta como purificada, apresentaram um menor volume de drenagem em função do tempo, demonstrado através do maior percentual de volume de líquido retido na espuma (VLE %) em 60 minutos, em relação aos obtidos para o LSS e para o Poli. 80.

O fenômeno de drenagem na espuma, além da influência das forças da gravidade e capilaridade, também é influenciado pelas características e propriedades dos filmes interfaciais (NEETHLING *et al.*, 2005; COONS *et al.*, 2005). Neste sentido, o processo de drenagem está diretamente associado à propriedade de viscosidade de cisalhamento superficial, que por sua vez, está relacionado ao nível de interação entre as moléculas do tensoativo com a água (HARVEY *et al.*, 2005). Assim, quanto maior a ligação dos grupos polares dos tensoativos com as moléculas de água, maior será a viscosidade de cisalhamento superficial, e conseqüentemente mais lento se torna o processo de drenagem.

Tendo em vista, que os grupos polares das saponinas são formados por moléculas de açúcares e, apresentando estas, forte interação com as moléculas de água, isto lhe confere uma elevada viscosidade interfacial (VOCHTEN *et al.*, 1967). Este fato, explica o menor volume de drenagem da espuma das saponinas, comparado ao LSS e o Poli. 80.

4.4.2.2. Determinação do grau de espumabilidade das saponinas

O grau de espumabilidade das soluções tensoativas foi determinado através do volume máximo de espuma formado durante um tempo de 20 segundos, sob um fluxo de ar de 2 L min⁻¹.

O grau de espumabilidade das soluções de EXL, Fr.7090, extrato P6, LSS, e Poli.80 estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Espumabilidade das soluções de EXL, Fr. 7090, extrato P6, LSS, e Poli. 80, na concentração de 10 CMC.

	EXL	Fr. 7090	P6	LSS	Poli. 80
Altura da coluna de espuma (cm)	14,5 ± 2,0	16,7 ± 1,4	16,3 ± 0,28	17,2 ± 0,1	14,5 ± 0,6

O grau de espumabilidade de uma solução tensoativa é expresso pelo volume de espuma formado sob condições experimentais controladas, estando diretamente relacionado à vazão de ar insuflado na coluna. Inicialmente foram testadas duas vazões de ar, de 2 L/min e de 4 L/min, durante 20 segundos, utilizando como ponto de referência a solução de LSS e de EXL, verificando-se uma altura da coluna de espuma de 34,0 cm e de 31,7 cm, respectivamente. Os resultados comprovaram que quanto maior o fluxo de ar, maior é a produção de espuma. Entretanto, no presente trabalho optou-se por um menor fluxo de ar, o que levou à formação mais lenta da espuma, porém, com uma menor polidispersão em relação à forma e tamanho das bolhas.

A partir dos resultados obtidos, empregando um fluxo de ar de 2 L/min durante 20 segundos, pôde-se observar diferenças quanto ao grau de espumabilidade entre as soluções avaliadas. A solução de LSS foi a que apresentou maior espumabilidade, seguida pela Fr. 7090 e pelo extrato P6. As soluções do EXL e de Poli. 80, apresentaram uma espumabilidade em menor grau, porém semelhantes entre si.

A maior espumabilidade produzida pelo LSS em relação às saponinas e o Poli. 80, poderia ser atribuída ao maior abaixamento da tensão superficial pelo LSS. No entanto, apesar do EXL e a Fr. 7090 apresentarem valores semelhantes de abaixamento da tensão superficial, ou seja, 55,6 mN/m e 52,8 mN/m, respectivamente, estas soluções apresentaram diferentes graus de espumabilidade, como comprovado pelas alturas das colunas de espuma de 14,5 cm e 16,7 cm, respectivamente.

Embora os tensoativos normalmente usados na produção da espuma influenciam significativamente a tensão superficial na interface ar-líquido, o efeito dos tensoativos sobre a espuma não pode ser explicado somente pela diminuição na tensão

superficial (HARVEY *et al.*, 2005). Parte dos resultados se explicariam a partir dos fatores que controlam a formação de um filme de moléculas de tensoativo adsorvidas na nova interface e da teoria do tempo de relaxação micelar (PATIST, *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que as soluções de LSS apresentam uma estabilidade micelar máxima em torno de 200 mM. Nesta concentração, há uma distância de aproximadamente 40 Å entre as superfícies das micelas adjacentes, o que produz uma repulsão de cargas e, conseqüentemente, a indução para uma rápida captação de contra-íons para minimizar a repulsão entre as micelas adjacentes. Isto produz uma considerável estabilidade na estrutura micelar e, por conseguinte, um longo tempo de relaxação ($\tau_2 = 5$ segundos), cujo resultado final é de uma espumabilidade mínima, menor número de bolhas e valores máximos na estabilidade do filme isolado (PATIST, *et al.*, 2002). A CMC do LSS determinada experimentalmente é de 8,3 mM, portanto, à concentração de 200 mM corresponde a aproximadamente 24 vezes o seu valor de CMC. Neste trabalho, a concentração da solução de LSS testada foi de 10 vezes o valor da sua CMC, ou seja, uma concentração de 86 mM. De acordo com os dados da literatura, o LSS nesta concentração apresentaria um tempo de relaxação (τ_2) em torno de 0,01 segundos, estando, portanto, dentro da faixa de concentração de alta instabilidade micelar, o que, conseqüentemente, produziria uma maior espumabilidade, devido a alta difusão de monômeros do tensoativo para as novas interfaces (PATIST *et al.*, 2002). Experimentalmente, os resultados comprovaram uma elevada espumabilidade apresentada pelo LSS nesta concentração.

No caso de sistemas não-iônicos, as forças eletrostáticas de repulsão estão ausentes e, conseqüentemente, demonstram um mais longo tempo no processo de *relaxação lento* (τ_2) do que os sistemas iônicos. De acordo com os dados tabelados disponíveis, o tempo de relaxação (τ_2) para as micelas de polissorbato 80 é de 8 a 10 segundos (PATIST *et al.*, 2002). Pelos resultados obtidos neste trabalho, as soluções de Poli. 80 demonstraram uma espumabilidade semelhante ao EXL, porém, menor comparado às soluções de LSS, Fr.7090 e o extrato P6, o que pode ser atribuído ao menor fluxo de monômeros, caracterizando uma maior estabilidade das micelas de Poli. 80.

Um estudo realizado com tensoativos não-iônicos por TAN e colaboradores (2005), demonstraram que os PPGs (polipropilenoglicóis) de alto peso molecular apresentam uma alta atividade superficial mas uma lenta difusão comparado aos de baixo peso molecular. A lenta difusão para as interfaces ar-água, pode explicar porque estes PPGs produzem menos espuma ou uma espuma menos estável (*efeito Marangoni*).

Durante da formação da espuma, o fenômeno da coalescência é um dos fatores que pode comprometer o grau de espumabilidade de um sistema. Assim, o rompimento de bolhas durante a subida destas para a formação da espuma pode ser ocasionado pela ruptura dos filmes ou pela difusão do gás entre as bolhas (HILGENFELDT *et al.*, 2001). Deste modo, serão as características dos filmes interfaciais que exercerão uma importante influência na manutenção das bolhas da espuma.

De acordo com os resultados, observou-se que tanto a solução de LSS quanto as soluções de saponinas purificadas apresentaram os maiores índices de espumabilidade. Este fato, vem ao encontro das características superficiais de viscoelasticidade apresentadas tanto pelas camadas adsorvidas do LSS (HARVEY *et al.*, 2005) como pelas saponinas (VARDAR-SUKAN, 1998), uma vez que esta propriedade, é a que controla principalmente o processo de ruptura dos filmes interfaciais (HARVEY *et al.*, 2005).

Cabe salientar, portanto, a influência positiva dos processos de purificação do EXL, os quais promoveram produtos com melhores índices de espuma e com uma melhor reprodutibilidade do que o EXL.

Devido a similaridade quanto ao comportamento espumógeno entre o extrato P6 e a Fr.7090, optou-se por utilizar somente a Fr. 7090 para realização das análises posteriores.

4.4.2.3. Avaliação da estabilidade da espuma das saponinas

4.4.2.3.1. Determinação da altura da coluna de espuma em função do tempo

A estabilidade da espuma das soluções tensoativas foi avaliada em função do tempo de permanência da espuma e pela evolução das características da espuma.

A estabilidade da espuma das saponinas (EXL e Fr.7090), LSS e Poli.80, avaliada através da altura da coluna de espuma em um período de 60 minutos, está apresentada na Figura 51.

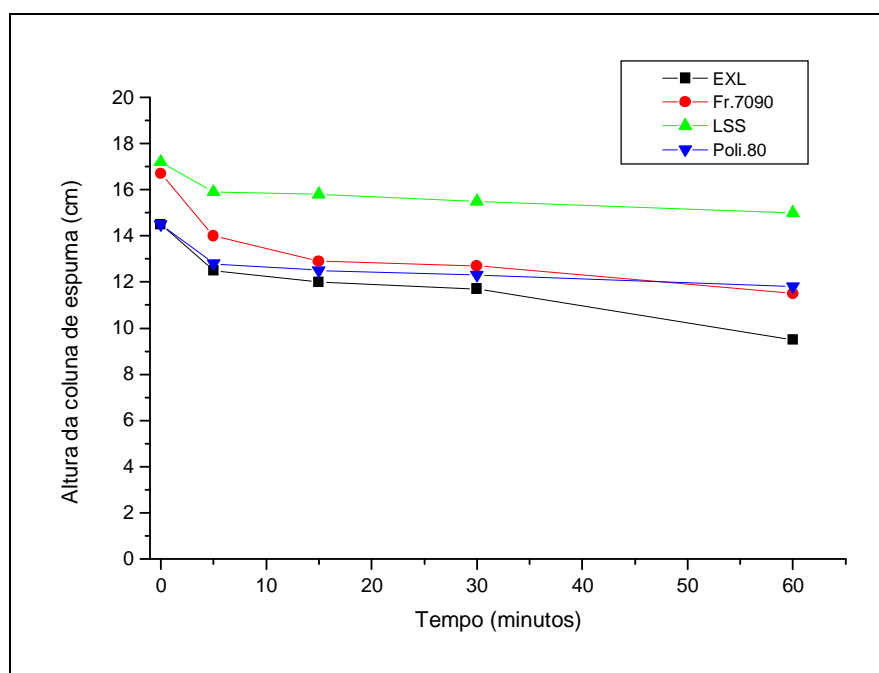


Figura 51. Perfil de estabilidade da espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli.80 (10 CMC) em 60 minutos.

Pela análise gráfica pode-se observar que a estabilidade das espumas produzidas pelas soluções de EXL e Fr. 7090 assemelha-se à da espuma de Poli. 80, sendo que, a Fr. 7090 produziu uma espuma de maior estabilidade que o EXL e o Poli. 80.

A espuma produzida pelo LSS apresentou uma maior permanência da espuma em função do tempo, observado através de uma menor diminuição da altura da coluna de espuma em 60 minutos, em relação às espumas das saponinas e do Poli.80.

Sabe-se que a manutenção dos novos filmes interfaciais originados durante a formação da espuma depende das suas propriedades interfaciais, as quais são as responsáveis pela maior ou menor permanência da espuma em função do tempo (TCHOUKOV *et al.*, 2004).

Uma vez que as propriedades de dilatação interfacial controlam principalmente o processo de ruptura dos filmes líquidos e influenciam diretamente no tempo de vida das espumas (HARVEY *et al.*, 2005), as características viscoelásticas dos filmes interfaciais formadas por LSS, poderiam explicar a maior estabilidade da sua espuma em relação às saponinas e Poli. 80.

A viscoelasticidade dos filmes superficiais das saponinas estaria vinculada também a estabilidade das suas espumas, como pôde-se verificar pela maior estabilidade da espuma do produto purificado (Fr.7090) em relação a do EXL.

Estudos demonstram que tensoativos contendo grupos polares mais hidratados formam filmes mais estáveis, devido à sua alta taxa de difusão na interface ar-água, ou devido ao alto grau de ligação dentro das camadas de água na interface, as quais reduzem a taxa de drenagem (TAN *et al.*, 2005).

A estabilidade da espuma das saponinas (EXL e Fr.7090), LSS e Poli.80 na concentração de 10 CMC, avaliada através da altura da coluna de espuma em um período de 480 minutos, está apresentada na Figura 52.

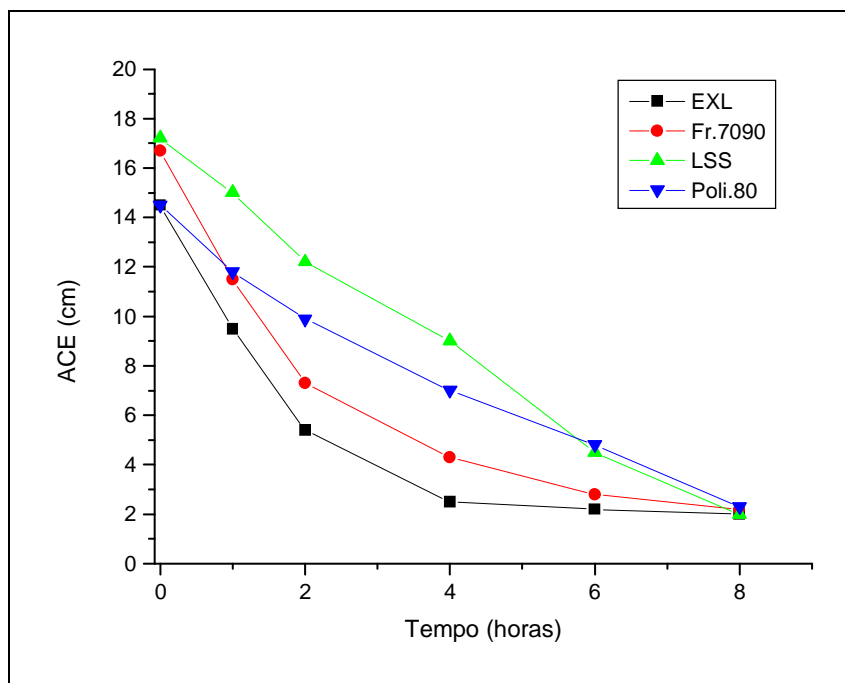


Figura 52. Perfil da estabilidade da espuma do EXL, Fr. 7090, LSS e Poli. 80 na concentração de 10 CMC em 480 minutos.

Pela análise dos resultado, observou-se que o perfil de estabilidade da soluções de saponinas (EXL e Fr. 700) são semelhantes, porém, a espuma da Fr. 7090 apresentou uma estabilidade um pouco superior à espuma do EXL.

Comparando os perfis de estabilidade das espumas de saponinas em relação aos perfis das espumas do LSS e Poli. 80, verifica-se que o decaimento da altura da coluna de espuma do EXL e da Fr. 7090 ocorreu de uma forma menos brusca em relação ao LSS. Isto é, as espumas de saponinas, a partir de 4 horas, apresentaram uma diminuição lenta da altura da espuma, tendendo a uma estabilização após 8 horas de análise. Em comparação a espuma de LSS, esta apresentou uma diminuição mais acentuada e sem tendência à estabilização dentro das 8 horas. A espuma de Poli. 80, porém, apresentou uma queda menos brusca que o LSS, mas não apresentou tendência a estabilização da queda da altura da espuma, como ocorreu com as espumas das saponinas.

Com a finalidade de acompanhar a evolução dos sistemas espumógenos através das modificações das características da espuma em função do tempo, foi realizado um registro fotográfico em determinados intervalos de tempo.

A visualização fotográfica da espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80 na coluna de vidro, estão apresentadas nas Figuras 53, 54 e 55.

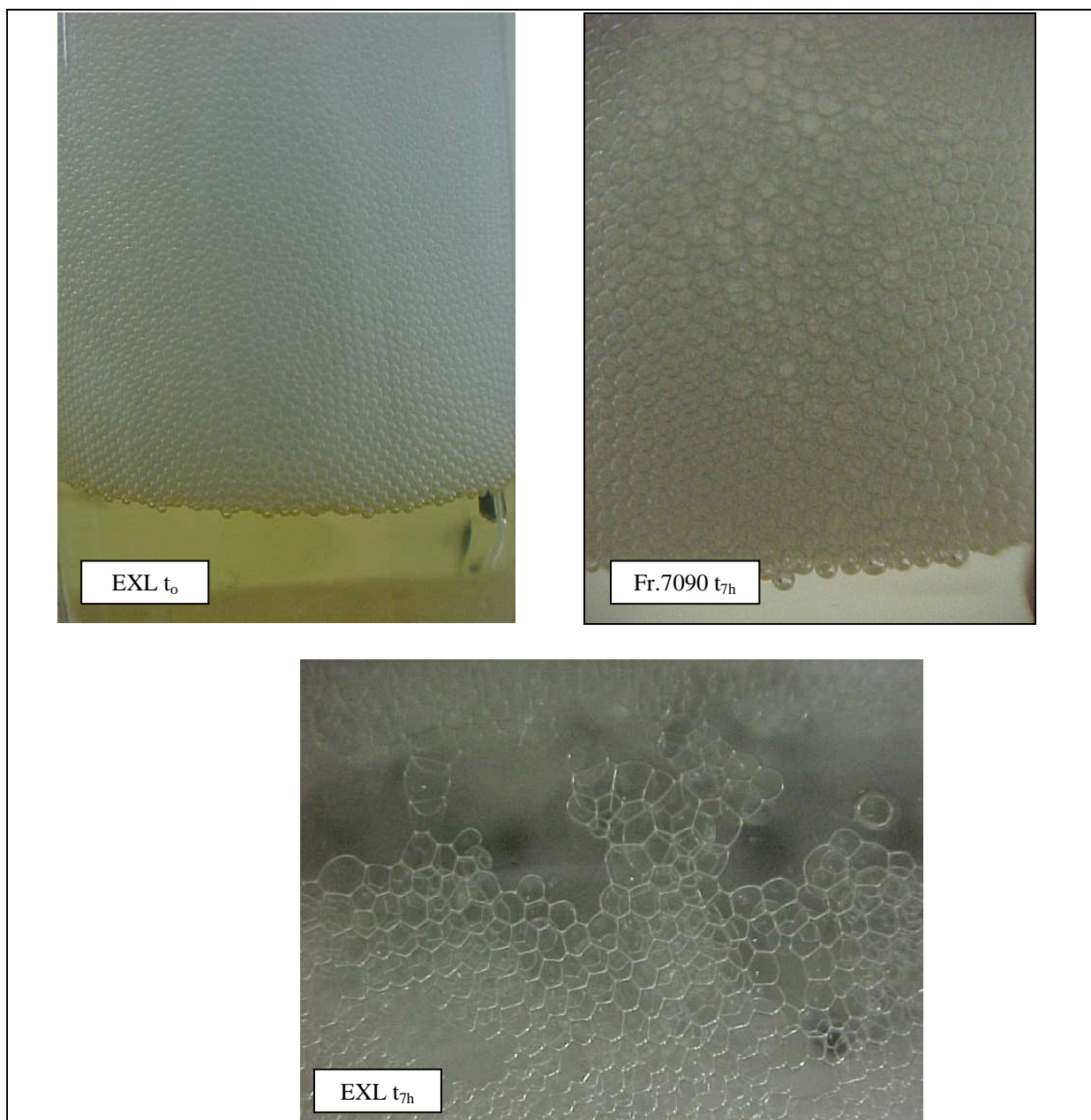


Figura 53. Carcterísticas da espuma do EXL e da Fr. 7090 após 7 horas.

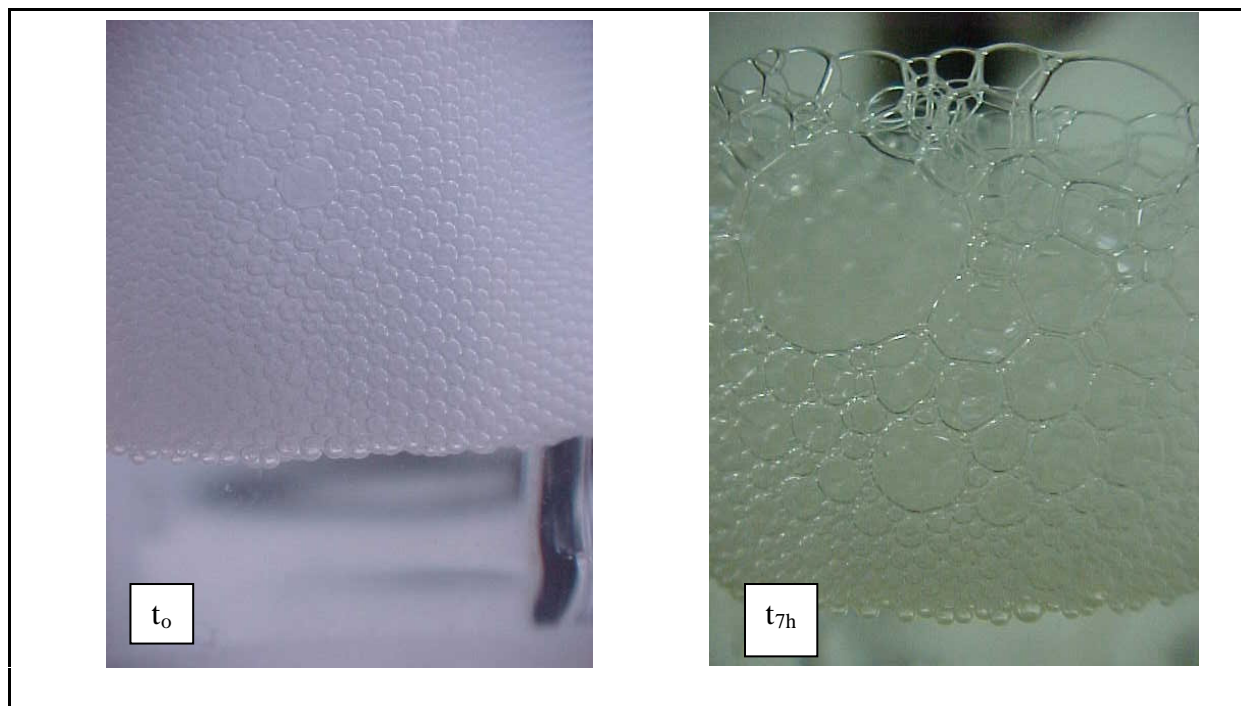


Figura 54. Características da espuma do Poli. 80 no tempo zero e após 7 horas.

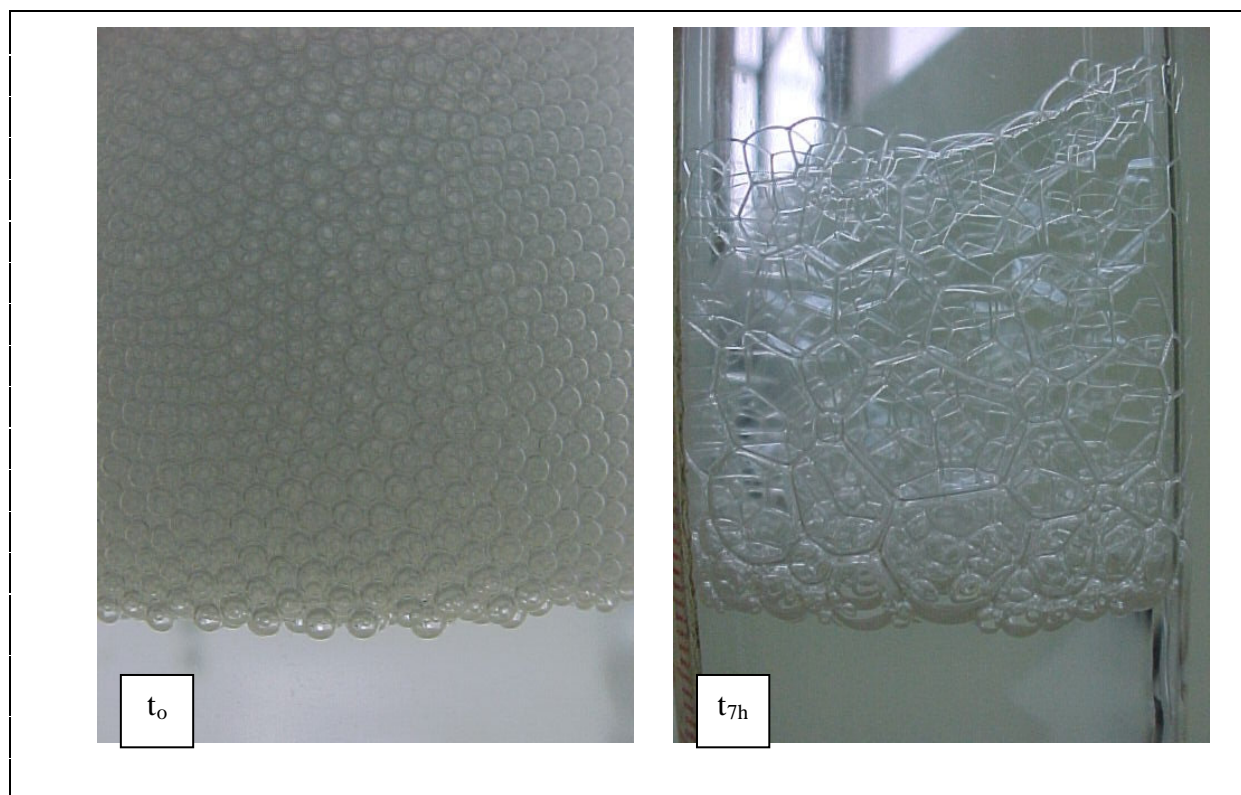


Figura 55. Características da espuma do LSS nos tempos zero e após 7 horas.

Pela avaliação das imagens, observaram-se diferenças entre as espumas dos tensoativos sintéticos e das saponinas. As espumas do LSS tornam-se com o tempo

cada vez mais translúcidas. Isto é ocasionado pelo constante processo de drenagem, o qual promove o afinamento progressivo dos filmes interfaciais. No entanto, a manutenção destes finos filmes interfaciais é devido, principalmente, as propriedades de elasticidade superficial destes filmes. De acordo com a literatura, os filmes superficiais formados por moléculas de LSS, são viscoelásticos (VARDAR-SUKAN, 1998; HARVEY *et al.*, 2005). Esta elasticidade pôde ser comprovada visualmente, a partir da evolução da forma e tamanho das bolhas da espuma com o tempo. Apesar do processo de drenagem na espuma de LSS ocorrer de forma mais rápida que na espuma das saponinas, o que promoveu um rápido aumento do diâmetro das bolhas como consequência da diminuição do espaço interfacial, a espuma produzida pelo LSS permaneceu estável por um período de 300 segundos até o seu colapso total.

A evolução das espumas formadas pelo Poli. 80, por outro lado, mostrou um fenômeno de coalescência em grau muito maior que as espumas de LSS e das saponinas. Este fenômeno é descrito para filmes interfaciais menos estáveis, que colapsam mais rapidamente com o tempo. Assim, uma forte coalescência causa uma pronunciada aceleração da drenagem e tempos de vida menores para a espuma (HILGENFELDT *et al.*, 2001).

As saponinas, no entanto, apresentaram um comportamento espumógeno diferenciado. A evolução da espuma ocorre sem a presença marcante da coalescência e sem um aumento significativo do diâmetro das bolhas, mantendo-se praticamente, inalterado com o tempo. O que ocorre, é o rompimento de algumas bolhas, as quais produzem halos no interior da espuma. Este comportamento sugere um filme interfacial de menor elasticidade, comparado aos de LSS. No entanto, uma espuma residual de 3 a 4 cm produzida pelas saponinas é capaz de permanecer por um período maior que 24 horas, sem alteração na altura do líquido na base da coluna, sugerindo que os filmes formados pelas moléculas de saponinas apresentam uma maior viscosidade de cisalhamento superficial que os filmes formados pelas moléculas de LSS ou Poli. 80.

4.4.3. Avaliação do efeito de eletrólitos no perfil espumógeno das saponinas

4.4.3.1. Determinação do pH das soluções de eletrólitos à força iônica de 0,024 M.

Os valores do pH das soluções de eletrólitos ($I = 0,024M$) estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores do pH das soluções de eletrólitos à força iônica de 0,024 M

Solução Eletrólito	NaCl	KBr	KNO ₃	MgCl ₂	Na ₂ HPO ₄
pH ($\bar{X} \pm s$)	7,29 \pm 0,02	7,44 \pm 0,01	7,10 \pm 0,0	6,53 \pm 0,14	10,55 \pm 0,0

Os resultados mostram valores próximos da neutralidade, exceto no caso da solução de fosfato de sódio dibásico, a qual apresentou um pH alcalino, devido a necessidade da adição de NaOH para o ajuste do pH da solução para a manutenção da força iônica em 0,024 M.

4.4.3.2. Determinação do pH das soluções tensoativas na presença de eletrólitos

Os valores do pH das soluções tensoativas de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80 a 10 CMC na presença de eletrólitos, com força iônica de 0,024 M, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores do pH das soluções tensoativas na presença de eletrólitos à concentração de 10 CMC.

Eletrólitos (0,024 M)	pH (20 ± 2 °C) ($\bar{X} \pm s$)			
	EXL	Fr.7090	LSS	Poli. 80
Sem eletrólito	6,28 ± 0,049	6,20 ± 0,132	7,61 ± 0,052	7,55 ± 0,080
NaCl	6,32 ± 0,07	6,37 ± 0,020	7,36 ± 0,025	6,83 ± 0,063
KBr	6,68 ± 0,036	6,81 ± 0,01	7,79 ± 0,017	7,16 ± 0,065
KNO ₃	6,91 ± 0,049	6,70 ± 0,060	7,32 ± 0,005	7,23 ± 0,073
MgCl ₂	5,97 ± 0,080	6,28 ± 0,05	6,94 ± 0,145	6,55 ± 0,011
Na ₂ HPO ₄	9,00 ± 0,005	9,17 ± 0,072	10,53 ± 0,02	8,83 ± 0,01

Pelos valores do pH das soluções tensoativas com e sem eletrólitos, nota-se que apresentam valores próximos de pH, dentro de uma mesma faixa.

Teoricamente, as soluções tensoativas de origem natural e sintética nas concentrações utilizadas neste experimento, não deveriam afetar o pH das soluções. Considerando as soluções de eletrólitos derivadas de ácidos fortes e bases fortes, o pH esperado é próximo da neutralidade e sem efeito tampão considerável. No caso da solução de fosfato dibásico de sódio, pela sua própria natureza tamponante, seria esperada a invariabilidade no pH. Contudo, os deslocamentos do pH para a região alcalina, observados para as soluções de LSS, Poli.80, EXL e Fr.7090 mostram que a capacidade tamponante da solução de fosfato dibásico de sódio à 0,024 M foi ultrapassada ou o grau de dissociação alterado, segundo a natureza da solução tensoativa.

4.4.3.3. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre a drenagem e espumabilidade das soluções de saponinas

4.4.3.3.1. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre o perfil de drenagem das espumas das saponinas

O efeito da adição de eletrólitos sobre os perfis de drenagem das soluções do EXL, Fr.7090, Poli.80 e LSS, avaliado através do volume de líquido retido na espuma em função do tempo (VLE_{t_0} e $VLE_{t_{1h}}$), estão apresentados nas Tabelas 14.

TABELA 14. Efeito dos eletrólitos sobre a drenagem das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli.80 na concentração de 10 CMC e força iônica de 0,024 M, no tempo inicial (VLE_{t_0}) e após 60 minutos ($VLE_{t_{1h}}$).

Parâmetros	eletrólitos	EXL	Fr.7090	LSS	Poli. 80
VLE_{t_0} (%) ($\bar{X} \pm s$)	Sem eletrólito	92,9 ± 0,21	96,2 ± 0,13	57,1 ± 0,56	57,1 ± 0,07
	NaCl	100,0 ± 0,0	95,2 ± 0,0	63,3 ± 0,05	57,1 ± 0,14
	KBr	81,0 ± 0,14	100,0 ± 0,0	76,2 ± 0,17	61,9 ± 0,56
	KNO ₃	95,2 ± 0,14	97,6 ± 0,07	54,8 ± 0,21	66,7 ± 0,49
	MgCl ₂	64,3 ± 0,07	83,3 ± 0,07	52,4 ± 0,14	54,3 ± 0,14
	Na ₂ HPO ₄	83,3 ± 0,07	90,5 ± 0,28	95,2 ± 0,07	54,8 ± 0,56
$VLE_{t_{1h}}$ (%) ($\bar{X} \pm s$)	Sem eletrólito	12,0 ± 0,07	15,2 ± 0,08	7,1 ± 0,07	9,5 ± 0,04
	NaCl	9,5 ± 0,0	4,8 ± 0,0	6,2 ± 0,04	7,1 ± 1,42
	KBr	9,5 ± 0,0	9,5 ± 0,0	3,3 ± 0,05	9,5 ± 0,07
	KNO ₃	9,5 ± 0,0	4,8 ± 0,0	4,8 ± 0,0	7,1 ± 0,03
	MgCl ₂	4,8 ± 0,0	4,8 ± 0,0	6,2 ± 0,03	9,0 ± 0,07
	Na ₂ HPO ₄	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,0	12,0 ± 0,0	6,2 ± 0,05

Pela análise dos resultados, pode-se concluir que a espuma produzida pelas soluções de saponinas (EXL e Fr. 7090), sem a adição de eletrólitos apresentou uma maior porcentagem de líquido retido no tempo zero (VLE_{T_0} %) em relação aos tensoativos sintéticos. A adição de eletrólitos às soluções tensoativas, no entanto, influenciou de maneira tanto positiva como negativamente o VLE_{T_0} (%) nas espumas

de saponinas, em relação as espumas do LSS e Poli. 80. Esta influência sobre as espumas de saponinas, pôde ser melhor constatada após 60 minutos, através dos baixos valores de $VLE_{T1h}(\%)$, o que significa que a adição de eletrólitos promoveu uma aceleração do processo de drenagem nas espumas das saponinas sendo em maior grau nas espumas da Fr. 7090.

O efeito dos eletrólitos sobre o perfil de drenagem da solução da Fr.7090 na concentração de 10 CMC, expresso através do volume de líquido retido na espuma ($VLE\%$), está apresentado na Figura 56.

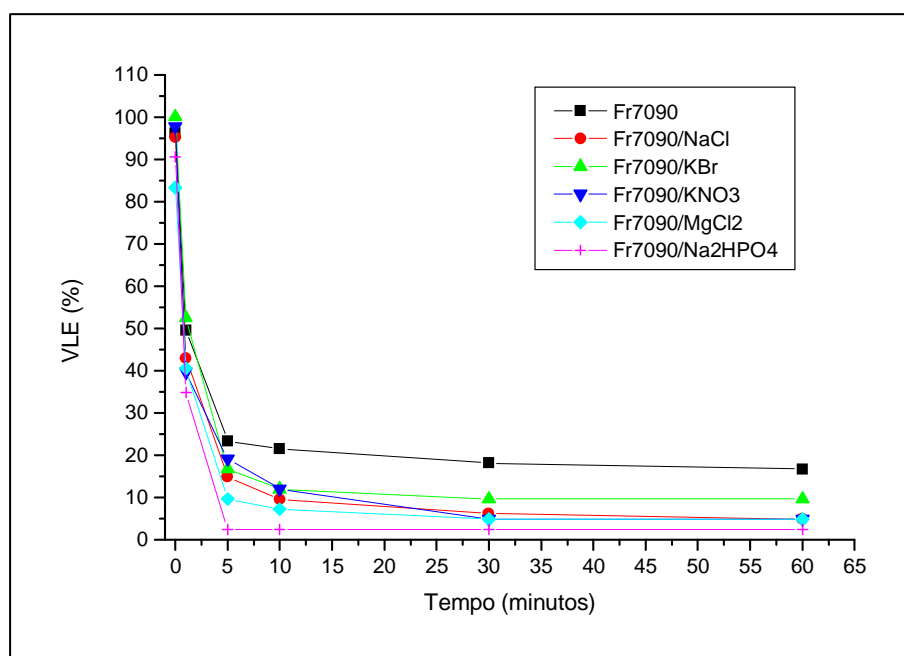


Figura 56. Perfil de drenagem da espuma da Fr. 7090 (10 CMC) sob a influência de eletrólitos ($I = 0,024M$).

Nos primeiros cinco minutos de avaliação, pôde ser constatada uma nítida diferença entre os perfis de drenagem das espumas. Entre os eletrólitos adicionados, os que promoveram um maior efeito na aceleração do processo de drenagem da espuma foram: $Na_2HPO_4 > MgCl_2 > NaCl > KNO_3 > KBr$. Este perfil de drenagem foi semelhante para as espumas do EXL.

Tendo em vista que, das propriedades superficiais dos filmes interfaciais, a propriedade de viscosidade de cisalhamento superficial é a que está diretamente

relacionada ao processo de drenagem, entende-se, deste modo, que a adição de eletrólitos às soluções de saponinas tenha interferido diretamente sobre esta propriedade interfacial. Assim, o mecanismo provável pelo qual ocorreu a desestabilização das espumas de saponinas na presença de eletrólitos, se deva a desidratação dos seus grupos polares na região interfacial, gerando com isso, uma mais rápida drenagem na espuma destas soluções.

4.4.3.3.2. Avaliação do efeito de eletrólitos sobre a espumabilidade das saponinas

O efeito do eletrólitos ($I = 0,024$ M) sobre a espumabilidade das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80 na concentração de 10 CMC, expresso através da altura da coluna de espuma no tempo zero (ACE_{t_0}), estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Efeito da adição de eletrólitos ($I = 0,024$ M), sobre a espumabilidade das soluções de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli. 80 na concentração de 10 CMC.

Eletrólitos (0,024 M)	ACE_{t_0} (cm) ($\bar{X} \pm s$)			
	EXL	Fr.7090	LSS	Poli. 80
Sem eletrólito	14,5 ± 2,03	16,7 ± 1,16	17,2 ± 0,14	14,5 ± 0,83
NaCl	16,5 ± 0,56	16,6 ± 0,35	14,9 ± 0,70	15,0 ± 1,60
KBr	15,7 ± 1,41	16,9 ± 0,21	16,7 ± 0,45	15,6 ± 0,63
KNO ₃	16,4 ± 1,27	16,7 ± 0,98	15,6 ± 0,62	16,8 ± 0,70
MgCl ₂	14,0 ± 0,42	14,2 ± 0,70	15,1 ± 2,05	15,0 ± 2,61
Na ₂ HPO ₄	15,0 ± 0,42	15,2 ± 0,77	17,0 ± 0,07	16,1 ± 0,07

No que refere à espumabilidade das soluções da Fr. 7090, expresso pela altura da coluna de espuma no tempo zero (ACE_{t_0}), verificou-se que a adição de cloreto de sódio, brometo de potássio e nitrato de potássio não influenciou a produção de espuma, sendo esta semelhante à solução sem eletrólitos, enquanto que a adição de cloreto de magnésio e fosfato dibásico de sódio, produziu menor formação de espuma.

Com relação ao EXL, pela análise do desvio padrão da solução sem eletrólitos, constatou-se que a adição de eletrólitos à solução não influenciou o grau de espumabilidade do EXL.

A adição de eletrólitos à solução de LSS, sendo este um tensoativo iônico, levou em geral a uma menor produção de espuma.

A presença de eletrólitos pode ter ocasionado, uma maior estabilidade das micelas de LSS, o que produziu uma menor espumabilidade no tempo zero que a solução de LSS sem eletrólito.

A presença de eletrólitos nas soluções de Poli. 80, não produziu alterações no grau de espumabilidade na solução. Sendo o Poli.80 um tensoativo não-iônico, a presença de íons na concentração empregada experimentalmente, não exerceria influência significativa (SCHICK, 1997; HUNTER, 2002).

4.4.3.4. O efeito dos eletrólitos sobre a estabilidade da espuma das saponinas

O efeito da adição de eletrólitos sobre a estabilidade das espumas de EXL, Fr.7090, LSS e Poli. 80, expresso através da altura da coluna de espuma em 60 minutos, está apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Efeito da adição de eletrólitos ($I = 0,024 \text{ M}$), sobre a estabilidade das espumas do EXL, Fr. 7090, LSS e Poli. 80 à 10 CMC durante 60 minutos.

Eletrólitos (0,024 M)	ACE _{t1h} (cm) ($\bar{X} \pm s$)			
	EXL	Fr.7090	LSS	Poli. 80
Sem eletrólito	9,5 ± 1,10	11,5 ± 0,45	15,0 ± 0,77	11,8 ± 0,77
NaCl	5,7 ± 2,47	3,0 ± 0,0	10,4 ± 0,45	12,0 ± 1,42
KBr	2,8 ± 0,21	2,7 ± 0,35	9,3 ± 1,85	12,6 ± 1,34
KNO ₃	2,1 ± 0,07	1,3 ± 0,21	11,7 ± 1,82	13,0 ± 1,06
MgCl ₂	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,14	12,0 ± 1,55	11,7 ± 2,38
Na ₂ HPO ₄	0,2 ± 0,07	0,62 ± 0,01	13,7 ± 0,35	12,1 ± 0,03

Observou-se pelos resultados, uma influência negativa dos eletrólitos sobre a estabilidade das espumas produzidas pelas saponinas, havendo em 60 minutos uma destruição quase completa do sistema espumógeno tanto para o EXL como para a Fr. 7090. Quanto ao LSS, a presença de eletrólitos às soluções também promoveu uma diminuição na estabilidade das espumas, porém, em menor intensidade em comparação às saponinas. A adição de eletrólitos às soluções de Poli. 80, não influenciou a estabilidade das espumas.

A adição de eletrólitos nas soluções de EXL e Fr.7090 promoveu um efeito desestabilizador na espuma, o que indica que as interações entre as moléculas do tensoativo e os íons alteraram as propriedades dos filmes interfaciais.

Neste sentido, devido à capacidade de dessolvatação dos íons, este fato sugere que o mecanismo pelo qual ocorreu a desestabilização das espumas de saponinas se deva, principalmente à desidratação dos seus grupos polares nas interfaces ar-líquido. Este fato, foi demonstrado através da maior diminuição da altura da coluna de espuma em função do tempo, das espumas da Fr. 7090 com a adição de eletrólitos.

Em relação ao LSS, o fato de ser um tensoativo aniônico, a adsorção deste aumenta a estabilidade cinética da espuma pelo aumento da repulsão eletrostática entre as interfaces ar-água, retardando o afinamento do filme (PANDEY *et al.*, 2003). A drenagem dos finos filmes líquidos de tensoativos aniônicos na presença de eletrólitos inorgânicos, inicialmente ocorre rapidamente e então lentamente atingem uma espessura de equilíbrio (MATSUMOTO *et al.*, 1978).

A avaliação da espessura do filme em função do tempo de uma solução de LSS à concentração de 10^{-5} M na presença de 4×10^{-4} M de NaCl, foi avaliado por WANG e YOON, (2006). Os resultados demonstraram que com a adição de sal, a espessura diminuiu de 175 nm para em torno de 80 nm nos primeiros 10 segundos, mantendo-se constante esta espessura durante o tempo de 45 segundos da avaliação.

Pelo exposto, as soluções de saponinas aproximam-se ao perfil dos tensoativos não-iônicos, uma vez que a influência dos eletrólitos ocorreu principalmente a nível do grau de solvatação, tanto micelar como molecular destes tensoativos, e não por um efeito eletrostático de interação na dupla camada elétrica, o que caracteriza o

mecanismo de estabilização dos tensoativos iônicos (SCHICK, 1997; FLORENCE, 2003).

O efeito dos eletrólitos sobre a estabilidade da solução da Fr.7090 (10 CMC), expresso através da altura da coluna de espuma em função do tempo, está demonstrado na Figura 57.

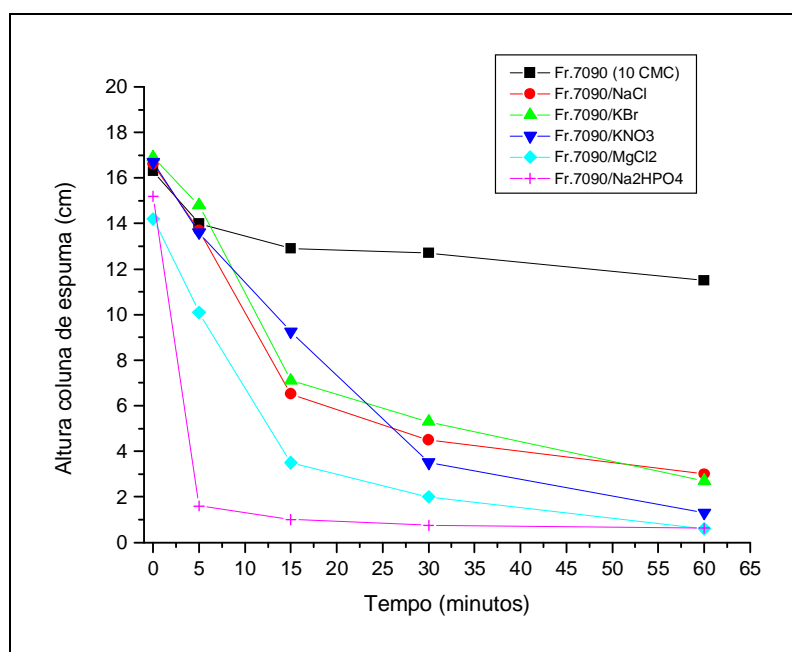


Figura 57. Perfil de estabilidade da espuma da Fr.7090 (10 CMC) sob a influência de eletrólitos à força iônica de 0,024 M

Pela análise gráfica, observou-se que a presença de eletrólitos à solução da Fr.7090, influenciaram negativamente a estabilidade da espuma, como demonstra a altura da coluna de espuma em função do tempo. Entre os eletrólitos testados, o cloreto de magnésio e o fosfato de sódio dibásico apresentaram um maior efeito desestabilizador da espuma.

Considerando a intensa atividade espumógena e a estabilidade da espuma das saponinas, VOCHTEN e colaboradores (1967) avaliaram a influência de alguns cátions e ânions sobre a estabilidade da espuma de uma sapoalbina, um glicosídeo triterpênico derivado do ácido oleanólico extraído das raízes de *Gypsophila struthium* L. Os resultados indicaram uma queda regular da estabilidade da espuma com o aumento da concentração dos eletrólitos. Neste caso específico, o K^+ produziu a menor

queda na estabilidade e, entre os ânions avaliados, o NO_3^- , produziu a menor queda da estabilidade, seguido pelo SO_4^{2-} e após pelo Cl^- . Estes resultados estão de acordo, aos encontrados quanto a estabilidade da Fr.7090 sob a influência dos eletrólitos. Em relação aos cátions, a estabilidade da espuma também diminuiu com o aumento da valência.

4.4.3.5. Determinação do potencial zeta das soluções da Fr.7090

Para melhor elucidar o efeito da adição de eletrólitos sobre o comportamento espumógeno da Fr. 7090 foram realizadas medidas do potencial zeta destas soluções, e comparado a solução sem eletrólitos.

Os valores do potencial zeta das soluções da Fr.7090, contendo diferentes eletrólitos ($I = 0,024 \text{ M}$), estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores do potencial zeta das soluções da Fr. 7090 sob a influência de eletrólitos na força iônica de 0,024 M.

	Fr.7090	Fr.7090/ NaCl	Fr.7090/ KBr	Fr.7090/ KNO₃	Fr.7090/ MgCl₂	Fr.7090/ Na₂HPO₄
Potencial zeta (mV)	-22,3 ± 1,38	-3,07 ± 1,38	-2,02 ± 0,66	-23,56 ± 4,10	-6,22 ± 3,34	-34,8 ± 7,73

Os resultados demonstraram, que a presença de NaCl, KBr e MgCl₂, produziram um aumento do potencial zeta da solução da Fr. 7090, enquanto a adição de KNO₃ não alterou o potencial, e a presença de Na₂HPO₄ produziu uma diminuição do potencial da solução. O KNO₃ é considerado um eletrólito inerte do ponto de vista eletroquímico, não sendo esperado, portanto, uma influência sobre o potencial zeta.

A estabilidade da espuma é grandemente determinada pela pressão de disjunção dos filmes líquidos entre as bolhas de ar em contato. Assim, uma pressão positiva estabiliza a espuma, enquanto uma pressão negativa desestabiliza-a. Em geral uma pressão positiva surge das forças repulsivas da dupla camada, enquanto a pressão negativa se origina das forças atrativas de van der Waals e possivelmente da força

hidrofóbica. Deste modo, dependendo do equilíbrio entre estas forças, os filmes interfaciais podem atingir uma espessura de equilíbrio ou uma espessura crítica de ruptura (WANG e YOON, 2006). Neste sentido, as interações de ordem eletrostática, sejam de repulsão ou atração entre os grupos polares das saponinas, influenciaram em maior ou menor grau, porém, negativamente a estabilidade dos filmes interfaciais.

4.4.3.6. Avaliação da resistência da espuma

Esta avaliação foi realizada de acordo com o experimento descrito no ítem 4.2.2.2, o qual se baseia na velocidade de queda de uma esfera ao longo da coluna de espuma.

Os resultados da resistência da espuma das soluções de saponinas, bem como das soluções dos tensoativos sintéticos, estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Velocidade de queda da esfera na espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli.80 à 10 CMC e sob aforça iônica de 0,024M.

Eletrólitos (0,024 M)	Velocidade de queda da esfera (cm/seg)			
	(□X ± s)			
	EXL	Fr.7090	LSS	Poli.80
Sem eletrólito	4,6 ± 0,07	2,8 ± 0,5	0,8 ± 2,8	0,8 ± 0,89
NaCl	2,1 ± 1,5	11,5 ± 1,01	0,7 ± 3,2	1,1 ± 1,45
KBr	4,4 ± 2,8	15,8 ± 0,07	1,0 ± 1,3	1,1 ± 2,40
KNO ₃	5,7 ± 1,4	8,0 ± 1,4	0,9 ± 0,7	0,9 ± 0,44
MgCl ₂	15,8 ± 0,8	42,5 ± 0,03	0,8 ± 0,2	1,2 ± 1,10
Na ₂ HPO ₄	7,4 ± 0,63	46,5 ± 0,07	1,0 ± 0,4	1,3 ± 1,09

A resistência da espuma demonstrou que entre as soluções tensoativas sem eletrólitos, as espumas de LSS e Poli.80 apresentaram uma menor velocidade de queda da esfera, ou seja, uma maior resistência da espuma comparado as espumas de saponinas.

Na solução de LSS, observou-se que a presença de eletrólitos influenciou de modo geral, positivamente sobre a maior resistência dos filmes quanto ao estiramento localizado, ou seja, interferiu diretamente sobre a elasticidade superficial destes filmes.

Entre os eletrólitos adicionados à solução de LSS, o Na_2HPO_4 foi o que influenciou mais positivamente sobre a resistência dos filmes. Este fato é devido, aos átomos de hidrogênio destes ácidos serem capazes de formarem ligações hidrogênio com os grupos sulfato (SO_4^{--}) do LSS. Uma vez que uma molécula de H_3PO_4 pode realizar três ligações hidrogênio, estas são capazes de interconectar os grupos polares vizinhos das moléculas de LSS no filme interfacial mais estreitamente, o que leva a um aumento da elasticidade superficial, viscosidade e estabilidade cinética dos filmes das espumas (ANGARSKA, *et al.*, 1998). Este efeito positivo do Na_2HPO_4 foi demonstrado também, sobre os perfis de drenagem e de estabilidade da espuma de LSS.

A influência de contraíons bivalente como o Mg^{2+} neste caso, está correlacionado aos dois maiores efeitos da estabilidade dos filmes de espuma. Primeiro pelo aumento da elasticidade superficial e viscosidade devido às conexões entre os grupos polares vizinhos dos tensoativos produzido pelo Mg^{2+} , e segundo pelo aumento da atração de correlação iônica entre as superfícies dos filmes (ANGARSKA *et al.*, 1998).

Quanto a presença de eletrólitos nas soluções tensoativas de Poli. 80, não se observou alteração significativa na resistência da espuma. Este fato, vem ao encontro da pequena influência dos eletrólitos sobre os filmes superficiais dos tensoativos não-iônicos (SCHICK, 1987; HUNTER, 2002).

No entanto, o efeito de eletrólitos nas espumas de EXL e Fr.7090 influenciaram, de um modo geral, negativamente a resistência da espuma, sendo nas espumas da Fr. 7090 em maior intensidade.

Com a finalidade de melhor avaliar a resistência da espuma, foi realizado o experimento em uma maior concentração das soluções tensoativas. A concentração empregada foi de 25 CMC.

O resultado da resistência da espuma, expressa pela velocidade de queda da esfera nas espumas de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli. 80 à 25 CMC, estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19. Velocidade de queda da esfera na espuma das soluções de EXL, Fr.7090, LSS e Poli.80 em 25 CMC.

	Velocidade de queda da esfera (cm/seg)			
	$(\bar{X} \pm s)$			
	EXL	Fr.7090	LSS	Poli.80
Sem eletrólito	< 0,06 ± 0,0	< 0,06 ± 0,0	1,0 ± 0,9	0,7 ± 2,14

Pelos resultados, verificou-se que em 25 CMC as soluções de saponinas apresentaram uma alta resistência da espuma, como demonstrado pela baixíssima velocidade de queda da esfera. Após 24 horas, a esfera ainda permanecia sob uma altura de 3 cm de espuma. No entanto, para as soluções de LSS e Poli.80, não se observou alteração significativa da velocidade pelo aumento da concentração. Assim, 25 CMC representa para as soluções de LSS e Poli.80 uma concentração de 6,25% e 1,62%, contra 2,5% e 0,65% a 10 CMC, respectivamente. Para as soluções de EXL e Fr. 7090, 25 CMC representa uma concentração de 0,25 % contra 0,1 % para 10 CMC, respectivamente.

Deste modo, as espumas de LSS e Poli.80 já apresentaram a 10 CMC uma capacidade de formar filmes superficiais suficientemente estáveis capazes de resistirem à perturbações e oscilações externas. No entanto, a 25 CMC, a solução de saponinas corresponde a uma concentração 25 vezes menor que a de LSS e 6,5 vezes a de Poli. 80.

Tendo em vista a maior estabilidade das espumas de saponinas a 25 CMC, foi realizado a avaliação do tempo de queda da esfera nesta concentração sob o efeito de eletrólitos. Os resultados demonstraram que independente do eletrólito adicionado, o tempo de queda de esfera não sofreu alteração com o tipo de eletrólito, com tempos de queda superiores também a 5 horas.

Neste sentido, o aumento da concentração de saponinas na solução, possibilitou uma maior adsorção de tensoativo nas interfaces ar-água (BHAKTA e RUCKENSTEIN, 1997), interferindo, deste modo, diretamente sobre as propriedades de elasticidade e viscosidade dos filmes superficiais (TAN *et al.*, 2005).

4.4.3.7. Determinação da viscosidade

Os resultados da viscosidade das soluções de EXL, Fr. 7090, LSS e Poli. 80 na concentração de 0,25% em viscosímetro capilar de Ostwald, estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Viscosidade das soluções tensoativas a 0,25% em viscosímetro capilar de Ostwald.

	Água destilada	LSS ($\bar{X} \pm s$)	Polis. 80 ($\bar{X} \pm s$)	EXB ($\bar{X} \pm s$)	P6 ($\bar{X} \pm s$)	Fr. 7090 ($\bar{X} \pm s$)
Viscosidade (Cp), 20 °C	0,990 ± 0,05	1,010 ± 0,04	1,024 ± 0,02	1,023 ± 0,03	1,015 ± 0,01	1,018 ± 0,02

Segundo a teoria, as características de drenagem de uma espuma são influenciadas pela viscosidade superficial e do meio (VARDAR-SUKAN, 1998). Nesse sentido, a análise da viscosidade das soluções testadas foi realizada com o intuito de estabelecer uma relação entre os perfis de drenagem destas soluções. No entanto, pelos resultados da análise, pôde-se observar valores muito próximos entre as viscosidades das soluções, não sendo possível, portanto, estabelecer uma correlação direta entre a viscosidade do meio aos diferentes comportamentos de drenagem apresentados por estas espumas.

4.4.3.8. Avaliação da influência dos eletrólitos sobre o tamanho das micelas das saponinas.

Com a finalidade de estabelecer uma relação entre as características micelares, quanto ao tamanho dos agregados moleculares e os perfis espumógenos das soluções tensoativas, como também pela presença de eletrólitos, foram realizadas medidas por espalhamento de luz dinâmico (ELD)

O tamanho dos diâmetros micelares obtidos por espalhamento de luz dinâmico (ELD), nas soluções de EXL e da Fr.7090 e sob a influência de eletrólitos, estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para soluções de EXL e Fr. 7090 e na presença de eletrólitos.

Sol. tensoativa (10 CMC)/ eletrólitos (0,024 M)		Parâmetros		
		Diâmetro efetivo (nm) ($\bar{X} \pm s$)	Polidispersão ($\bar{X} \pm s$)	Coefficiente de difusão ($\square X *10^{-8} \pm s$)
EXL	Sem eletrólito	168,4 ± 11,38	0,3901 ± 0,027	2,050 ± 0,095
	NaCl	126,2 ± 2,41	0,3137 ± 0,080	2,352 ± 0,193
	KBr	178,4 ± 3,45	0,3821 ± 0,064	1,984 ± 0,142
	KNO ₃	171,3 ± 4,12	0,2897 ± 0,087	1,950 ± 0,109
	MgCl ₂	164,4 ± 4,33	0,3456 ± 0,034	2,229 ± 0,108
	Na ₂ HPO ₄	128,6 ± 2,51	0,2691 ± 0,026	2,021 ± 0,142
Fr. 7090	Sem eletrólito	166,6 ± 10,2	0,3307 ± 0,034	2,213 ± 0,01
	NaCl	159,9 ± 7,40	0,4267 ± 0,065	1,966 ± 0,117
	KBr	166,8 ± 13,5	0,3729 ± 0,035	1,995 ± 0,251
	KNO ₃	109,0 ± 3,05	0,4049 ± 0,037	2,821 ± 0,217
	MgCl ₂	148,3 ± 2,10	0,3567 ± 0,085	2,323 ± 0,311
	Na ₂ HPO ₄	258,4 ± 15,2	0,3700 ± 0,157	1,398 ± 0,221

Para as análises por ELD das soluções tensoativas foi utilizado uma concentração equivalente a dez vezes o valor da sua CMC (10 CMC), como uma forma de padronização.

O valor de 10 CMC foi determinado em função de se obter uma margem de segurança quanto a presença de micelas, porém não muito elevado a ponto de haver uma modificação estrutural das micelas, bem como um maior custo em produto.

Existem poucas referências na literatura sobre as dimensões e outras características das micelas das saponinas. MITRA e DUNGAN (1997) analisaram por ELD uma fração purificada de saponinas da quilaia de várias origens comerciais (Sigma®, Across® e Penco®), e encontraram para as saponinas da Penco®, uma distribuição ampla de tamanho de partícula, desde micelas nanométricas até micelas com um tamanho médio na ordem de 0,1 μm . A presença destas últimas, foi relacionada à possível presença de componentes insolúveis dentro do material comercial, os quais coexistiriam como grandes agregados com as saponinas da quilaia, formando uma micela solúvel. O forte espalhamento resultante destes grandes agregados, limitou a quantificação exata do tamanho das micelas. Os autores propuseram que estas impurezas teriam atividade de superfície, uma vez que em outro experimento, a adição de sais biliares, os quais formam micelas mistas com as saponinas, possibilitou a formação de agregados na forma de discos/bastões. Acredita-se que os tensoativos dos sais biliares reduzam o impedimento estérico presente nas micelas de saponinas não mistas, permitindo a formação de micelas mistas não esféricas. Por outro lado, a presença de impurezas sem atividade superficial atuaria reprimindo o crescimento da micela e a conseqüente incorporação de solutos.

As saponinas de *Ilex paraguariensis* apresentaram um diâmetro micelar médio em torno de 167,5 nm (EXB e Fr.7090) havendo uma boa reprodutibilidade nos valores das medidas para todas as amostras analisadas, conforme evidenciam os desvios padrões e os índices de polidispersão (0,390 e 0,331) respectivos. Estes últimos foram claramente maiores do que os observados para o Poli.80 (0,282) e seriam, a princípio, próprios de misturas ou sistemas polidispersos. Neste sentido, a possibilidade da inclusão de substâncias insolúveis com ou sem atividade superficial,

resultaria em tamanhos de partículas com uma faixa de distribuição mais ampla, o que não foi observado.

Pelos resultados, pôde-se constatar que independente da presença de eletrólitos, as micelas de saponinas presentes tanto no EXL como na Fr. 7090 apresentaram diâmetros micelares semelhantes. Assim, no EXL, apenas nas soluções contendo NaCl e Na₂HPO₄ o diâmetro das micelas foram significativamente menores. Quanto à Fr.7090, a presença de KNO₃ produziu micelas com diâmetros significativamente menores, enquanto que a presença de Na₂HPO₄, ao contrário do EXL, resultou em micelas de diâmetro maior.

Estes resultados apresentam certa semelhança com os relatados para as saponinas da quilaia, para as quais foi observado que a variação de NaCl no meio aquoso parece não afetar significativamente o tamanho das micelas das saponinas (MITRA e DUNGAN, 1997), como também para outros tensoativos baseado em açúcares, os quais demonstram uma grande tolerância para eletrólitos (COPPLOLA *et. al*, 2002).

Alguns estudos revelam a formação de agregados relativamente grandes para das saponinas da *Quillaja saponaria* Molina, com um número de agregação em torno de 33 a 65 moléculas por micela (MITRA E DUNGAN, 1997; SARNTHEIN-GRAF e LA MESA, 2004). Os grupos polares destas saponinas são fortemente hidratados, indicando aproximadamente 30 moléculas de água por unidade de saponina envolvidas na hidratação. Também, a autodifusão encontrada indicou a ocorrência de hidratação micelar significativa. Este comportamento não é surpresa se considerarmos o grande número de unidades de açúcar presente nestas moléculas. No entanto, os métodos hidrodinâmicos não permitem discriminar entre moléculas ligadas firmemente e moléculas de água presas geometricamente, não envolvidas na hidratação (SARNTHEIN-GRAF e LA MESA, 2004).

Com a finalidade de verificar se as dimensões micelares das saponinas estavam relacionadas à concentração, o que poderia promover a formação de estruturas supramicelares, o experimento com a FR.7090 foi repetido empregando diferentes valores de CMC. As concentrações empregadas foram na faixa da CMC, 2 CMC, 10 CMC e 25 CMC.

O resultado dos parâmetros micelares obtidos por ELD para a Fr. 7090 em diferentes valores de CMC, estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores do tamanho micelar e parâmetros relacionados obtidos por ELD para FR.7090 à diferentes valores de CMC.

Solução tensoativa/ concentração		Parâmetros (21,0 ± 0,1 °C)		
		Diâmetro efetivo (nm) ($\bar{X} \pm s$)	Polidispersão ($\bar{X} \pm s$)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
Fr. 7090	CMC	199,4 ± 4,73	0,5653 ± 31,42%	1,7125E-08 ± 0,078
	2 CMC	180,2 ± 2,05	0,6263 ± 24,43%	1,6722E-08 ± 0,28
	10 CMC	160,5 ± 2,22	0,4315 ± 19,40%	2,0222E-08 ± 0,38
	25 CMC	172,6 ± 0,84	0,3389 ± 0,03	2,215E-08 ± 0,01

Pela análise dos resultados, observou-se que o diâmetro encontrado para as micelas das saponinas na faixa de concentração da CMC e de 2 CMC, pode estar associado ao maior grau de hidratação dos monômeros no interior da micela, em relação as concentrações de 10 e 25 CMC, uma vez que, o aumento da concentração, pode ter ocasionado uma maior compactação dos monômeros no interior da micela.

De acordo com a literatura, os dados disponíveis por ELD sobre o tamanho das micelas, tanto dos tensoativos sintéticos como para as saponinas da quilaia, se referem ao raio hidrodinâmico (R_h) e não ao diâmetro efetivo. Tendo em vista que para a determinação do R_h , requer uma análise diferenciada dos dados, a qual não foi realizada neste trabalho e a comparação entre o tamanho micelar das saponinas de *Ilex paraguariensis* com as saponinas da quilaia, não foi possível ser realizada.

Para efeito comparativo, foram realizadas análises do tamanho das micelas das saponinas contidas na fração 50 (Fr. 50). Esta fração representa, dentro do processo de purificação do extrato bruto desenvolvido por PAVEI (2004), uma fração de maior polaridade em relação a Fr.7090.

Os parâmetros micelares obtidos por medidas de ELD para a Fr.50 a 10 CMC, estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Tamanho micelar e parâmetros relacionados obtidos por espalhamento de luz dinâmico para a Fr. 50 na concentração de 10 CMC.

Sol.tensoativa (10 CMC)	Parâmetros (21,0 ± 0,1 °C)		
	Diâmetro efetivo (nm) ($\bar{X} \pm s$)	Polidispersão ($\bar{X} \pm s$)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
Fr. 50	218,5 ± 4,05	0,1816 ± 0,56	1,875E-08 ± 0,03

Pelos resultados constata-se que o diâmetro efetivo das micelas da Fr. 50 foi superior ao encontrado para as micelas do EXL (168,4 nm), Fr. 7090 (166,6 nm), como também da Fr 7090 à 2 CMC (182,9) e 10 CMC (158,0).

Tendo em vista a Fr. 50 conter saponinas mais polares que a Fr. 7090, e o fato da polaridade das saponinas estar associada a um maior número de unidades açúcar na molécula (HOSTETTMANN E MARSTON, 1995), isto reafirma o exposto acima, quanto a influência do grau de hidratação dos seus grupos polares, sobre o diâmetro micelar.

Visando estabelecer comparações das saponinas aos tensoativos sintéticos, as medidas do diâmetro das micelas de LSS e Poli.80, também foram realizadas.

O tamanho das micelas de LSS e Poli. 80 na concentração de 10 CMC e sob a influência dos eletrólitos ($I = 0,024M$), estão apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24. Tamanho micelar e parâmetros relacionados ao ELD para soluções de LSS e Poli. 80, e sob a influência de eletrólitos.

Sol. tensoativa (10 CMC)/ eletrólitos (0,024 M)		Parâmetros (21,0 ± 0,1 °C)		
		Diâmetro efetivo (nm) (X ± s)	Polidispersão (X ± s)	Coefficiente de difusão (X *10 ⁻⁸ ± s)
LSS	Sem eletrólito	230,6 ± 7,31	0,6038 ± 0,077	1,357 ± 0,036
	NaCl	204,2 ± 12,6	0,4900 ± 0,084	1,426 ± 0,018
	KBr	245,5 ± 8,5	0,3889 ± 0,085	1,209 ± 0,24
	KNO ₃	162,0 ± 23,5	0,6596 ± 0,04	1,745 ± 0,42
	MgCl ₂	193,2 ± 0,7	0,6360 ± 0,02	1,592 ± 0,22
	Na ₂ HPO ₄	191,6 ± 3,55	0,8819 ± 0,023	1,421 ± 0,16
Poli. 80	Sem eletrólito	8,7 ± 0,30	0,2822 ± 0,053	3,643 * 10 ⁻⁰⁷
	NaCl	9,5 ± 0,35	0,2543 ± 0,025	3,646 ± 0,019
	KBr	10,4 ± 0,30	0,2655 ± 0,010	34,10 ± 0,377
	KNO ₃	12,2 ± 0,43	0,2405 ± 0,011	23,92 ± 0,30
	MgCl ₂	9,1 ± 0,20	0,2323 ± 0,020	42,31 ± 0,056
	Na ₂ HPO ₄	11,7 ± 0,62	0,1901 ± 0,037	24,51 ± 0,115

A análise dos resultados do diâmetro efetivo das micelas para as soluções sem eletrólitos mostrou que as micelas de LSS apresentaram o maior diâmetro (230,0 nm), seguidas pelas saponinas do EXL e da Fr.7090. Os tamanhos das micelas do EXL (168,4 nm) e da FR.7090 (166,6 nm) foram semelhantes, enquanto que o Poli.80 apresentou o menor diâmetro micelar (8,7 nm) em relação ao LSS e as saponinas.

Para a maioria dos sistemas iônicos em altas concentrações, ocorre uma mudança gradual na forma micelar, há alongação das micelas para formar estruturas cilíndricas ou lamelares (WEICAN *et al.*, 2000).

Análises por microscopia eletrônica de crio-transmissão, espalhamento de nêutrons a baixos ângulos, espalhamento de luz dinâmico e medidas do tempo de resolução de um complexo fluorescente em soluções de LSS na faixa de concentração entre 10 e 80 mM à força iônica de 0,8 M, revelaram a presença de uma variedade de estruturas de agregados, com a transição de micelas pequenas a baixas concentrações, a longas estruturas à altas concentrações de LSS (ALMGREN *et al.*, 1998). O valor da CMC do LSS encontrado neste trabalho foi de 8,58 mM, o que correspondente para 10 CMC uma concentração de 85,8 mM de LSS. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho para o diâmetro efetivo dos agregados micelares de LSS sem a presença de eletrólitos, estão de acordo aos descritos na literatura.

Entretanto, a adição de eletrólitos à solução de LSS resultou, de modo geral, em uma diminuição do diâmetro dos agregados micelares, com exceção do KBr, cuja presença promoveu um maior diâmetro. Comparando-se aos diâmetros encontrados para as saponinas e Poli.80, a presença de eletrólitos apresentou uma maior influência sobre o diâmetro micelar do LSS, o que pode se atribuído ao seu caráter iônico.

O tamanho micelar é controlado pela distância média de aproximação dos contra-íons ao centro de carga do tensoativo, entre outros fatores (PIRES, 2002). Deste modo, o contra-íon associado ao grupo carregado tem um efeito significativo nas propriedades micelares. O efeito é explicado em termos de uma redução na magnitude das forças de repulsão entre os grupos polares na micela e uma conseqüente diminuição no trabalho elétrico na micelização (FLORENCE, 2003). Em geral, quanto mais fracamente hidratado for um contra-íon, maiores serão as micelas formadas pelos tensoativos. Isto se deve ao íon mais fracamente hidratado ser absorvido mais facilmente na superfície micelar e, assim, diminuir a repulsão entre os grupos polares, promovendo, deste modo, uma maior agregação dos monômeros na micela, o que resulta em maiores diâmetros micelares. De um modo geral, o tamanho das micelas de um tensoativo aniônico aumenta quando o contra-íon é trocado de acordo com $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+$ (FLORENCE, 2003). Como observado experimentalmente, sendo o íon K^+ menos hidratado que o íon Na^+ , a adição de KBr à solução de LSS resultou em um maior diâmetro micelar em relação ao NaCl.

A adição de eletrólitos às soluções de Poli. 80 produziu um aumento no tamanho micelar. No entanto, as micelas de polissorbato 80 apresentaram o menor diâmetro comparado às micelas de saponinas e de LSS. As micelas não-iônicas de Poli.80 possuem um centro hidrofóbico cercado por uma camada de cadeias de oxietileno, nas quais moléculas de água estão ligadas por pontes de hidrogênio, sendo, esta camada capaz de prender mecanicamente um grande número de moléculas de água. As micelas destes tensoativos, como conseqüência, tendem a serem altamente hidratadas (AULTON, 2005). O mesmo raciocínio se aplicaria às micelas de saponinas, onde as cadeias glicosiladas teriam um comportamento similar ao das cadeias de polioxietileno. Em princípio, esta seria a razão pela qual a concentração de sais requerida para produzir efeitos significativos são muito maiores neste tipo de micelas e a discussão de cada comportamento introduz as noções de “*salting in*” e “*salting out*”, ou seja, da competição entre o tensoativo (sobretudo o grupo polar) e o eletrólito para associar-se com a água. Assim, se o monômero é *salted out* (dessolvatado) pelo eletrólito, ocasiona uma diminuição no tamanho micelar. A situação inversa se aplica se o monômero é “*salted in*” (HUNTER, 2002).

A adição de NaCl e LiCl na estrutura aquosa da camada paliçada das micelas de Triton X-100, um tensoativo não-iônico, o qual apresenta na sua estrutura 10 moléculas de óxido de etileno, demonstrou que o tamanho das micelas aumentaram substancialmente devido a um aumento, tanto no número de agregação como na hidratação das micelas. Este último efeito, foi principalmente causado por um grande aumento no conteúdo de água contido na camada paliçada, atribuído à forte hidratação dos íons Na⁺ e Li⁺ nesta camada, causando o aprisionamento das moléculas de água as quais formaram *clusters* ao redor dos íons. No entanto, o crescimento das micelas com a adição destes eletrólitos foi fortemente dependente da hidratação dos cátions dos sais (KUMBHAKAR *et al.*, 2005). Este fato pode ser atribuído, ao fato dos cátions serem, em geral, mais hidratados do que os ânions (AULTON, 2005). Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho, confirmam o exposto na literatura, uma vez que a presença de NaCl, Na₂HPO₄, KBr e KNO₃ nas soluções de Poli.80 formaram as micelas de maior diâmetro.

Os grupos polares das moléculas de Poli. 80 como das saponinas são altamente hidratados, no entanto, os valores encontrados para os diâmetros das suas micelas, mesmo sob a influência de eletrólitos são extremamente distintos. Portanto, a resposta para este fato pode provavelmente não estar relacionado ao grau de hidratação destas micelas, mas sim à forma micelar em função do arranjo estrutural das moléculas das saponinas na micela.

Neste sentido, pela análise estrutural das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* pode-se observar que elas apresentam uma disposição estrutural semelhante aos tensoativos geminados, no que diz respeito à posição das cadeias de açúcar em relação ao anel triterpênico, ou seja, em lados opostos. Medidas do diâmetro hidrodinâmico de um tensoativo geminado indicaram um tamanho constante das micelas em torno de 200 nm a 300 nm (PISÁRCIK *et al.*, 2004). Outra semelhança destas saponinas aos tensoativos geminados é o fato de apresentarem marcadamente menores valores de CMC, quando comparados aos tensoativos convencionais de equivalente cadeia (HAIT e MOULIK, 2002). Porém, para a confirmação destas hipóteses, será necessário um estudo mais detalhado, bem como outros tipos de análises.

Pela análise dos perfis espumógenos tanto das saponinas como dos tensoativos sintéticos, pôde-se observar que os eletrólitos influenciaram negativamente os perfis de drenagem e de estabilidade da espuma das saponinas, o que não ocorreu da mesma forma com os perfis de drenagem e de estabilidade das espumas produzidas pelo LSS e pelo Poli. 80. Tendo em vista que, o efeito da adição dos eletrólitos sobre estas soluções tensoativas produziu, de modo geral, alterações no diâmetro micelar tanto nas micelas das saponinas, como no LSS e no Poli.80, pode-se concluir, que parece não haver uma influência direta do tamanho micelar sobre as propriedades espumógenas.

Deste modo, as alterações do diâmetro das micelas das saponinas produzidos pela adição de eletrólitos, não estão correlacionadas ao efeito desestabilizante dos eletrólitos sobre os perfis de drenagem e de estabilidade das espumas das saponinas.

4.4.3.9. Avaliação bidimensional da espuma

4.4.3.9.1. Resultados da caracterização da espuma das saponinas por análise bidimensional

As imagens bidimensional da espuma de LSS e EXL na concentração de 1,0 %, obtidas entre os intervalos de tempo de 10 segundos, estão apresentados nas Figuras 58 e 59.

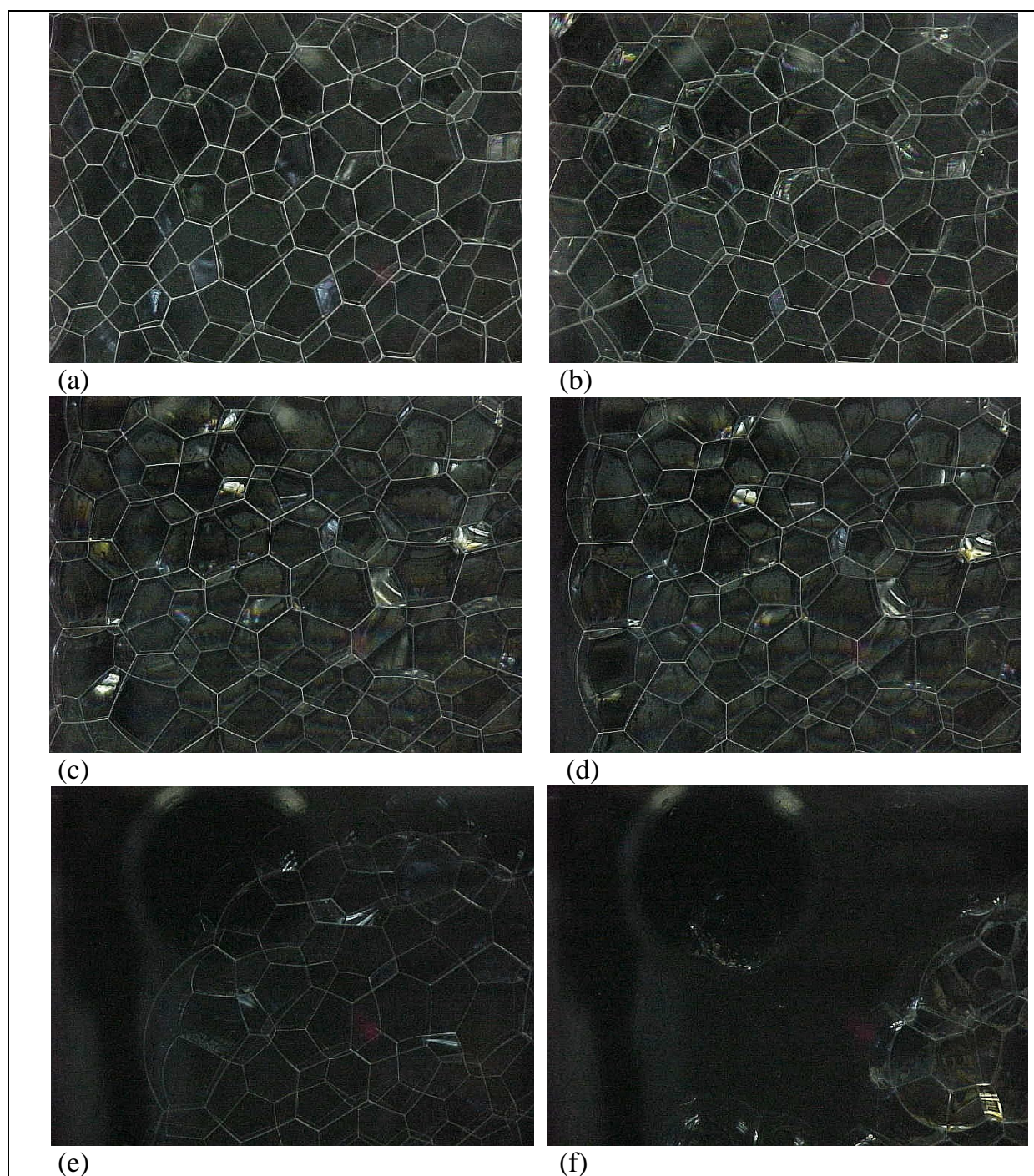
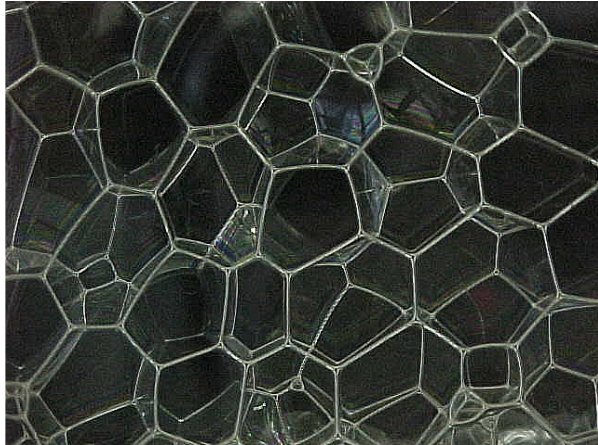
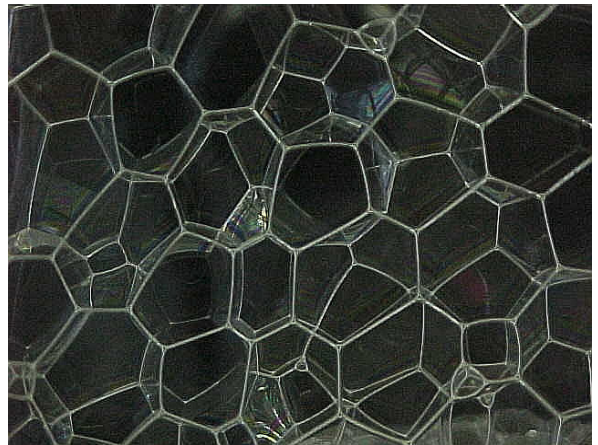


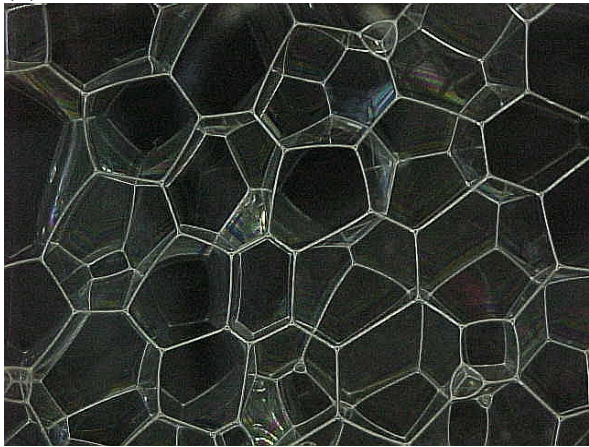
Figura 58. Imagem bidimensional da espuma de LSS a 1,0% nos tempos: (a) zero (b) 20 segundos (c) 90 segundos (d) 240 segundos (e) 290 segundos e (f) 300 segundos.



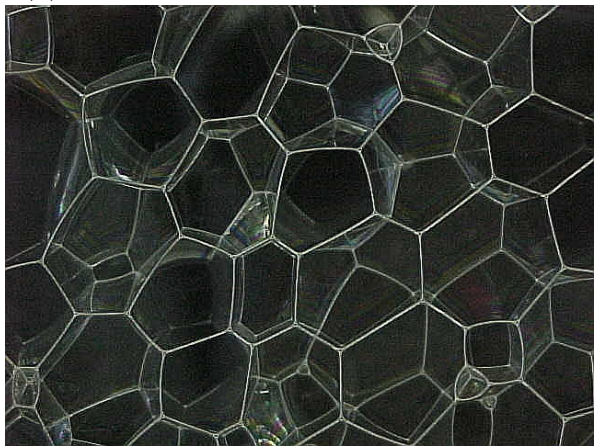
(a)



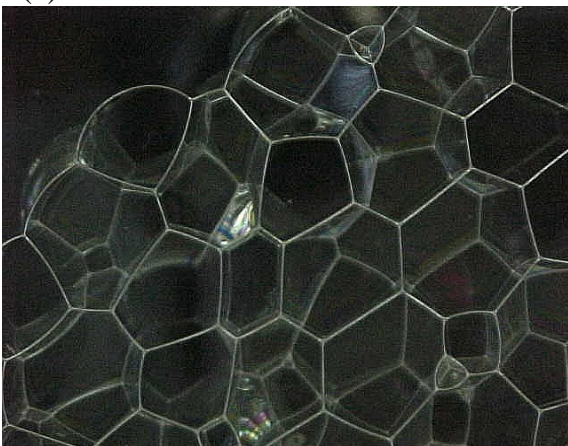
(b)



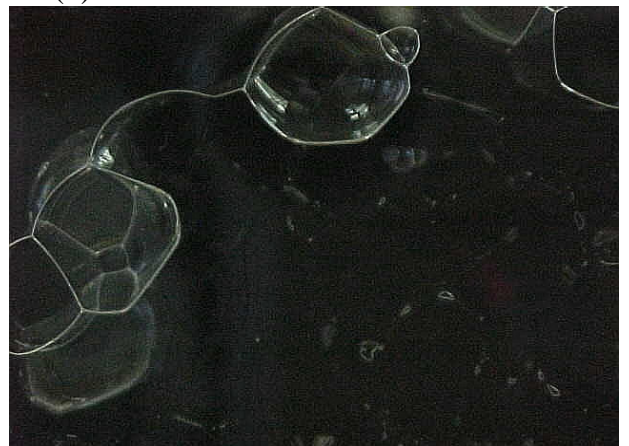
(c)



(d)



(d)



(e)

Figura 59. Imagem bidimensional da espuma do EXL a 1,0% nos tempos: (a) zero, (b) 10 segundos, (c) 20 segundos, (d) 30 segundos, (e) 60 segundos e (f) 70 segundos.

O resultado da análise bidimensional quanto ao número de bolhas e de arestas por campo visual das espumas produzidas pelas soluções tensoativas de EXL e LSS à concentração de 1,0%, estão demonstrados nas Tabelas 25 e 26 .

Tabela 25. Parâmetros da análise bidimensional das soluções de EXL e LSS à concentração de 1,0%.

Solução tensoativa (1,0%)	Tempo (s)	Nº bolhas (Nb)	Nº arestas (Na)	Média do nº arestas (Nb/Na)
EXL	0	15	75	5,0
	10	15	82	5,46
	30	15	83	5,53
LSS	0	29	170	5,86
	10	23	137	5,95
	30	21	128	6,09

Tabela 26. Número de arestas das bolhas em função do tempo para as soluções de EXB e LSS a 1,0%.

Nº Arestas	Nº bolhas					
	EXL			LSS		
	Tempo (segundos)			Tempo (segundos)		
	0	10	30	0	10	30
3	2	2	2	-	-	-
4	1	-	-	-	-	-
5	4	4	4	5	5	4
6	4	7	6	23	15	12
7	3	2	3	1	2	4
8	1	-	-	-	1	1

O método da análise bidimensional baseia-se na Lei de Plateau, segundo a qual o número de vértices e a curvatura (pressão interna) de uma bolha de espuma são parâmetros relacionados com o grau de estabilidade de uma espuma ideal, em um plano bidimensional, formada de N bolhas com áreas fixas $\{A_i, i = 1, \dots, N\}$. Pelo Teorema de Gauss, o número de lados apresentados por uma bolha, associado ao arco do seu comprimento, apresentam valores passíveis de serem associados com a estabilidade de uma espuma. Assim, o aumento do número médio de arestas com o tempo, estaria relacionado a uma diminuição da estabilidade do sistema. Neste sentido, as bolhas pentagonais apresentariam uma maior estabilidade em relação às hexagonais ou heptagonais (GRANER, 2002).

Pelos resultados pode-se observar, que com o passar do tempo, o número de bolhas analisadas por campo tende a diminuir e, conseqüentemente, o número de arestas.

Na espuma do EXL, o número de bolhas durante o tempo de 30 segundos de análise se manteve inalterado e em menor número em comparação ao LSS. Para o LSS, o número inicial de bolhas foi maior que o EXL, porém houve uma diminuição de bolhas em 30 segundos. Confrontando com o número de arestas das bolhas em função do tempo (Tabela 26), nota-se que no EXL há uma maior diversidade de formas de bolhas, ou seja, uma maior heterogenidade de bolhas na espuma. Na espuma de LSS, no entanto, há uma maior homogeneidade na forma das bolhas no tempo zero, com predomínio de bolhas contendo seis arestas (79 %). Porém, com o passar do tempo, as características das bolhas da espuma do EXL mantiveram-se quase inalteradas, fato observado através da análise do número de bolhas com diferentes arestas em função do tempo. Na espuma de LSS, entretanto, houve uma modificação do perfil da espuma quanto ao número de bolhas com diferentes arestas de maneira mais intensa que para o EXL. Assim, durante 30 segundos o número de bolhas com 6 arestas na espuma de LSS passou de 23 para 12 bolhas.

Confrontando com os dados de espumabilidade, a solução de LSS, de fato, apresentou uma maior espumabilidade em relação ao EXL, como pode-se verificar pelo maior número de bolhas presente por campo produzida na placa pela solução de LSS. Quanto à estabilidade da espuma, ou seja, sua permanência em função do tempo,

espuma produzida pelo EXL confirma os resultados anteriores quanto a sua estabilidade, ou seja, através do número de bolhas inalterado durante o tempo de avaliação, bem como a não variação do número de arestas das bolhas.

Pela análise das fotos, também podemos pressupor que a espuma das soluções de LSS apresentaram uma considerável elasticidade, observada através da modificação estrutural das bolhas com o tempo, sem haver o rompimento do filmes interfaciais. Neste sentido, apesar das soluções de LSS terem apresentado uma maior taxa de drenagem que as espumas das saponinas, observou-se pela análise bidimensional, um maior tempo de permanência da espuma de LSS em função do tempo comparado com as saponinas. Assim, pela evolução dos filmes interfaciais de LSS, pôde-se observar que o afinamento dos filmes líquidos decorrente do processo de drenagem, levou a formação de uma espessura de equilíbrio constatado visualmente pela maior transparência da espuma, como pelo maior tempo necessário para ocorrer o colapso destes filmes.

Tendo em vista o caráter aniônico de seus grupos polares, a presença de carga manteria a repulsão eletrostática entre os grupo polares do tensoativo, possibilitando a manutenção por mais tempo de uma espessura de equilíbrio (WANG e YOON, 2006).

As imagens bidimensionais da espuma das saponinas sugerem, entretanto, uma elasticidade superficial em menor grau que a observada nos filmes de LSS. Deste modo, os resultados encontrados experimentalmente quanto às taxas de drenagem das espumas das saponinas do EXL, expressas pelo volume de drenagem em função do tempo, pôde ser melhor explicada pela análise fotográfica. A visualização das fotos mostra uma maior espessura dos filmes líquidos interfaciais das saponinas em relação ao LSS. Esta maior espessura dos filmes líquidos está relacionada à capacidade de ligação das moléculas de saponinas às moléculas de água superficiais, o que justifica sua elevada viscosidade de cisalhamento e, conseqüentemente, uma menor drenagem.

4.5. REFERÊNCIAS

ALMGREN, M.; GIMEL, J. C.; WANG, K.; KARLSSON, G.; EDWARDS; K.; BROWN, W.; MORTENSEN, K. SDS Micelles at high ionic strength. A Light

Scattering, Neutron Scattering, Fluorescence Quenching and CryoTEM investigations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 202, p. 222-231, 1998.

ANGARSKA, J. K.; TACHEV, K. D.; KRALCHEVSKY, P. A.; MEHRETEAB, A. ; BROZES, G. Effects of counterions and co-ions on the drainage and stability of liquid films and foams. **Journal of Colloid and Interface Science**, 200, p. 31-45, 1998.

ANGARSKA, J. K.; MANEV, E. D. Effect of surface forces and surfactant adsorption on the thinning and critical thickness of foam films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 190, p. 117-127, 2001.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2^a edição, Ed. Artmed, 2005.

BERKMAN, S. **Emulsions and foams**. Reinhol, New York, 1941.

BHAKTA, A.; RUCKENSTEIN, E. Drainage and coalescence in standing foams. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, p. 184-201, 1997.

CARP, D. J.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOFF, A. M. R. A Kinetic model to describe liquid from Soy Protein Foams over an extensive protein concentration range. **Lebensm.-Wiss. u. Technol.**, v. 30, p. 253-258, 1997.

COONS, J. E.; HALLEY, P. J.; McGLASHAN, S. A.; TRAN-CONG, T. Scaling laws for the critical rupture thickness of common thin films. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**. v. 263, p. 258 – 266, 2005.

COPPOLA, L.; GORDANO, A.; PROCOPIO, A.; SINDONA, G. Phase equilibrium and physical-chemical properties of sugar-based surfactants in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.196, p. 175-187, 2002.

CSERHÁTI, T.; FORGÁS, E.; OROS, G. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environmental International**, v. 28, p. 337-348, 2002.

DRUMMOND, C. J.; WELLS, D. Nonionic lactose and lactitol based surfactants: comparison of some physico-chemical properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 141, p. 131-142, 1998.

DJUVE, J.; PUGH, R. J.; SJOBLUM, J. Foaming and dynamic surface tension of aqueous polymer/surfactants solutions 1: ethyl(hydroxyethyl) cellulose and sodium dodecyl sulphate. **Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 186, p. 189-202, 2001.

ENGELS. TH. ; VON RYBINSK, W.; SCHMIEDEL – Structure and dynamics of surfactant based foams. **Progr. Colloid Polym. Science**. 111; 117 – 126, 1998.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Physicochemical principles of Pharmacy**. Ed. M&F Academic books Service, 2003.

GANDOLFO, G.; F.; ROSANO, H. L. Interbubble gas diffusion and the stability of foams. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 194, p. 31-36, 1997.

GRANER, F. **Two-Dimensional Fluid Foams at Equilibrium**. K.R. Mecke, D. Stoyan (Eds): LNP 600, p.187-211, 2002.

GRASSIA, P.; NEETHILING, S. J.; CERVANTES, C.; LEE, H. T. The growth, drainage and bursting of foams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 274, p. 110-124, 2006.

HAIT, S. K.; MOULIK, S. P. Gemini surfactants: A distinct class of self-assembling molecules. **Current Science**, v. 82, n. 9, p. 1101-1111, 2002.

HARVEY, P. A.; NGUYEN, A. V.; JAMESON, G. J.; EVANS, G. M. Influence of sodium dodecyl sulphate and Dowfroth frothers on froth stability. **Mineral Engineering**, v. 18, p. 311-315, 2005.

HILGENFELDT, S.; KOEHLER, S. A.; STONE, H. A. Dynamics of coarsening foams: Accelerated and self-limiting drainage. **Physical Review Letters**, v. 86, n. 20, p. 4704-4707, 2001.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**. Grã-Bretanha: University Press, 1995, p. 547.

HUNTER, R. J. **Foundations of Colloid Science**, 2^a edition, v. 1, Oxford University Press, 2002.

KAUFFMANN, C. **Constituição química e avaliação da atividade imunoadjuvante de *Quillaja brasiliensis***. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

KRIPP, T.; BORMUTH, H.; FRANZKE, M.; BAECKER, S.; KISCHKA, K-H.; SCHRODER, F.; WELLA, A. **Cosmetic preparation containing Ilex resin, method of obtaining Ilex resin obtained thereby**. United States Patent. n. 5,958,395, 28 set., 1999.

JAREK, E.; WYDRO, P.; WARSZNSKI, P.; PALUCH, M. Surface properties of mixtures of surface-active sugar derivates with ionic surfactants: theoretical and experimental investigations. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 293, p. 194-202, 2006.

KARAKASHEV, S. I.; MANEV, E. D. Correlation in the properties of single films and foam containing a nonionic surfactant and organic/inorganic electrolytes **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 259, p. 171-179, 2003.

KARAKASHEV, S. I.; MANEV, E. D. Frothing behavior of nonionic surfactant solutions in the presence of organic and inorganic electrolytes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 235, p. 194-196, 2001.

KUMBHAKAR, M.; MUKHERJEE, T.; PAL, H. Effect of added electrolytes NaCl and LiCl on the palisade layer water structure of Triton X-100 micelle: A fluorescence anisotropy study. **Chemical Physics Letters**, v. 413, p. 142-146, 2005.

MANEV, E. D.; NGUYEN, A. V. Effects of surfactant adsorption and surface forces on thinning and rupture of foam liquid films. **International Journal Mineral Process.** v. 77, p. 1-45, 2005.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MATSUMOTO, M.; MONTANDON, C.; STANLEY, H; WATANABE. A. The effect of double layer interaction on the drainage of thin liquid films. **Chemical Engineering Science**, v. 13, p. 831-837, 1978.

MISHRA, N. C.; MURUGANATHAN, R. M.; KRUSTEV, R. The dependence of the interactions in foam films on surfactant concentration. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 256, p. 77-83, 2005.

MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of temperature, Salt and pH on Solution Properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 45, p. 1587 -1595, 1997.

NEETHLING, S. J.; LEE, H. T; GRASSIA, P. The growth, drainage and breakdown of foams. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 263, p. 184 – 196, 2005.

NIERSTRASZ, V. A.; FRENS, G. Marginal regeneration and the Marangoni effect. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 215, p. 28-35, 1999.

NGUYEN, A. V.; HARVEY, P. A.; JAMESON, G. J. Influence of gas flow rate and frothers on water recovery in a froth column. **Minerals Engineering**. v. 16, p. 1143-1147, 2003.

NGUYEN, A. V. Liquid drainage in single Plateau borders of foam. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 194-199, 2002.

OSBOURN, A. E. Saponins in Cereals. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1-4, 2003.

PANDEY, S.; BAGWE, P. R.; SHAH, O. D. Effect of counterions on surface and foaming properties of dodecyl sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 267, p. 160-166, 2003.

PARA, G.; JAREK, E.; WARSZYNSKI, P. The Hoffmeister series Effect in adsorption of cationic surfactants – theoretical description and experimental results. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 122, p. 39-55, 2006.

PARA, G.; JAREK, P.; WARSZYNSKI, Z.; ADAMCZYK. Effect of eletrolytes on surface tension of ionic surfactant solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**. v. 222, p. 213-222, 2003.

PATIST, A.; KANICKY, J.; SHUKLA, P. K.; SHAH, D. Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 245, p. 1-5, 2002.

PIRES, P. A. R. **Síntese e Propriedades de Soluções de Tensoativos Catiônicos Derivados de (3-Dimetilaminopropil)amidas de Ácidos carboxílicos**. Universidade de São Paulo. Instituto de Química., São Paulo, 2002, 163p. Tese de Doutorado.

PISÁRCIK, M.; DEVINSKY, F.; LACKO, I. Dynamic light scattering and micelle shape analysis of gemini surfactants. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, Tomus LI, 2004.

SARNTHEIN-GRAF, C.; LA MESA, C. Association of Saponins in Water-gelatine Mixtures. **Thermochemica Acta**, v. 418, p. 79-84, 2004.

SARTOR, M. **Dynamic Light Scattering**. University of California, San Diego. Disponível em http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf. Acesso em 20.7.2006.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. Ed. Edgard Blucher Ltda., 1975.

SCHICK, M.; J. **Nonionic Surfactants Physical Chemistry**. Surfactants Science Series, v. 23, Marcel Dekker Inc., New York, 1997, p. 1123.

STANLEY, L. H.; FELDKAMP, J. R.; WHITE, J. L. Introdução à Química-Física das Emulsões e Suspensões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

STEVENSON, P. Remarks on the Shear Viscosity of Surfaces Stabilized with Soluble Surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 290, p.603-606, 2005.

TAMURA, T.; TAKEUCHI, Y.; KANEKO, Y. Influence of Surfactant Structure on the Drainage of Nonionic Surfactant Foam Films. **Journal of colloid and Interface Science**, v. 206, p. 112-121, 2006.

TAN, S. N.; FORNASIERO, D.; SEDEV, R.; RALSTON, J. The role of surfactant structure on foam behavior. **Colloid and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 263, p. 233-238, 2005.

TCHOUKOV, P.; MILEVA, E.; EXEROWA, D. Drainage time peculiarities of foam films from amphiphilic solutions. **Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 236, p. 19-25, 2004.

THOMAS, P. D.; DARTON, R. C.; WHALLEY, P. D. **Foam Structure Studies at Oxford**. Disponível em <<http://www.booker.demon.co.uk/paulthomas/stuff/tomography/>>. Acesso em 2.9.2005.

WANG, L.; YOON, R. W. Stability of Foams and Froths in the presence of Ionic and Nonionic Surfactants. **Minerals Engineering**, v. 10, p. 539-547, 2006.

VARDAR-SUKAN, F. Foaming: Consequences, Prevention and Destruction. **Biotechnology Advances**, v. 16. n. 5/6, p. 913-948, 1998.

VOCHTEN, R.; JOOS, P.; RUYSSSEN, R. Physico-chemical properties of sapaalbin and their relation to the foam stability. **Journal de Pharmacie de Belgique**, Communication to the 27th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Montpellier, September 1967.

WEICAN, Z.; GANZUO, L.; MU, J.; SHEN, Q.; ZHENG, L.; LIANG, H.; WU, C. Effect of KBr on the micellar properties of CTAB. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 20, p. 1854-1857, 2000.

Capítulo 5

Avaliação do potencial de irritação cutânea das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

5.1. INTRODUÇÃO

Devido ao elevado número de produtos desenvolvidos para uso com o homem, muitos métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para a predição do potencial de irritação ocular e cutânea dos tensoativos (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

A irritação cutânea induzida por tensoativos apresenta várias manifestações, como *rash*-cutâneo, referido como eritema, descamação à formação de bolhas ou simplesmente a sensação de aspereza na pele, como também outras desordens cutâneas (MOORE *et al.*, 2003).

O interesse por tensoativos bio-compatíveis, visa minimizar as propriedades irritantes que os tensoativos sintéticos exercem na pele e tecidos. Deste modo, tensoativos suaves tendo açúcares ou unidades do tipo betaína como grupos polares, têm sido extensivamente usados em formulações dérmicas. Assim, os estudos orientados para otimizar o comportamento dos tensoativos obtidos de origem natural, demonstram, que as saponinas, são, extremamente promissoras (SARNTHEIN-GRAF e LA MESA, 2004).

5.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os tensoativos aniônicos são extensivamente usados em medicamentos, formulações para a agricultura, em biotecnologia, cosméticos e em outros processos industriais, entretanto, o seu emprego está associado à presença de sintomas tóxicos nos organismos humano e animal, devido à modificações das estruturas protéicas e disfunção das enzimas, bem como alterações nas membranas fosfolipídicas. Estas

modificações estão associadas às interações por forças eletrostáticas entre o grupo polar carregado negativamente do tensoativo às subestruturas moleculares carregadas positivamente, como também, por forças hidrofóbicas com as partes apolares dos órgãos alvos, podendo, ocasionar, modificações da função biológica (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

A citotoxicidade dos tensoativos determinada sobre células epiteliais da córnea de coelhos, seguiu a seguinte ordem: catiônico > aniônico = anfotérico > não-iônico. Interessantemente, tensoativos não-iônicos foram capazes de reduzir o efeito danoso dos tensoativos aniônicos, no entanto, as bases moleculares deste fenômeno ainda não foram elucidadas (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

Para a avaliação do potencial de irritação cutânea, vários testes *in vivo* têm sido estabelecidos em testes de segurança (ZUANG *et al.*, 2000). O teste de irritação primária de Draize é um estudo de “*patch test*”, utilizado para prever se uma substância é capaz de fazer surgir uma reação inflamatória, após contato imediato ou prolongado, em pele intacta e escarificada de coelhos albinos (CHUDKOVSKI, 1980).

Em resposta à necessidade de alternativas para o teste de Draize, numerosos testes *in vitro* e *in vivo* têm sido empregados para a avaliação do grau de irritação cutânea de sistemas tensoativos. Entre os modelos *in vitro*, está o do tecido cutâneo EpiDermTM baseado em células da pele humana. Apesar destes sistemas apresentarem vantagens, não se tornam acessíveis devido ao alto custo. Testes de irritação cutânea *in vitro* têm sido desenvolvidos para medir o potencial de desnaturação proteica provocada por tensoativos, como o teste envolvendo medidas da quantidade de zeína, uma proteína do milho, insolúvel em água, a qual pode ser solubilizada pela adição de diferentes tipos de tensoativos, sendo o potencial de irritação cutânea correlacionado à capacidade destes tensoativos em dissolvê-la (MOORE *et al.*, 2003).

O método de solubilização da zeína é particularmente apropriado para classificar o potencial de irritação cutânea dos tensoativos aniônicos, uma vez que estes tensoativos são fortemente solubilizadores da zeína, enquanto que os tensoativos anfotéricos (zwitteriônicos) e não-iônicos dissolvem pouco ou não dissolvem a zeína. Isto também é consistente com a baixa capacidade de desnaturação proteica dos

tensoativos anfotéricos e não-iônicos para vários outros sistemas proteicos, como a proteína sérica bovina, ovalbumina, lisósima, citocromo C e a enzima lisolecitina fosfolipidase (MOORE *et al.*, 2003).

Técnicas não-invasivas também têm sido usadas para a avaliação do potencial de irritação cutânea, como a velocimetria por Laser Doppler, evaporimetria, cromametria e corneometria. Entre estas, apenas a velocimetria por Laser Doppler e evaporimetria têm sido bons discriminadores entre as substâncias irritantes e não-irritantes, pois detectam estágios iniciais no desenvolvimento de uma reação irritante, antes de se tornarem visíveis. Assim, as medidas não-invasivas podem melhorar a qualidade e relevância dos dados obtidos pelos testes de irritação em pele humana, uma vez que os resultados são objetivos, quantitativos e algumas vezes sub-clínicos (ZUANG *et al.*, 2000). Entretanto, apesar do emprego de outros modelos de avaliação do grau de irritação cutânea aplicado à tensoativos, o epicutâneo *patch test*, incluindo o tradicional *score* clínico das reações cutâneas, ainda permanece como padrão-ouro para determinar a segurança dos produtos de uso pessoal (HALL-MANNING, *et al.*, 1998, ZUANG *et al.*, 2000).

Assim, este Capítulo tem como objetivo, avaliar o potencial de irritação cutânea das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis*, através do teste de irritação primária dérmica de Draize. Para esta avaliação, será utilizado o extrato bruto e produtos purificados, representados pela fração 70 (Fr. 70) e pelo extrato P6, frente a um controle positivo.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. MATERIAL

5.3.1.1. Substâncias e Reagentes

Laurilsulfato de sódio (Merck®); Extrato bruto liofilizado (EXL), Fração purificada (Fr. 70) e Extrato purificado P6 (P6) dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

5.3.1.2. Equipamentos e materiais diversos

Balança analítica SARTORIUS, agulhas hipodérmicas, depilador GILLETTE, algodão hidrófilo, tesoura, seringa plástica, gaze estéril, esparadrapo, tricotomizador, gaiolas.

5.3.1.3. Animais de laboratório

Coelhos albinos machos, pesando entre 200 e 300 g.

5.3.2. MÉTODOS

5.3.2.1 Avaliação do grau de irritação primária dérmica (Draize, 1944)

5.3.2.1.1. Preparo da amostra

Para a avaliação da irritação dérmica primária foram preparadas soluções a 1,0% de extrato bruto liofilizado (EXL), Fração 70 (Fr. 70), extrato purificado (P6) e como controle positivo, o tensoativo aniônico, laurilsulfato de sódio (LSS).

5.3.2.1.2. Descrição do método

Para cada amostra foram utilizados seis coelhos machos albinos, pesando entre 2 e 3 kg, mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso à ração e água, à temperatura entre 18 e 24 °C e umidade relativa na faixa de 40 a 60%.

O grau de irritação foi avaliado pela técnica do *patches test*, em pele íntegra e escarificada. No dorso de cada animal foi delimitada uma área em torno de 36 cm², as quais foram depiladas e divididas em quatro áreas. Após 24 horas, duas destas áreas foram escarificadas e aplicado imediatamente a seguir, 0,5 ml da solução teste em uma área íntegra e em outra escarificada, mantendo as restantes como controle. A seguir, as áreas foram cobertas com gaze estéril e cobertas com gaze e esparadrapo. Após 24 horas de contato com o produto, os *patches* foram removidos e as reações de eritema e edema foram avaliadas primeiro qualitativamente e após quantitativamente segundo um sistema de escala pré-definido. Os animais permaneceram sem os *patches* por mais 48 horas, sendo realizada nova avaliação das reações de eritema e edema. O tempo total de contato do produto com a pele foi, portanto, de 72 horas. Os resultados foram expressos pela média de 6 determinações.

5.3.2.1.3. Avaliação das reações da pele

Para a avaliação do grau da irritação dérmica, foi determinado individualmente o grau de formação de eritema, de crosta e de edema nas peles íntegra e escarificada dos animais, 24 e 72 horas após a aplicação da amostra.

A escala numérica do grau de eritema e formação de crostas, para o teste de irritação primária de Draize, bem como a classificação do grau de formação de edema estão apresentadas nas Tabelas 27 e 28, respectivamente.

Tabela 27. Classificação do grau de eritema e formação de crosta do ensaio de irritação primária dérmica de Draize

Eritema e Formação de crosta	
Sem eritema.....	0
Eritema muito escasso (claramente perceptível)	1
Eritema moderado (bem definido)	2
Eritema moderadamente severo.....	3
Eritema severo (rubor roxo) formação de crostas	

(lesões profundas)	4
Escore Edema, possibilidade total	4

Tabela 28. Classificação do grau de formação de edema para avaliação do grau de irritação primária dérmica de Draize.

Formação de Edema	
Edema ausente.....	0
Edema leve (0,25 mm e 0,49 mm).....	1
Edema moderado (0,5 mm e 0,74 mm).....	2
Edema definido (0,75 mm e 1mm).....	3
Edema severo (> 1 mm).....	4
Escore Edema, possibilidade total.....	4

5.3.2.1.4. Determinação do Índice de irritação primária dérmica

O valor médio para o grau de eritema e formação de crostas nas 24 e 72 horas nas peles intacta e escarificada, foram somados aos valores médios para a formação de edema nas 24 e 72 horas para pele intacta e escarificada. A soma das médias (SM) foi dividido por 4 (SM/4) para termos, então, o escore da irritação primária.

Os critérios de classificação, conforme o valor do índice de irritação, estão demonstrados na Tabela 29.

Tabela 29. Índice de irritação primária dérmica para o teste de Draize.

Índice de irritação primária	Avaliação
0	Não irritante
0,042 – 2,0	Suave
2,01 – 5,0	Moderado
> 5,01	Severo

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Determinação do grau de reação cutânea das soluções tensoativas

Os resultados do grau de eritema, formação de crostas e edema, desenvolvidos em 24 e 72 horas, nas peles íntegra e escarificada para o LSS, EXL, Fr. 70 e extrato P6, estão apresentados nas Tabelas 30 a 37.

Tabela 30. Grau de eritema e formação de crosta, para a solução de LSS a 1,0%

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	1	0	0	0	0	0	0,166
	72	1	0	1	0	0	0	0,333
Escarificada	24	1	1	1	0	0	1	0,666
	72	1	0	1	0	0	0	0,333
Sub-total								1,498

Tabela 31. Grau de formação edema para a solução de LSS a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n°)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								1,498
Índice de irritação (SM/4)								0,3745

Tabela 32. Grau de eritema e formação de crosta para a solução EXL a 1,0%

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	1	0,166
Sub-total								0,166

Tabela 33. Grau de formação de edema para a solução de EXL a 1,0%

Edema			
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n°)	

	(horas)	1	2	3	4	5	6	Média
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0,166
Índice de Irritação (SM/4)								0,0415

Tabela 34. Grau de eritema e formação de crosta da solução da Fr. 70 a 1,0%.

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0

Tabela 35. Grau de formação de edema para a solução da Fr. 70 a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0

Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0
Índice de Irritação (SM/4)								0

Tabela 36. Grau de eritema e formação de crosta da solução de extrato P6 a 1,0%.

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0

Tabela 37. Grau de formação de edema para a solução de extrato P6 a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (nº)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0

Éscarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0
Índice de irritação (SM/4)								0

A avaliação visual após 72 horas da aplicação de 0,5 ml das soluções tensoativas de LSS, EXL, Fr. 70 e extrato P6 à 1,0% nas peles íntegra e escarificada, estão demonstradas na Figura 60.

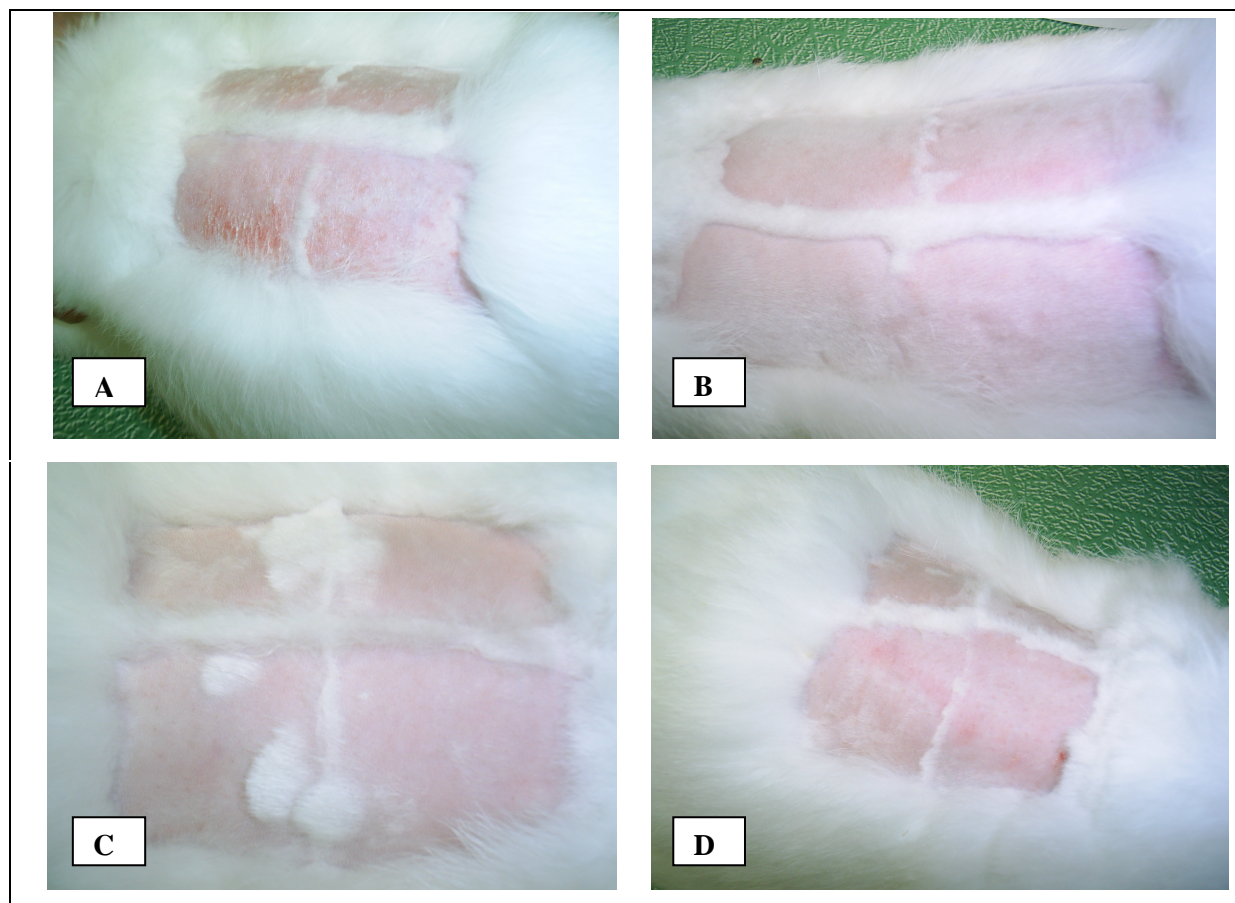


Figura 60. Aspecto das peles íntegra e escarificada após 72 horas da aplicação das soluções tensoativas de LSS (A), EXL (B), Fr. 70 (C) e extrato P6 (D).

O resultado do índice de irritação primária dérmica apresentado pelos tensoativos, está demonstrado na Tabela 38.

Tabela 38. Índices de irritação primária dérmica de Draize para as soluções de LSS, EXL, Fr. 70 e P6 a 1,0%.

Solução tensoativa (1,0%)	Índice de irritação primária dérmica	Avaliação
LSS	0,3745	Suave
EXL	0,0415	Não irritante
Fr. 70	0	Não irritante
P6	0	Não irritante

A escolha da concentração de 1,0% para a preparação das soluções tensoativas, foi baseada nos respectivos valores da concentração micelar crítica das substâncias a serem analisados, a fim de trabalhar com valores dentro de uma faixa de segurança acima da CMC dos tensoativos, bem como ter uma concentração mais elevada de substância em contato com a pele, passível de desenvolver alguma reação cutânea.

Pela análise dos resultados, observou-se que o laurilsulfato de sódio, desenvolveu um leve eritema observado nas primeiras 24 horas de exposição ao

produto, porém, somente na pele escarificada. No entanto, 48 horas após, observou-se uma evolução do processo de irritação cutânea, representado pela formação de crostas.

Para o EXL, após 24 horas de contato com a solução, observou-se um levíssimo grau de eritema, mas somente na pele escarificada, o qual desapareceu totalmente em 48 horas. Este leve eritema foi detectado em apenas um dos seis animais expostos ao produto.

Quanto aos produtos purificados não foi observado qualitativamente nenhum grau de interação cutânea. A Fr, 70 como o extrato P6, tanto em 24 e 72 horas, nas peles íntegra e escarificada, não apresentaram após a retirada dos *patches*, nenhuma manifestação visual de alteração cutânea, representado pela ausência de eritema, formação de crostas e edema. Observou-se, também, que as peles tanto íntegra como escarificada, apresentaram uma melhor textura e aspecto nas 72 horas após a aplicação das amostras em relação aos controles.

Com o processo de escarificação, partes do estrato córneo são removidas, o que potencializa a ação em relação à pele intacta. Este fato, foi observado experimentalmente com o laurilsulfato de sódio, o qual é considerado um tensoativo severo em termos de irritação cutânea, sendo, por isso, empregado como controle positivo nas avaliações do potencial de irritação cutânea aguda provocada por tensoativos (HALL-MANNING *et al.*, 1998).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a irritação cutânea induzida por tensoativos, incluindo a solubilização dos lipídeos da pele, o rompimento das bicamadas lipídicas do estrato córneo e a desnaturação proteica (MOORE *et al.*, 2003). Entre estes, observou-se que o evento crítico, resulta da ligação dos tensoativos às proteínas cutâneas como a queratina dos corneócitos no estrato córneo, seguido pela desnaturação destas, existindo freqüentemente, uma correlação direta entre a habilidade de um tensoativo para desnaturar a proteína com o seu potencial de irritação cutânea. Assim, o grau de desnaturação proteica está relacionado à diferentes manifestações de irritação cutânea *in vivo*, incluindo eritema (vermelhidão e inflamação na pele), alterações nas propriedades barreira do estrato córneo, o que ocasiona um aumento da taxa da perda de água transepidérmica (TWEL), levando ao ressecamento e rachadura na pele (MOORE *et al.*, 2003).

A dependência do potencial de irritação cutânea dos tensoativos aniônicos sobre a estrutura molecular é bem estabelecida. Os resultados indicam que o comprimento da cadeia alquila dos alquil sulfatos de sódio têm um considerável impacto no seu potencial de irritação cutânea. Assim, os compostos com C₁₈ causam dano celular, enquanto os compostos com C₁₀ e C₁₆ causam mais severa destruição da membrana e desnaturação proteica. O lauril sulfato de sódio (LSS) causa mais severa desidratação cutânea que o brometo de dodecil trimetil amônio, sendo o completo restabelecimento da reação irritante foi obtida 17 dias após a exposição do tensoativo (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

O teste de toxicidade cutânea dos tensoativos em queratinócitos normais humanos, avaliado pela citotoxicidade, liberação de ácido araquidônico e regulação da interleucina-1 α mRNA, revelou que o efeito do SDS foi maior que dos tensoativos não-iônicos Triton X-100 e Tween-20. Um estudo quantitativo da relação estrutura-atividade (QSAR), revelou que a capacidade de hidratação dos *n*-alquil sulfatos foi estreitamente correlacionada com o potencial irritacional, sendo um máximo encontrado em análogo do C₁₂ (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

O grau de interação do LSS com o extrato córneo, foi avaliado através de medidas da condutividade da pele *in vitro*, demonstrando que o aumento da concentração de LSS, produz um aumento da condutividade da pele, uma vez que os íons atravessam a pele por canais similares aos da água (MOORE *et al.*, 2003), e que em misturas de sistemas tensoativos, o tensoativo individual exibe menos afinidade para esta proteína. As micelas dos tensoativo interagem com os lipídeos, os quais formam um empacotamento entre as escamas, proporcionando um sítio de entrada para mais tensoativo, os quais, iniciarão então, o processo de desnaturação proteica. Este estágio, parece requerer um determinado tipo de micela de tensoativo para possibilitar os lipídeos à formarem uma micela mista com o(s) tensoativo(s), sendo esta provavelmente, a área onde diferenças em relação a irritação são manifestadas para as misturas de tensoativos (HALL-MANNING *et al.*, 1998). Neste sentido, a investigação da adição de tensoativos não-iônicos (C₁₂E₈) à soluções de LSS, revelaram uma diminuição na habilidade do LSS para solubilizar a proteína zeína, devido à uma repulsão estérica entre a proteína e as micelas mistas de LSS/ C₁₂E₈ que

complexam com a proteína, reduzindo, assim as forças de interação do complexo proteína-tensoativo, levando à uma diminuição na capacidade de solubilização da proteína pela solução tensoativa, com consequente redução do potencial de irritação cutânea (MOORE *et al.*, 2003).

Quanto ao extrato bruto e os produtos purificados não foi observado qualitativamente nenhum grau de interação cutânea. Apesar do extrato bruto apresentar uma composição mais complexa, contendo além de saponinas, outros compostos de forma associada, poderia explicar um maior potencial de interação à nível cutâneo, em relação aos produtos purificados, representados pela Fr. 70 e o extrato P6. No entanto, através do processo de fracionamento do extrato bruto, obteve-se produtos com uma maior concentração em saponinas, e um menor índice de interferentes em relação ao extrato bruto. Neste sentido, à aplicação das soluções da Fr. 70 e do extrato P6, apresentam, teores muito mais elevados em saponinas, comparado ao extrato bruto à mesma concentração.

Devido a semelhança de composição química em termos de saponinas entre os extratos de folhas e de frutos de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000), sugere-se, também, para as saponinas dos frutos, um comportamento semelhante ao atribuído à uma fração de saponinas obtida das folhas de *Ilex paraguariensis* em relação a presença de atividade antiedematogênica como descrito por MONTANHA (1990).

A ausência de propriedades hemolíticas, para as saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*, verificado por GOSMANN (1989), contribuem, também, para uma menor citotoxicidade destes glicosídeos.

Deste modo, pelos resultados da avaliação do grau de irritação primária dérmica de Draize, podemos concluir, que a associação de teores mais elevados de saponinas presentes nos produtos purificados e a ausência de manifestações de interação à nível cutâneo, confere às saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, a possibilidade de emprego em formulações de uso tópico.

5.5. REFERÊNCIAS:

ATHAYDE, M.L. **Metilxantinas e Saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A.St. Hil.; Triterpenos e saponinas em outras espécies do Gênero *Ilex***. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2000. Tese de Doutorado.

CHUDKOVSKI, M. The Draize Primary Irritation Test. **BPSOP**, 13, p. 1-13, 1980.

Division of Chemistry and Chemical Technology, National Academy of Sciences – National Research Council, Publication 1138, p.9, 26-27, 1964.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. – Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, v. 28, p. 337-348, 2002.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. – Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmac. Exp. Therapy**. 82: 377 –390, 1944.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1989. Dissertação de Mestrado.

HALL-MANNING, T. J.; HOLLAND, G. H.; RENNIE, G.; REVELL, P.; HINES, J.; BARRATT, M. D.; BASKETTER, D. A. Skin irritation potential of mixed surfactant systems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 233-238, 1998.

KRAEMER, K. H. ***Ilex paraguariensis* St. Hil.(erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 1997. Tese de Doutorado

MONTANHA, J. A. – **Estudo químico e Biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A St. Hil. – Aquifoliaceae**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1990. Dissertação de Mestrado.

MOORE, P. N.; PUVVADA, S.; BLANKSCHTEIN, D. Role of the surfactant polar head structure in protein-surfactant complexation: zein protein solubilization by SDS/C₁₂E_n surfactant solutions. **Langmuir**, v. 19, p. 1009-1016, 2003.

SARNTHEIN-GRAF, C.; LA MESA, C. Association of saponins in water and water-gelatine mixtures. **Thermochemica Acta**, v. 418, p. 79-84, 2004.

WIGGER-ALBERTI, W.; KESKIN, M.; FEISTKORN, G.; WILHELM, K. P. Non-invasive assessment of patch test reactins due to hair dyes with the laser Doppler perfusion scanning technique. **6th Congress of the European Society of Contact dermatitis, Rome, Italy, 2002**.

ZUANG, V.; RONA, C.; ARCHER, G.; BERADESCA, E. Detection of skin irritation potential of cosmetics by non-invasive measurements. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, p. 358-371, 2000.

Conclusões Finais

- O método cromatográfico proposto por CLAE em sistema gradiente, permitiu a obtenção de um perfil cromatográfico para o EXL dos frutos imaturos, abrangendo uma faixa de polaridade, na qual se encontram as algumas das principais saponinas descritas para *Ilex paraguariensis*.
- As etapas de transformação tecnológica da matéria-prima vegetal, como o processo de extração e liofilização do extrato bruto, não produziram alterações detectáveis na composição química das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* avaliada através dos perfis cromatográficos por CCD e CLAE.
- Os métodos de purificação do EXL se mostraram eficientes e reprodutíveis na obtenção de produtos ricos em saponinas e sem alterações químicas detectáveis
- O método I (fracionamento em coluna) apresentou a vantagem do fracionamento do EXL, permitindo a obtenção concomitante de uma fração polifenólica e de uma fração saponosídica bem caracterizadas.

- O método II (contato direto com polímero), desenvolvido neste trabalho, permitiu a obtenção de um único produto purificado rico em saponinas, com a vantagem em relação ao método I, da rapidez do processo, menor custo e exclusão total de solventes orgânicos, o que o torna um método viável do ponto de vista tecnológico e ambiental.
- As espumas produzidas pelo EXL e Fr. 7090 apresentaram um processo de drenagem mais lento comparado aos tensoativos sintéticos, sendo atribuído à maior viscosidade de cisalhamento superficial dos filmes superficiais das saponinas.
- A Fr. 7090 apresentou um potencial de espumabilidade semelhante ao tensoativo aniônico.
- As espumas das saponinas apresentaram um perfil de estabilidade semelhante aos tensoativos não-iônicos, porém com uma maior tendência a estabilização do processo com o tempo.
- A adição de eletrólitos influenciou negativamente os perfis espumógenos e de estabilidade das espumas das saponinas.
- O diâmetro das micelas não apresentou influência sobre o comportamento espumógeno das saponinas, contudo apresentaram característica nos testes de espalhamento da luz que sugerem a formação de estruturas supra-micelares.
- As espumas das saponinas apresentaram uma resistência superior à observada para tensoativos sintéticos, porém, somente à 25 CMC.
- A espuma obtida com EXL apresentou pela análise bidimensional uma menor alteração da forma e número de bolhas de ar com o tempo, comparado à espuma de LSS. A concordância dos valores obtidos com os testes de espumabilidade e estabilidade das espumas indica tratar-se de um teste capaz de proporcionar informações autênticas da evolução estrutural das espumas

- O EXL, Fr. 70 e P6 foram classificados como produtos não-irritantes mediante o teste *in vivo* de irritação dérmica primária de Draize.
- O elevado potencial espumógeno das saponinas, aliado ao seu caráter não-iônico e de baixa toxicidade cutânea, fazem das saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, uma alternativa promissora como agente espumógeno de origem natural e renovável.

Anexos

Tabela A1. Distribuição granulométrica geral da matéria-prima vegetal, frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*.

FG (mm)	AM (MM)	F (%)	FR (%)	FP (%)
1,000 – 0,800	0,900	10,5	10,5	89,5
0,800 – 0,635	0,717	20,3	30,8	69,2
0,635 – 0,315	0,475	45,5	76,3	23,7
0,315 – 0,200	0,257	17,5	93,8	6,2
0,200 – 0,125	0,162	3,2	97,0	3,0
0,125 – 0,063	0,094	2,8	99,8	0,2
0,063 – 0,0	0,0315	0,2	100	0
Total		100,0		

FG = faixa granulométrica; AM = abertura média de malha; F = frequência relativa
FR = fração retida; FP = fração de passagem.

Tabelas A2: Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração de LSS.

Concentração [g/L]	Concentração Molar [mM]	Ln C [mM]	γ [mN m⁻¹] ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,0173	-4,0570	70,0 \pm 0,0
0,01	0,0346	-3,3639	70,0 \pm 0,0
0,02	0,0693	-2,66930	70,0 \pm 0,0
0,05	0,1733	-1,7527	70,0 \pm 0,0
0,1	0,3467	-1,0592	66,6 \pm 0,57
0,2	0,6935	-0,3660	64,0 \pm 1,0
0,3	1,0402	0,0394	60,0 \pm 0,28
0,5	0,7338	0,5503	52,1 \pm 0,28
1,0	3,4676	1,2434	46,5 \pm 0,86
5,0	17,3382	2,8529	39,4 \pm 1,60
10,0	34,6764	3,5460	36,8 \pm 0,78
20,0	69,3529	4,2392	37,8 \pm 0,76

Tabelas A3: Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração
 Poli. 80

Concentração [g/L]	Concentração Molar [mM]	Ln C [mM]	γ [mN m⁻¹] ($\bar{X} \pm s$)
0,001	0,0007	-7,2644	65,60 ± 1,52
0,005	0,0038	-5,5727	58,00 ± 1,0
0,01	0,0076	-4,8796	52,30 ± 1,25
0,02	0,0152	-4,1864	51,16 ± 1,25
0,05	0,0381	-3,2675	47,43 ± 1,52
0,1	0,0763	-2,5730	46,50 ± 1,32
0,2	0,1526	-1,8799	44,33 ± 0,57
0,3	0,2290	-1,4740	43,16 ± 1,89
1,0	0,7633	-0,2701	43,33 ± 2,08

Tabela A4. Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração
 para o Extrato bruto.

--	--	--	--

Concentração (g/L)	Concentração Molar [mM]	Ln [mM]	γ (mN/m) ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,0051	-5,2785	69,5 \pm 0,50
0,01	0,0103	-4,5756	65,3 \pm 0,57
0,02	0,0206	-3,8824	63,6 \pm 1,52
0,05	0,0517	-2,9622	57,8 \pm 1,60
0,1	0,1034	-2,2691	56,5 \pm 1,80
0,2	0,2069	-1,5755	53,3 \pm 0,70
0,5	0,5173	-0,6591	55,3 \pm 0,57
1,0	1,0347	0,0341	55,5 \pm 0,50

* Concentração molar expressa como matessaponina-1 (MM 996,45)

Tabela A5. Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração para a Fração 7090.

Concentração (g/L)	Concentração Molar [mM]	Ln [Mm]	γ (mN/m) ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,005017	-5,2949	63,90 \pm 0,17
0,01	0,010035	-4,6016	63,73 \pm 0,25
0,02	0,020071	-3,9084	58,33 \pm 0,57
0,05	0,050178	-2,9921	55,36 \pm 0,28
0,1	0,100356	-2,2990	52,50 \pm 0,50
0,2	0,200712	-1,6058	48,66 \pm 0,28
1,0	1,003562	0,0035	49,16 \pm 2,75

* Concentração molar expressa como matessaponina-1 (MM 996,45)

Tabela A6. Perfil de drenagem da solução de Polissorbato 80 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Poli. 80	0	0,90 ± 0,06	8,57	42,85	57,15
	1	1,70 ± 0,05	16,19	80,95	19,05
	5	1,88 ± 0,02	17,90	89,5	10,5
	10	1,88 ± 0,02	17,90	89,5	10,5
	30	1,90 ± 0,0	18,0	90,0	10,0
	60	1,92 ± 0,04	18,28	91,40	8,6
Poli.80/ NaCl	0	0,9 ± 0,14	8,57	42,85	57,15
	1	1,65 ± 0,07	15,71	78,55	21,45
	5	1,82 ± 0,03	17,33	86,65	13,35
	10	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	30	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15

Poli.80/ KBr	0	0,8 ± 0,56	7,61	38,05	61,95
	1	1,60 ± 0,14	15,23	76,15	23,85
	5	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95
	10	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	30	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	60	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
I Poli. 80/ KNO₃	0	0,7 ± 0,49	6,66	33,3	66,7
	1	1,60 ± 0,07	15,23	76,15	23,85
	5	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	10	1,85 ± 0,10	17,61	88,05	11,95
	30	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55
	60	1,95 ± 0,03	18,57	92,85	7,15
P Poli. 80/ MgCl₂	0	1,4 ± 0,96	13,33	66,65	33,35
	1	1,85 ± 0,20	17,61	88,05	11,95
	5	1,92 ± 0,10	18,28	91,4	8,6
	10	1,92 ± 0,10	18,28	91,4	8,6
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
Poli. 80/ Na₂HPO₄	0	0,95 ± 0,5	9,04	45,2	54,8
	1	1,67 ± 0,17	15,90	79,5	20,5

Poli.80 /Na₂HPO₄	5	1,90 ± 0,1	18,09	90,45	9,55
	10	1,92 ± 0,07	18,28	91,40	8,6
	30	1,92 ± 0,05	18,28	91,40	8,6
	60	1,97 ± 0,05	18,76	93,8	6,2

- 20 ml solução tensoativa = 2,1 cm na coluna = 100% de drenagem

Tabela A7. Perfil de drenagem da solução de Lauril sulfato de sódio (10 CMC) e à presença de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL(%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
LSS	0	0,9 ± 0,56	8,57	42,85	57,15
	1	1,6 ± 0,14	15,23	76,15	23,85
	5	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	10	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
LSS/ NaCl	0	0,77 ± 0,05	7,33	36,65	63,35
	1	1,55 ± 0,057	14,76	73,75	26,25
	5	1,87 ± 0,044	17,80	89,00	11,0
	10	1,89 ± 0,054	18,00	90,00	10,0
	30	1,93 ± 0,067	18,38	91,90	8,10
	60	1,97 ± 0,044	18,76	93,80	6,20

LSS/ KBr	0	0,50 ± 0,17	4,76	23,8	76,20
	1	1,53 ± 0,057	14,57	72,85	27,15
	5	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	10	1,91 ± 0,028	18,19	90,95	9,05
	30	1,98 ± 0,028	18,85	94,25	5,75
	60	2,03 ± 0,057	19,33	96,65	3,35

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
1 LSS/ 3 KNO ₃	0	0,95 ± 0,21	9,04	45,2	54,80
	1	1,60 ± 0,07	15,23	76,15	23,85
	5	1,9 ± 0,035	18,28	91,40	8,60
	10	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	30	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,20
	60	2,00 ± 0,0	19,04	95,20	4,80
1 LSS/ 2 MgCl ₂	0	1,00 ± 0,14	9,52	47,6	52,40
	1	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	5	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	10	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,20
	0	0,10 ± 0,28	0,95	4,75	95,25
	1	1,40 ± 0,14	13,33	66,65	33,35

LSS/Na₂HPO₄	5	1,80 ± 0,03	17,14	85,70	14,3
	10	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95
	30	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95

Tabela A8. Perfil de drenagem da solução do Extrato bruto (10 CMC) e à presença de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
EXL	0	0,15 ± 0,21	1,42	7,1	92,90
	1	1,1 ± 0,14	10,47	52,35	47,65
	5	1,67 ± 0,03	15,9	79,5	20,5
	10	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	30	1,82 ± 0,03	17,33	86,65	13,35
	60	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	12,00
EXL/ NaCl	0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0	100,0
	1	1,05 ± 0,07	10,0	50,0	50,0
	5	1,67 ± 0,03	15,90	79,5	20,5
	10	1,80 ± 0,0	17,14	85,7	14,3
	30	1,87 ± 0,02	17,0	89,0	11,0
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

EXL/ KBr	0	0,4 ± 0,14	3,80	19,0	81,0
	1	1,35 ± 0,21	12,85	64,25	35,75
	5	1,80 ± 0,14	17,14	85,7	14,3
	10	1,82 ± 0,10	17,33	86,65	13,35
	30	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
EXB/KNO₃ EXL/ KNO₃	0	0,1 ± 0,28	0,95	4,75	95,25
	1	0,95 ± 0,21	9,04	45,2	54,8
	5	1,50 ± 0,07	14,28	71,4	28,6
	10	1,70 ± 0,03	16,19	80,95	19,05
	30	1,82 ± 0,0	17,33	86,65	13,35
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
EXB/MgCl₂ EXL/ MgCl₂	0	0,75 ± 0,07	7,14	35,7	64,3
	1	1,5 ± 0,0	14,28	71,4	28,6
	5	1,92 ± 0,03	18,28	91,4	8,6
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	30	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8

EXB/Na₂HPO₄ EXL/Na₂HPO₄	0	0,35 ± 0,28	3,33	16,65	83,3
	1	1,45 ± 0,14	13,8	69,0	31,0
	5	1,90 ± 0,03	18,09	90,45	9,5
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,15
	30	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	60	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

Tabela A9. Perfil de drenagem da Fração 7090 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Fr. 7090	0	0,08 ± 0,13	0,76	3,80	96,2
	1	1,06 ± 0,08	10,09	50,45	49,5
	5	1,61 ± 0,06	15,33	76,65	23,3
	10	1,65 ± 0,05	15,71	78,55	21,4
	30	1,72 ± 0,06	16,38	81,9	18,1
	60	1,78 ± 0,08	16,95	84,75	15,2
Fr.7090/ I NaCl	0	0,1 ± 0,0	0,95	4,75	95,2
	1	1,2 ± 0,0	11,42	57,1	42,9
	5	1,79 ± 0,01	17,04	85,20	14,8
	10	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,5
	30	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,2
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
	0	0 ± 0,0	0,0	0,0	100,0

Fr. 7090/ KBr 1	1	1,0 ± 0,0	9,52	47,60	52,40
	5	1,75 ± 0,0	16,66	83,30	16,70
	10	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	30	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Fr. 7090/ F KNO₃ 3	0	0,05 ± 0,07	0,47	2,35	97,65
	1	1,27 ± 0,03	12,09	60,45	39,55
	5	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	10	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	30	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
Fr. 7090/ 1 MgCl₂ 2	0	0,35 ± 0,07	3,33	16,65	83,3
	1	1,25 ± 0,07	11,9	59,5	40,5
	5	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,5
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	30	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8
Fr. 7090/ Na₂HPO₄	0	0,2 ± 0,28	1,90	9,5	90,5
	1	1,37 ± 0,24	13,04	65,2	34,8
	5	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

FR7090/Na₂HPO₄	10	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	30	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	60	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

Biografia

- 1981 - 1983 Farmácia e Bioquímica com
Habilitação Farmacêutico na Universidade
Federal de Santa Maria – RS
- 1984 - 1985 Curso de Farmácia e Bioquímica com
Habilitação em Tecnologia dos Alimentos na
Universidade Federal de Santa Maria – RS
- 1985 - 1987 Farmacêutico Responsável Técnico -
Farmácia Menezes – Sobradinho/RS
- 1987 - 1988 Professora substituta da disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM
- 1988 - 1997 Professora Auxiliar da Disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM
- 1992 - 1997 Pós-Graduação no Curso de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas da
UFSM, nível Mestrado, sob orientação do
Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira –
UNESP

1997 - atual

Professora Assistente da Disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM

Pareceres
