

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ESTUDO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE SAPONINAS DO FRUTO DE ERVA

MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hill)

– Dissertação de Mestrado –

Caroline Garcia Finkler Da Silva

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo de técnicas de extração de saponinas do fruto de erva mate (*Ilex
paraguariensis* St. Hill)

Caroline Garcia Finkler Da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia. Área de
concentração: Fenômenos de Transporte

Orientadores:

**Prof.^a Dr.^a Ligia Damasceno Ferreira
Marczak**

Prof. Dr. Rubem Mário Figueiró Vargas

Porto Alegre

2016

Agradecimentos

Aos meus orientadores Ligia Damasceno Ferreira Marzack e Rubem Mário Figueiró Vargas por toda a motivação, apoio e confiança. Ao professor Eduardo Cassel pela paciência e por ter sido também um orientador essencial em todo este projeto.

À minha família por serem a base da minha formação, pelo incentivo e principalmente por estarem sempre ao meu lado.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos por todo auxílio e conhecimento.

A todos do Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS pela ajuda, solidariedade e momentos de distração. Agradeço em especial à colaboração e disposição da professora Aline Lucas, Rodrigo Scopel, Victor Hugo Silva Rodrigues.

À professora da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Grace Gossman, por toda a atenção e ajuda na identificação e obtenção das saponinas.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Resumo

O grande acúmulo de saponinas nos frutos imaturos de erva mate permite considerá-los uma fonte de matéria prima abundante e ainda não explorada para obtenção de saponinas. As saponinas são conhecidas como tensoativos naturais, sendo utilizadas pelas suas propriedades emulsificantes e farmacológicas. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o uso de técnicas de extração emergentes, como Extração assistida por Ultrassom (US), Campo Elétrico Moderado (CEM) e Extração por Fluido Supercrítico (EFS) para a extração seletiva de saponinas a partir de frutos imaturos de erva mate. Foram investigadas três condições de intensidade de ultrassom (565, 423 e 282 W cm⁻²) e de intensidade de campo elétrico (50, 37,5 e 25 V cm⁻¹) associadas a diferentes temperaturas de operação. A interação das intensidades de ultrassom e de campo elétrico com diferentes temperaturas foi avaliada através do método de superfície de resposta. Para as extrações por fluido super e sub crítico foram utilizadas três condições de pressão (10, 20 e 30 MPa) e posteriormente sua correlação com diferentes vazões de solvente (1,62; 2,22 e 2,78 x10⁻⁴ kg s⁻¹) e temperatura (30, 40 e 50 °C) foi investigada através dos métodos de superfície de resposta. Curvas de rendimento das extrações em função do tempo foram levantadas para as condições ótimas de campo elétrico e intensidade de ultrassom (37,5 V cm⁻¹ e 565 W cm⁻², respectivamente) a 40°C. As curvas foram modeladas matematicamente, com ajuste satisfatório, por modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem e também por um modelo difusivo baseado na 2ª Lei de Fick. Para extração supercrítica, foi construída a curva de extração para a condição de 10 MPa e 40 °C e esta curva foi modelada matematicamente. Assim, foram estimados parâmetros relacionados à transferência de massa, importantes para a compreensão fenomenológica dos processos extrativos. Nesse estudo, a extração com CO₂ supercrítico mostrou-se tecnicamente viável para a obtenção de saponinas, sendo mais seletiva em relação aos processos por campo elétrico e ultrassom. Os ensaios com ultrassom e campo elétrico conseguiram gerar extratos brutos com até 68,30 e 64,26 µg_{illex}·mg⁻¹_{extrato} em massa de equivalente de saponina por massa de extrato, respectivamente. Os extratos obtidos com fluido supercrítico apresentaram elevada seletividade para saponinas, gerando extratos brutos com até 100,9 µg_{illex} mg⁻¹_{extrato} de saponina por massa de extrato. A pressão de operação não apresentou efeito tanto no rendimento global de extrato quanto no de saponina.

Palavras-chave: erva mate, saponinas, *Ilex paraguariensis*, ultrassom, campo elétrico moderado e fluido supercrítico.

Abstract

Considering the substantial amount of saponins in unripe yerba mate fruits, they are an abundant source of raw material not exploited yet. Saponins are known as natural surfactants, being used by their emulsifier and pharmacological properties. This study aimed to evaluate emergent extraction techniques such as Ultrasound (US), Moderate Electric Field (MEF) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) for the selective extraction of saponins from unripe fruits of yerba mate. Three power conditions (565, 423 and 282 W cm⁻²), electric field intensities (50, 37.5 and 25 V cm⁻¹) and pressure conditions (10, 20 and 30 MPa) were initially assayed for US, MEF and SFE respectively at 40 °C. Power and electric field intensity were found to affect the saponins yields, thus, their correlation with different temperatures were evaluated with a factorial design. At the optimal condition, US and MEF saponins yields were 6.42% and 6.83% (%g_{illex} g_{extract}⁻¹). Extraction yield curves were raised for optimum conditions of electric field and ultrasound power (37.5 V cm⁻¹ and 565 W cm⁻², respectively). Three different kinetic models were used to model mathematically the overall extraction curves, namely a first-order, second-order, and a mass transfer model based on Fick's Law. The operating pressure had no effect on either the overall brute extract or saponins yield for SFE. Although the extracts obtained with supercritical fluid showed low brute extracts yields, it was highly selective for saponins yielding up to 10.09%. For supercritical extraction, the extraction curve for 10 MPa and 40 °C was assayed and the experimental data fitted by a mathematical model. Parameters related to mass transfer, important for understanding of the extractive processes, were successfully estimated. In this study, the extraction with ultrasounds, electric field and supercritical CO₂ were shown to be technically viable to obtain saponins from unripe yerba mate fruits, being EFS more selective than the other technics studied.

Keywords: yerba mate, saponins, *Ilex paraguariensis*, ultrasound, moderate electric field and supercritical fluid.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | 1 |
| LISTA DE TABELAS | 3 |
| LISTA DE SÍMBOLOS..... | 5 |
| LISTA DE SIGLAS | 8 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 1.1. OBJETIVOS..... | 10 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 11 |
| 2.1. Erva mate..... | 11 |
| 2.1.1. Frutos | 13 |
| 2.2. Saponinas | 14 |
| 2.2.1. Saponinas dos frutos da erva mate..... | 17 |
| 2.2.2. Técnicas de extração de saponinas | 20 |
| 2.3. Extração com campo elétrico moderado | 22 |
| 2.4. Extração com ultrassom | 24 |
| 2.5. Extração com fluido supercrítico..... | 27 |
| 2.6. Planejamento experimental | 29 |
| 2.7. Modelagem matemática | 31 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 3.1. Aquisição dos frutos | 34 |
| 3.2. Equipamentos | 34 |
| 3.2.1. Extrações assistidas por campo elétrico moderado | 34 |
| 3.2.2. Extrações assistidas por ultrassom..... | 35 |
| 3.2.3. Extrações por fluido supercrítico..... | 36 |
| 3.3. Ensaio preliminares | 37 |
| 3.4. Planejamento experimental | 40 |
| 3.5. Preparo das amostras para análise | 44 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.6. | Enriquecimento da fração saponosídica..... | 45 |
| 3.7. | Análises de saponinas | 46 |
| 3.7.1. | Cromatografia em camada delgada | 46 |
| 3.7.2. | Análise de saponinas totais por espectrofotometria..... | 48 |
| 3.8. | Modelagem matemática | 50 |
| 3.8.1. | Modelos cinéticos | 51 |
| 3.8.2. | Modelo difusivo para volume limitado (MDVL) – Crank (1975) | 53 |
| 3.8.3. | Modelo para extração supercrítica – Sovová (1994)..... | 55 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 58 |
| 4.1. | Resultados preliminares | 58 |
| 4.1.1. | Campo elétrico moderado | 58 |
| 4.1.2. | Ultrassom | 62 |
| 4.1.3. | Extração por fluido supercrítico | 63 |
| 4.1.4. | Frações saponosídicas..... | 64 |
| 4.1.5. | Cromatografia em camada delgada | 65 |
| 4.1.6. | Considerações..... | 66 |
| 4.2. | Planejamento experimental | 67 |
| 4.2.1. | Campo elétrico moderado | 68 |
| 4.2.2. | Ultrassom | 71 |
| 4.2.3. | Extração por fluido supercrítico | 74 |
| 4.3. | Modelagem matemática | 77 |
| 4.3.1. | Campo elétrico moderado e ultrassom..... | 77 |
| 4.3.2. | Extração por fluido supercrítico | 83 |
| 5. | CONCLUSÕES | 85 |
| | REFERÊNCIAS | 88 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Frutos imaturos de <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill | 13 |
| Figura 2 – Geninas presentes nas três classes principais de saponinas | 15 |
| Figura 3 – Agliconas das saponinas de erva mate..... | 18 |
| Figura 4 – Saponinas isoladas dos frutos de erva mate | 19 |
| Figura 5 – Atual distribuição das tecnologias empregadas na extração de saponinas de matéria vegetal..... | 20 |
| Figura 6 – Mecanismo de eletroporação..... | 24 |
| Figura 7 – Mecanismo de cavitação ultrassônica..... | 26 |
| Figura 8 – Diagrama de fase do dióxido de carbono..... | 29 |
| Figura 9 – Diagrama esquemático do sistema de campo elétrico moderado..... | 35 |
| Figura 10 – Equipamento de ultrassom tipo sonda | 36 |
| Figura 11 – Diagrama esquemático dos equipamentos do processo de extração com fluido supercrítico..... | 37 |
| Figura 12 – Planejamento fatorial 2 ² com ponto central | 41 |
| Figura 13 – Fluxograma de preparação de amostras em solução aquosa..... | 45 |
| Figura 14 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento da cromatografia em camada delgada simulando a separação dos compostos | 48 |
| Figura 15 – Curva de calibração de Ilexosídeo II | 50 |
| Figura 16 – Perfis de temperatura para as diferentes condições de campos elétricos aplicados aos frutos..... | 60 |
| Figura 17 – Cinética de extração do campo de 37,5 V cm ⁻¹ vs cinética do controle de temperatura | 61 |
| Figura 18 – Cromatografia em camada delgada das frações butanólicas dos extratos purificados..... | 66 |
| Figura 19 – Análise da variância do fatorial 2 ² com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas com auxílio de campo elétrico | 69 |
| Figura 20 – Superfície de resposta para a concentração de saponinas em função da intensidade de campo e temperatura para extrações auxiliadas por campo elétrico moderado | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 21 – Análise da variância do fatorial 2^2 com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas com auxílio de ultrassom..... | 72 |
| Figura 22 – Superfície de resposta para a concentração de saponinas em função da intensidade de ultrassom e temperatura para extrações auxiliadas por ultrassom..... | 74 |
| Figura 23 – Análise da variância do fatorial 2^2 com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas por extração supercrítica | 75 |
| Figura 24 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados das extrações de maior rendimento da fase preliminar ajustadas por modelos cinéticos..... | 79 |
| Figura 25 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados ($\%g_{\text{extrato}}g^{-1}_{\text{fruto seco}}$) das extrações de maior rendimento da fase preliminar ajustadas pelo modelo difusivo (MDVL) . | 81 |
| Figura 26 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados ($\%g_{\text{extrato}}g^{-1}_{\text{fruto seco}}$) das extrações nas condições ótimas para campo elétrico moderado e ultrassom ajustados pelo modelo difusivo (MDVL)..... | 82 |
| Figura 27 – Rendimento mássico experimental e simulado na condição de 10 MPa, 40 °C e $2,2 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ de CO_2 | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Aplicação de ultrassom para extração de saponinas | 25 |
| Tabela 2 – Efeitos dos planejamentos fatoriais | 41 |
| Tabela 3 – Análise da variância | 43 |
| Tabela 4 – Fatores de retenção dos padrões de saponinas e sapogenina | 48 |
| Tabela 5 – Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}}\text{g}^{-1} \text{ fruto seco}$) e concentração de saponinas ($\% \text{ g}_{\text{ilex}}\text{g}^{-1} \text{ extrato}$) para os extratos obtidos com auxílio de campo elétrico moderado | 59 |
| Tabela 6 – Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}}\text{g}^{-1} \text{ fruto seco}$) e concentração de saponinas ($\% \text{ g}_{\text{ilex}}\text{g}^{-1} \text{ extrato}$) para os extratos obtidos com auxílio de ultrassom | 62 |
| Tabela 7 – Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}}\text{g}^{-1} \text{ fruto seco}$) e concentração de saponinas ($\% \text{ g}_{\text{ilex}}\text{g}^{-1} \text{ extrato}$) para os extratos obtidos por extração supercrítica..... | 64 |
| Tabela 8 – Concentração de saponinas nas frações butanólicas obtidas por partição líquido-líquido | 64 |
| Tabela 9 – Planejamento fatorial 2^2 com repetição no ponto central variando campo e temperatura para as extrações auxiliadas por campo elétrico moderado..... | 68 |
| Tabela 10 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas com auxílio de campo elétrico moderado | 69 |
| Tabela 11 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 9 | 70 |
| Tabela 12 – Planejamento fatorial 2^2 com repetição no ponto central variando intensidade de ultrassom e temperatura para as extrações auxiliadas por ultrassom | 72 |
| Tabela 13 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas com auxílio de ultrassom | 72 |
| Tabela 14 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 12..... | 73 |
| Tabela 15 – Planejamento fatorial 2^2 com repetição no ponto central variando vazão de CO_2 e temperatura para as extrações por fluido supercrítico | 75 |
| Tabela 16 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas por extração supercrítica..... | 76 |
| Tabela 17 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 15..... | 76 |
| Tabela 18 – Parâmetros estimados pelo modelo de primeira ordem para as curvas a 40°C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom..... | 78 |

| | |
|--|----|
| Tabela 19 – Parâmetros estimados pelo modelo de segunda ordem para as curvas a 40 °C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom..... | 78 |
| Tabela 20 – Densidade específica do fruto de erva mate e raio da esfera equivalente | 80 |
| Tabela 21 – Parâmetros estimados pelo modelo de difusividade de uma esfera em uma solução de volume limitado para as curvas a 40 °C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom | 80 |
| Tabela 22 – Parâmetros estimados para as condições ótimas de campo elétrico moderado e ultrassom pelo modelo difusivo | 82 |
| Tabela 23 – Parâmetros de entrada para resolução das equações da modelagem da extração por fluido supercrítico | 83 |
| Tabela 24 – Parâmetros estimados através do modelo de Sovová (1994) e coeficientes de transferência de massa calculados para a extração a 10 MPa, 40°C e vazão de $2,22 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ de CO_2 | 84 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | | |
|------------|--|---|
| a | Raio da esfera equivalente | m |
| a_0 | Área superficial específica | m^{-1} |
| C^* | Intensidade de campo elétrico | $V\ cm^{-1}$ |
| C_∞ | Concentração de extrato em um tempo infinito | $g_{extrato}g^{-1}_{fruto\ seco}$ |
| C_t | Concentração de extrato acumulado | $g_{extrato}g^{-1}_{fruto\ seco}$ |
| d | Diâmetro médio da partícula | m |
| D | Coefficiente de difusão | $m^2\ s^{-1}$ |
| e | Quantidade adimensional de extrato | |
| h | Coordenada axial | |
| J | Taxa de transferência de massa | $kg\ m^{-3}s^{-1}$ |
| k_1 | Constante de extração 1ª ordem | m^{-1} |
| k_2 | Constante de extração 2ª ordem | $min\ (g_{extrato}g^{-1}_{fruto\ seco})^{-1}$ |
| k_f | Coefficiente de transferência de massa da fase fluida | $m\ s^{-1}$ |
| k_s | Coefficiente de transferência de massa da fase sólida | $m\ s^{-1}$ |
| K | Fator de partição | |
| n | Número de pontos experimentais | |
| P | Pressão | MPa |
| P^* | Intensidade de ultrassom | $W\ cm^{-2}$ |
| q | Quantidade específica de solvente | q |
| q_m | Quantidade específica de solvente no início da extração do interior das partículas | |
| q_n | Quantidade específica de solvente ao final da extração de soluto de fácil acesso | |

| | | |
|--------------|---|--|
| \dot{q} | Vazão mássica de solvente | $kg\ s^{-1}$ |
| Q | Vazão de CO ₂ | $m^3\ s^{-1}$ |
| r | Coordenada radial | |
| R_f | Fator de retenção | |
| t | Tempo | s |
| T^* | Temperatura | °C |
| u | Velocidade superficial do solvente | $m\ s^{-1}$ |
| V | Volume de solução | m^3 |
| V^* | Vazão mássica de CO ₂ | $\times 10^{-4}\ kg\ s^{-1}$ |
| W | Parâmetro do período rápido de extração | |
| x | Concentração relacionada ao soluto livre na fase sólida | |
| x_0 | Concentração inicial de soluto livre na fase sólida (fração mássica) | |
| x_k | Concentração inicial de extrato no interior das partículas sólidas (fração mássica) | |
| x_{1C} | Intensidade de campo elétrico (codificada) | |
| x_{1P} | Intensidade de ultrassom (codificada) | |
| x_{1V} | Vazão mássica de CO ₂ (codificada) | |
| x_2 | Temperatura (codificada) | |
| y | Concentração relacionada ao soluto livre na fase líquida | |
| y_{ilex} | Concentração de saponinas em equivalente de Ilexosídeo II | $\mu g_{ilex}\ mg^{-1}_{extrato\ bruto}$ |
| y_r | Solubilidade | kg/kg |
| Z | Parâmetro do período lento de extração | |
| z_w | Coordenada de contorno entre a extração rápida e lenta | |
| α | Proporção entre volume de solução e da esfera | |
| β_{ii} | Coeficientes da Equação 3.5 | |

| | | |
|---------------|---------------------------------|--------------|
| ε | Porosidade | |
| θ_n | Parâmetro do modelo difusivo | |
| ρ | Massa específica do solvente | $kg\ m^{-3}$ |
| ρ_e | Densidade específica | $kg\ m^{-3}$ |
| ρ_s | Massa específica da fase sólida | $kg\ m^{-3}$ |

LISTA DE SIGLAS

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEM – Campo Elétrico Moderado

DRMA – Desvios Relativos Médios Absolutos

EFS – Extração Supercrítica

MDVL – Modelo difusivo para volume limitado

RMEQ – Raízes das Médias dos Erros Quadrados

US – Ultrassom

MSR – Metodologia de superfície de resposta

1. INTRODUÇÃO

O Brasil vem ganhando destaque no cenário produtivo e comercial de erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil, tendo recentemente ultrapassado a Argentina em volume de produção com 860 mil toneladas de erva mate verde contra 690 mil toneladas (SEAB, 2014). Segundo os dados da PAM (Pesquisa Agrícola Municipal), o principal responsável pela produção de ervais cultivados ou a pleno sol é o Rio Grande do Sul, com 265 mil toneladas, seguido do Paraná com 195 mil toneladas (IBGE, 2013). Todo esse montante está relacionado estritamente ao comércio das folhas sendo os frutos um subproduto do processamento da erva mate e, portanto, desprovidos de valor comercial. A legislação brasileira proíbe a inclusão dos frutos no produto comercial “Erva mate” (MELLO, 2005). Entretanto, durante o período de frutificação, é inevitável que alguns frutos sejam processados juntamente às folhas. Além de alterar a composição química da bebida, as saponinas presentes nos frutos conferem um amargor ao produto final, causando um resultado negativo na aceitação pelo consumidor.

Segundo fontes industriais não existem números estatísticos a respeito da produção de frutos de erva mate, por ser um subproduto e também depender fortemente do clima. Entretanto, estima-se que em algumas regiões pode chegar a 40% do total da massa verde produzida pela planta. Encontrar aplicações para este material rico em compostos bioativos, além do uso para obtenção de semente, não só agregaria valor ao cultivo de *Ilex paraguariensis* St. Hil como também resolveria o problema da destinação deste resíduo.

Com vistas a uma futura aplicação industrial, é fundamental que a matéria prima vegetal tenha não só uma ampla disponibilidade como também um conteúdo elevado de saponinas. Para o emprego em produtos cosméticos e alimentícios, é necessário ainda que a planta tenha um longo histórico de uso humano e sua segurança deve estar comprovada (TANAKA et al., 1996)

Neste contexto, considerando o maior acúmulo de saponinas no fruto da erva mate em relação aos outros órgãos da planta, como folhas e raízes, estes constituem uma fonte de matéria prima abundante e ainda não explorada para obtenção destes compostos bioativos. As saponinas constituem uma das mais importantes classes de metabólitos secundários produzidos pelas plantas superiores, ocorrendo em grandes quantidades em tecidos vegetais

(HOSTETTMANN; MARSTON, 2005) e conhecidas como tensoativos naturais, sendo utilizadas principalmente por sua propriedade emulsificante (HOSTETTMANN; MARSTON, 2005).

De modo geral, as técnicas de extração mais empregadas na obtenção de saponinas a partir de produtos naturais são a maceração, o Soxhlet e refluxo. Todas consideradas técnicas convencionais, baseadas no uso abundante de solventes orgânicos. Recentemente tecnologias emergentes, como ultrassom e microondas, vêm ganhando destaque. Estes tipos de técnicas são caracterizadas pelo menor volume de solvente necessário, assim como a possibilidade de trabalhar com solventes menos nocivos ao meio ambiente e de grau alimentar. Outras vantagens são os menores tempos de operação necessários, possibilidade de trabalhar a temperaturas mais brandas e seu alto grau de seletividade para os compostos de interesse (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

Desta forma, o caráter inovador do presente estudo está na avaliação de técnicas extrativas emergentes em frutos de erva mate, sendo tais técnicas: extração assistida por ultrassom, campo elétrico moderado e extração por fluido supercrítico, ainda não relatadas na literatura, para a extração seletiva de saponinas a partir de frutos imaturos de erva mate.

1.1. OBJETIVOS

Principal

O objetivo geral deste trabalho é a investigação e comparação de diferentes operações de extração, tais como, ultrassom, campo elétrico e extração supercrítica e a indicação de condições adequadas para obtenção de saponinas dos frutos verdes de erva mate.

Específicos

- ✓ Obter extratos ricos em saponinas utilizando diferentes técnicas.
- ✓ Avaliar os efeitos de diferentes intensidades de campo elétrico, intensidades de ultrassom, pressões de fluido supercrítico e temperaturas no rendimento de saponinas e identificar as condições ótimas de operação.

- ✓ Caracterizar os extratos por cromatografia em camada delgada a fim de identificar as saponinas presentes nos extratos.
- ✓ Quantificar as saponinas por método espectrofotométrico.
- ✓ Avaliar o fenômeno da transferência de massa nos processos utilizados para obtenção de extratos através do levantamento da cinética de extração e modelagem matemática das curvas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. ERVA MATE

A erva mate, *Ilex paraguariensis* St. Hill, é uma árvore de clima subtropical, da família Aquifoliaceae, havendo ocorrência de produção na Região Sul do Brasil, onde a espécie é considerada nativa. A planta é usada há séculos no preparo de infusões e bebidas estimulantes, consumida principalmente em países da América do Sul como Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai devido a suas propriedades medicinais (PONTILHO et al., 2015). O extrato aquoso de suas folhas é denominado de chimarrão (infusão quente) no Brasil, mate (infusão quente) na Argentina e Uruguai e tererê (infusão fria) no Paraguai (GERHARDT, 2011).

Segundo dados do IBGE (2013), os produtos que se destacaram pelo valor da produção em território nacional, dentro do extrativismo vegetal não madeireiro, foram o açaí (R\$ 409,7 milhões), a erva mate nativa (R\$ 400,0 milhões) e a castanha-do-pará (R\$ 72,1 milhões) no que se refere a produtos alimentícios.

O Estado do Rio Grande do Sul, maior exportador da folha verde, possui cinco polos ervateiros, a saber, Planalto Missões, Alto Uruguai, Nordeste Gaúcho, Vale e Alto Taquari os quais detêm cerca de 62% da produção nacional e planta. O estado é responsável por 43,6% da área total do país dedicada a esta cultura. O cultivo da erva mate compreende um dos sistemas agroflorestais de importância socioeconômica e ambiental, mais antigos e característicos da Região Sul brasileira. A cadeia produtiva da erva mate possui uma forte característica regionalista, estando inserida em um mercado diferenciado e sendo mais

influenciado pelo hábito e tradição do que por variáveis macro ou microeconômicas (OLIVEIRA; WAQUIL, 2015)

De um modo geral, a erva mate é quase que exclusivamente comercializada para uso como chimarrão, mas existem usos alternativos no mercado, que estão relacionados no Quadro 1.

Quadro 1 – Subprodutos da erva mate de acordo com sua industrialização

| Aplicação | Produtos comerciais | Forma de consumo |
|-------------------------|--|--|
| Bebidas | Chimarrão, tererê, chá-mate: queimado, verde/cozido, solúvel. | Infusão quente ou fria |
| | Refrigerantes, sucos, cerveja e vinho. | Extrato de folhas diluído |
| Insumos de alimentos | Corante natural e conservante alimentar. | Clorofila e óleo essencial |
| | Sorvete, balas, bombons, caramelos, chicletes e gomas. | |
| Medicamentos | Estimulante do sistema nervoso central. | Extrato de cafeína e teobromina |
| | Compostos para tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia. | Extratos de flavonoides |
| Higiene geral | Bactericida e antioxidante hospitalar e doméstico, esterilizante, emulsificante. | Extrato de saponinas e óleo essencial |
| | Tratamento de esgoto, reciclagem de lixo urbano. | |
| Produtos de uso pessoal | Perfumes, desodorantes, cosméticos, sabonetes. | Extrato de folhas seletivo e clorofila |

Fonte: BRUN, 2012.

As folhas de erva mate contêm xantinas (como cafeína), flavonoides glicosídicos (como rutina e catequina), derivados do ácido cafeoilquínico (ácido clorogênico) e uma quantidade significativa de saponinas triterpenoides (cerca de 10%) tendo o ácido ursólico como principal aglicona (FILIP et al., 2000; HECK; DE MEJIA, 2007; SCHENKEL et al., 1997). As folhas são utilizadas, popularmente, para tratar diversas enfermidades como fadiga, digestão lenta e doenças hepáticas (BASTOS et al., 2007).

Fatores como estágio evolutivo da planta, época de colheita, características climáticas e de clima influenciam na variação da composição química da erva mate (VALDUGA et al., 1997). Etapas de processamento industrial, como sapeco e secagem, acarretam em alterações físico químicas que podem influenciar nos teores de compostos presentes na erva mate (ESMELINDRO et al., 2002).

Dentre as atividades farmacológicas atribuídas a compostos presentes em extratos de erva mate destacam-se: atividade quimio preventivas (prevenção de dano celular causado por doenças crônicas), inibição da glicação, inibição do estresse oxidativo, efeito colerético (aumento do fluxo biliar) e propulsão intestinal, efeito vasodilatador e atividade antioxidante (BARLETTE, 2011).

2.1.1. FRUTOS

O fruto de erva mate é esférico, carnosos, na forma de baga-drupa preta quando seco, com um diâmetro médio de 5 mm e podendo ser verde (Figura 1), vermelho ou vinho, dependendo do seu estágio de maturação (ZANON, 1988).

Figura 1 – Frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* St. Hill



A época de floração compreende o período de setembro a dezembro, com ápice no mês de outubro. O início da maturação das sementes é a mudança gradativa de coloração dos frutos de verde à vermelha e, quando totalmente maduros, violeta-escuro. A colheita dos frutos maduros é realizada nos meses de dezembro a abril. Em árvores de erva mate, como na maioria das espécies nativas do sul do Brasil, a maturação dos frutos não é homogênea; são encontrados, na época normal de colheita, frutos verdes, fisiologicamente maduros e também frutos passados. Esta heterogeneidade de maturação, variável tanto na árvore quanto entre as árvores, constitui um difícil problema para a colheita em quantidade de semente de alta qualidade e acaba impactando a produção de erva mate, uma vez que árvores em período de frutificação, preferencialmente, não são usadas para a colheita de folhas verdes (ZANON, 1988).

A colheita pode ser realizada no chão, após a queda dos frutos, ou diretamente das árvores. O beneficiamento de sementes de erva mate inicia-se logo após a colheita, pela catação somente dos frutos que apresentam a coloração violeta-escuro e descarte dos frutos verdes (ZANON, 1988).

Uma árvore adulta que produz cerca de 150 kg de folhas pode produzir até 20 kg de frutos quando a pleno sol, o que compreende uma quantidade não negligenciável de uma matéria prima rica em compostos bioativos que é tratada como resíduo na produção ervateira (FERNANDES et al., 2016).

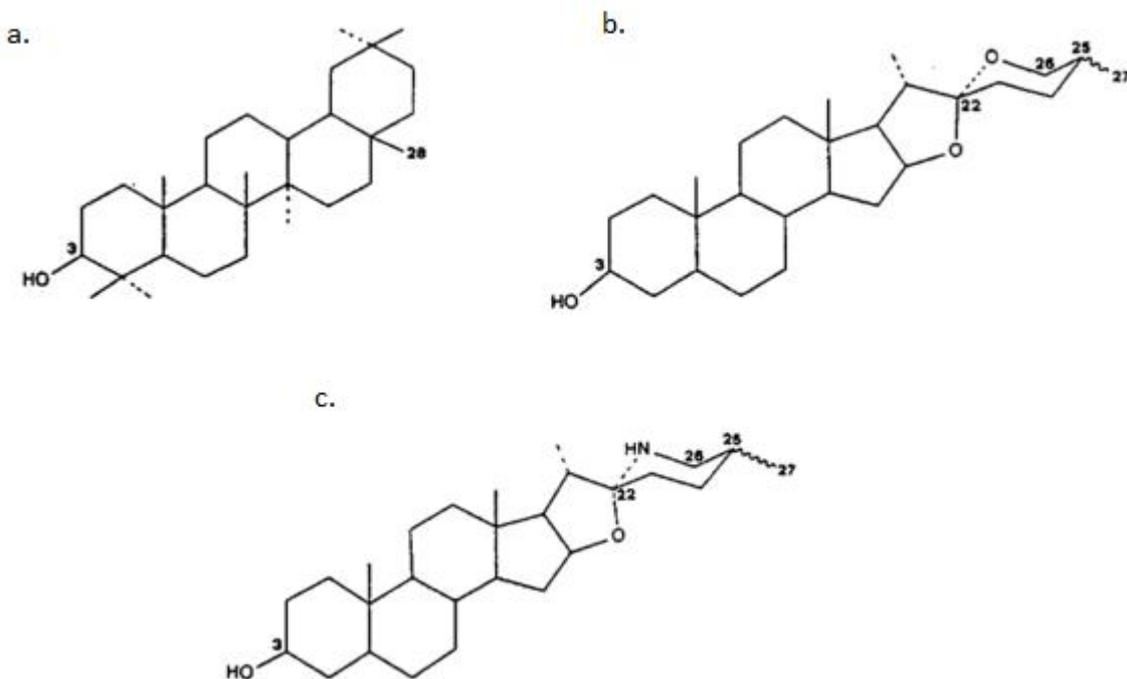
2.2. SAPONINAS

Saponinas são metabólicos secundários produzidos por plantas superiores notificadas em aproximadamente 100 famílias botânicas. Ocorrem em grandes quantidades (até 30%) em tecidos vegetais e, em menor proporção, em alguns animais (HOSTETTMANN; MARSTON, 2005; OLESZEK, 2002). Atuam como uma barreira química no sistema de defesa das plantas contra patógenos e herbívoros (AUGUSTIN et al., 2011) sendo encontradas em tecidos vegetais mais vulneráveis a ataques por fungos, bactérias ou insetos (WINA; MUETZEL; BECKER, 2005).

As saponinas são glicosídeos de elevada massa molecular (600 a 2000 Da) apresentando um núcleo fundamental, conhecido como aglicona, ligados a diferentes tipos e números de unidades de açúcares (BITENCOURT et al., 2014).

A aglicona, ou a porção não-sacarídica da molécula da saponina, é chamada genina ou sapogenina. Dependendo do tipo de genina presente, as saponinas podem ser classificadas como: glicosídeos triterpênicos, glicosídeos esteroidais ou alcaloides esteroidais glicosilados. Saponinas triterpênicas apresentam um núcleo triterpênico pentacíclico composto por 30 átomos de carbono, enquanto saponinas esteroidais são compostas por um núcleo esteroidal de 27 átomos de carbono. As saponinas esteroidais, no entanto, não são largamente distribuídas na natureza como as do tipo triterpênico. As geninas destas três classes estão apresentadas na Figura 2 (HOSTETTMANN; MARSTON, 2005).

Figura 2 – Geninas presentes nas três classes principais de saponinas



a. glicosídeos triterpênicos; b. glicosídeos esteroidais; c. alcaloides esteroidais glicosilados.

Fonte: Hostettmann e Marston, 2005.

Os açúcares mais comuns encontrados nas saponinas são hexoses (glicose, galactose), 6-deoxiexoses (ramnose), pentoses (arabinose, xilose), ácidos urônicos (ácido glicurônico) ou aminoaçúcares (glicosamina) (CANTO, 2007). 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 (OLESZEK; BIALY, 2006).

O nome saponina vem do latim *sapo* que significa “sabão”, cujo nome deriva de sua propriedade de formação de espuma permanente em soluções aquosas (MILGATE; ROBERTS, 1995). Tem por característica o sabor amargo e acre e os medicamentos que os contêm geralmente são esternutatórios (provocam espirros) e irritantes para as mucosas. Devido ao seu caráter anfifílico (caracterizado pela presença de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas), as saponinas são conhecidas como tensoativos naturais, sendo utilizadas principalmente por sua propriedade emulsificante (HOSTETTMANN; MARSTON, 2005).

Saponinas provenientes da “erva saboeira” (*Saponaria officinalis* L) vêm sendo usadas como detergente caseiro há séculos. Sementes de “veneno de peixe” (*Barringtonia asiatica* Kurz), conhecidas por conter saponinas, são tradicionalmente usadas na Ásia por pescadores por sua atividade piscicida (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004) para aumentar o rendimento de pesca. O uso das saponinas não está somente limitado a usos tradicionais: recentemente diversos setores industriais, como têxtil, farmacêutico, alimentício, cosmético e a produção de bebidas têm se beneficiado de sua atividade (HOSTETTMANN; MARSTON, 2005).

Atividades farmacológicas, especialmente seu caráter anticancerígeno, tem intensificado a busca por saponinas de origem vegetal, e com isso novas tecnologias extrativas são investigadas com o objetivo de maximizar seu rendimento para suprir a recente demanda. As saponinas e os polifenóis são considerados por alguns autores como os responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos observados na medicina tradicional chinesa. Propriedades hemolíticas, moluscidas, anti-inflamatórias, antifúngicas, bactericida, antitumoral e antiviral lhes são atribuídas como também potencial antioxidante e como adjuvante imunológico (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). O efeito benéfico da ingestão de saponinas em colesterol no plasma para seres humanos é outro fator importante que contribui para a identificação contínua de saponinas (MILGATE; ROBERTS, 1995).

Relatos recentes sugerem que saponinas apresentam efeito antiobesidade e características antihiperlipidêmicas, o que pode ser benéfico para pacientes com diabetes tipo II, pois melhora a sensibilidade à insulina e diminui a resistência à leptina (ELEKOFEHINTI, 2015).

Além das aplicações farmacêuticas, o uso de saponinas em alimentos ganha destaque, sendo usadas em alimentos como surfactantes naturais e conservantes contra microrganismos (PIORKOWSKI; MCCLEMENTS, 2014). Sua capacidade de formar sistemas estáveis e comestíveis para o transporte de vitamina E as tornam indicadas para o encapsulamento de alimentos funcionais (YANG; MCCLEMENTS, 2013). Segundo Wojciechowski *et al.*, (2014), saponinas isoladas da *Quillaja saponaria* podem ser usadas como um biosurfactante de baixo peso molecular. Plantas ricas em saponinas como “alfafa” (*Yucca schidigera*) são usadas como aditivos alimentícios para aumentar o crescimento, a eficiência alimentar, produção de leite e lã em ruminantes (FRANCIS *et al.*, 2002).

O extrato saponosídico de *Sapindus saponaria* combinado com tratamento térmico é recomendado para inativar *Alicyclobacillus acidoterrestris*, uma bactéria causadora de deterioração em suco de laranja (ALBERICE *et al.*, 2012). Infusões de saponinas combinadas com *Bacillus amyloliquefaciens*, imazalil e procloraz têm sido utilizadas para o tratamento pós-colheita de tangerinas, reduzindo a incidência do mofo verde e azul e podridão ácida (HAO *et al.*, 2011).

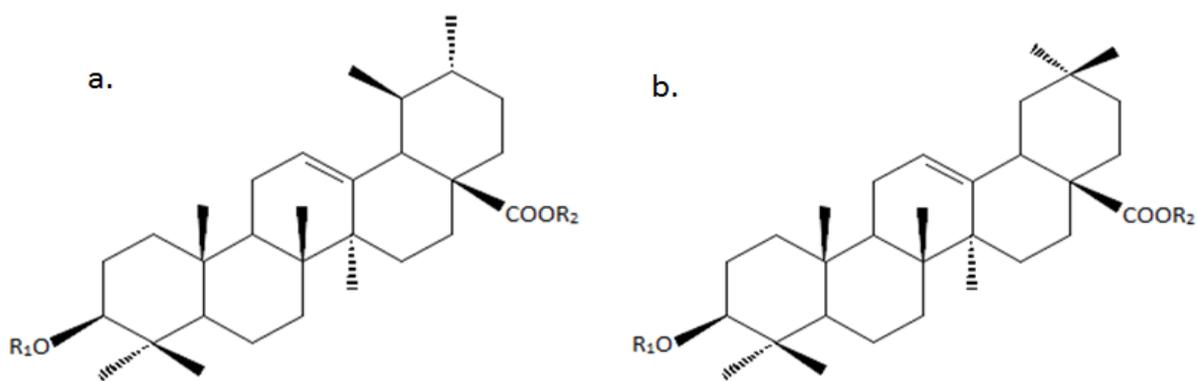
Devido ao efeito hipocolesterolêmico e estabilidade após cozimento demonstrado pelas saponinas, elas têm sido incorporadas a massas de pães, na forma de isolados ou extratos obtidos a partir de farinhas de leguminosas. Particularmente, isolados de saponinas são responsáveis por melhorias na textura de pães e seus efeitos têm sido estudados na produção de tortilhas e biscoitos (CHÁVEZ-SANTOSCOY *et al.*, 2016).

2.2.1. SAPONINAS DOS FRUTOS DA ERVA MATE

As saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hill apresentam, exclusivamente, agliconas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico (Figura 3), o que permite diferenciá-las das saponinas das demais espécies sul-americanas do gênero *Ilex*, as quais são

predominantemente derivadas do ácido 19- α -hidroxi-ursólico (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).

Figura 3 – Agliconas das saponinas de erva mate



a. ácido ursólico; b. ácido oleanólico

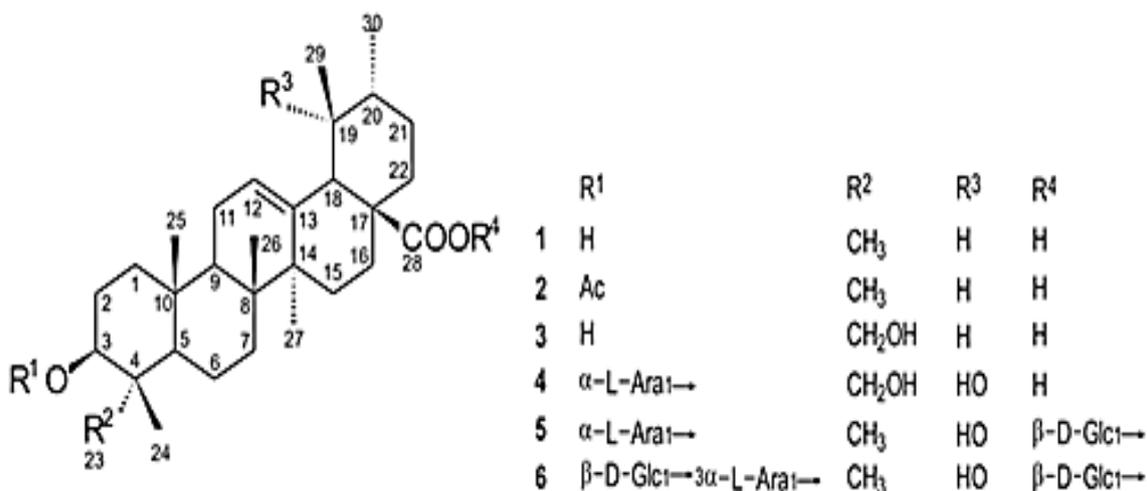
O ácido ursólico e o seu isômero, ácido oleanólico, são compostos triterpenoides encontrados em todo o reino vegetal, que têm efeitos antiartríticos, anti-inflamatórios e efeito hepato-protetor em ratos. Por serem relativamente não tóxicos, têm sido utilizados em cosméticos e produtos de saúde (GUGLIUCCI et al., 2009).

A pesquisa da presença de saponinas em outros órgãos, como folhas e galhos, e a comprovação de teores elevados de saponinas nos frutos imaturos levou a estudos posteriores sobre o isolamento e identificação destas saponinas (CANTO, 2007). A fim de comparar frações saponosídicas de folhas e de frutos, Taketa (2001) analisou amostras de frutos imaturos de três populações nativas de *Ilex paraguariensis* St. Hill, isolando e identificando seis compostos, sendo destes, duas sapogeninas e três saponinas (Figura 4) não detectadas previamente nas folhas da espécie.

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*.

Quanto às propriedades organolépticas da erva mate, Taketa *et al.*, (2004) demonstraram que as saponinas presentes nos frutos apresentaram amargor inferior ao observado para as saponinas isoladas das folhas. Das saponinas isoladas dos frutos, o Ilexosídeo II apresentou amargor três vezes inferior ao obtido para saponinas apenas nas folhas.

Figura 4 – Saponinas isoladas dos frutos de erva mate



Sapogeninas: (1) Ácido ursólico, (2) ácido acetilursólico, (3) ácido 23-hidroxiursólico;
Saponinas: (4) matesídeo, (5) *Ziyu*-glicosídeo I e (6) Ilexosídeo II.

Fonte: Taketa *et al.*, 2004.

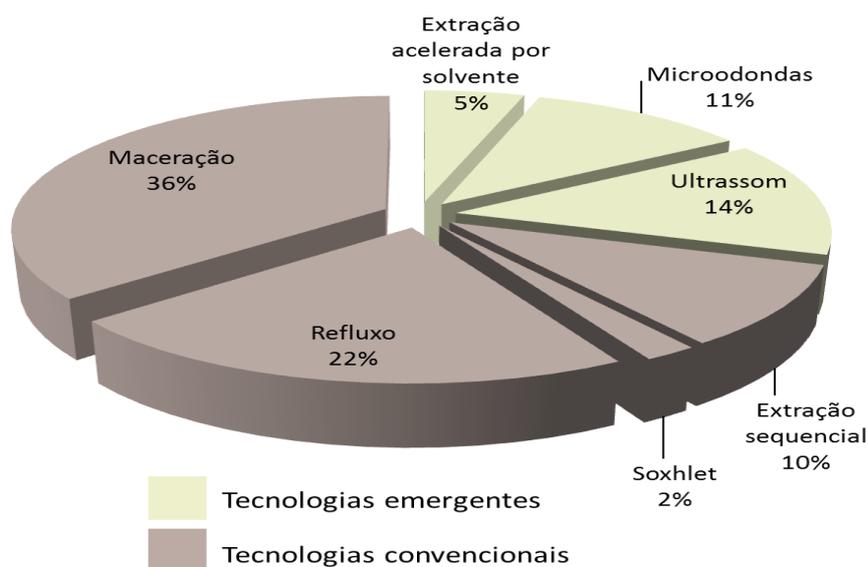
O potencial de frações saponosídicas foi avaliado por do Canto (2007), que obteve resultados significativos quando comparados a tensoativos sintéticos. A irritabilidade cutânea também foi avaliada, não sendo detectada irritação significativa. Estes resultados tornam o estudo de saponinas provenientes dos frutos ainda mais interessante, principalmente quando comparada a frações obtidas de outras espécies vegetais, frequentemente hemolíticas e irritantes (FRANCIS *et al.*, 2002).

Estudos com extratos saponosídicos de *I. paraguariensis* comprovam ainda sua capacidade de reduzir gordura visceral, oxidação da glicose hepática, tecido adiposo e triglicerídeos (ELEKOFEHINTI, 2015).

2.2.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE SAPONINAS

No geral, as técnicas de extração empregadas na obtenção de saponinas podem ser classificadas em duas categorias: convencionais e tecnologias emergentes. As técnicas convencionais mais comumente usadas são maceração, Soxhlet e refluxo e dentre as tecnologias emergentes destacam-se ultrassom, microondas e extrações aceleradas por solvente. A distribuição dos seus usos pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 – Atual distribuição das tecnologias empregadas na extração de saponinas de matéria vegetal



Fonte: Cheok *et al.*, (2014)

Extrações convencionais são baseadas na solubilidade do soluto presente na matéria vegetal em solventes. Portanto, frequentemente utilizam grandes quantidades de solvente para obter o soluto de interesse, mesmo quando é auxiliada por temperaturas elevadas e agitação mecânica. Por outro lado, as tecnologias verdes envolvem sínteses químicas menos danosas, uso de produtos químicos mais seguros, maior eficiência energética, uso de matérias primas renováveis e redução de poluição (AZMIR *et al.*, 2013). A concepção de tecnologias de extração emergentes é governada sob a ótica de ser “*environment-friendly*”. Desta forma,

solventes verdes como água e dióxido de carbono são comumente usados para extração através da manipulação da temperatura e pressão do sistema de extração, como na extração com líquido pressurizado (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

As propriedades farmacêuticas das saponinas, especialmente seu caráter anticancerígeno, têm incentivado a busca por novos métodos de extração visando o máximo rendimento para suprir a crescente demanda. A literatura demonstra claramente que pesquisadores estão mais inclinados à seleção das técnicas de extração convencionais. A seleção do método está, geralmente, relacionada ao foco do estudo conduzido. Enquanto que para o isolamento de novas saponinas e estudos farmacológicos, técnicas convencionais são mais empregadas, trabalhos com foco em estudos de quantificação e de otimização favorecem o uso de tecnologias emergentes (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

Observa-se que o uso de extração assistida por ultrassom é a técnica emergente mais selecionada em estudos de quantificação, o que implica a sua capacidade e eficiência em obter rendimentos significativos de saponinas. Técnicas baseadas em campos elétricos praticamente não são relatadas em processos extrativos de saponinas e poucos estudos empregam o uso de fluidos supercríticos para este fim (BITENCOURT et al., 2014).

Entre os métodos de extração seletiva e de purificação mais utilizados na obtenção de extratos ricos em saponinas, está a extração por partição líquido-líquido através do emprego da água e solventes orgânicos de polaridade crescente, como o clorofórmio, acetato de etila e butanol (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2003), que é um método de purificação e isolamento clássico na química de produtos naturais. Contudo, a desvantagem deste método, além do emprego de solventes orgânicos, é a retenção de saponinas altamente polares na fase aquosa remanescente. 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 e hidrólises dos grupos éster lábeis (TAKETA, 2001).

Trabalhos mais recentes incluem uma extração prévia 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 e produzir mais artefatos que saponinas genuínas. Para obter uma composição

real de saponinas, extrações a frio com soluções etanol – água são as mais indicadas (OLESZEK; BIALY, 2006). As proporções de água e etanol já foram extensivamente relatadas e sugerem que a condição ótima está entre 30 e 40% de etanol (ATHAYDE; SCHENKEL, 2000; CANTO, 2007).

2.3. EXTRAÇÃO COM CAMPO ELÉTRICO MODERADO

Campos elétricos aplicados em alimentos surgiram como uma alternativa para processamentos térmicos, e por anos atribuíam-se seus efeitos apenas ao aumento de temperatura pela aplicação de um campo elétrico sem efeito biológico nas células dos tecidos (VOROBIEV; LEBOVKA, 2008).

Tratamentos com campo elétrico moderado (CEM) oferecem diversas aplicações úteis para a indústria de alimentos. Seu potencial como facilitador na extração de compostos intracelulares de tecidos vegetais para a melhoria na obtenção de óleos, sucos e compostos específicos tem sido alvo de estudos recentes (CORRALES et al., 2008). Simpson (2015), relata o uso de campos elétricos de moderada intensidade como facilitadores do processo difusivo durante a desidratação osmótica em maçãs. Sua aplicação no aumento da produção de metabólicos secundários também vem sendo reportada (BINOTI, 2012; VALLVERDÚ-QUERALT et al., 2013).

Poucos estudos podem ser encontrados sobre uso específico de campo elétrico moderado para extração. Dentre os trabalhos publicados, Oliveira *et al.*, (2015) relatam o uso de campo moderado como uma técnica econômica e eficiente para a extração de pectina da casca de maracujá. Barba *et al.*, (2016), fizeram uma revisão sobre o uso de tecnologias baseadas em campos elétricos aplicadas à recuperação de compostos antioxidantes de resíduos da produção de vinhos. Koubaa *et al.*, (2015) revisaram o uso de campos elétricos pulsados de moderada a alta intensidade e também descargas de alta tensão para recuperação de compostos de alto valor nutricional a partir de folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Estudos têm mostrado que a aplicação de um campo elétrico moderado possui efeitos não térmicos que aumentam a difusão de compostos intracelulares (KULSHRESTHA;

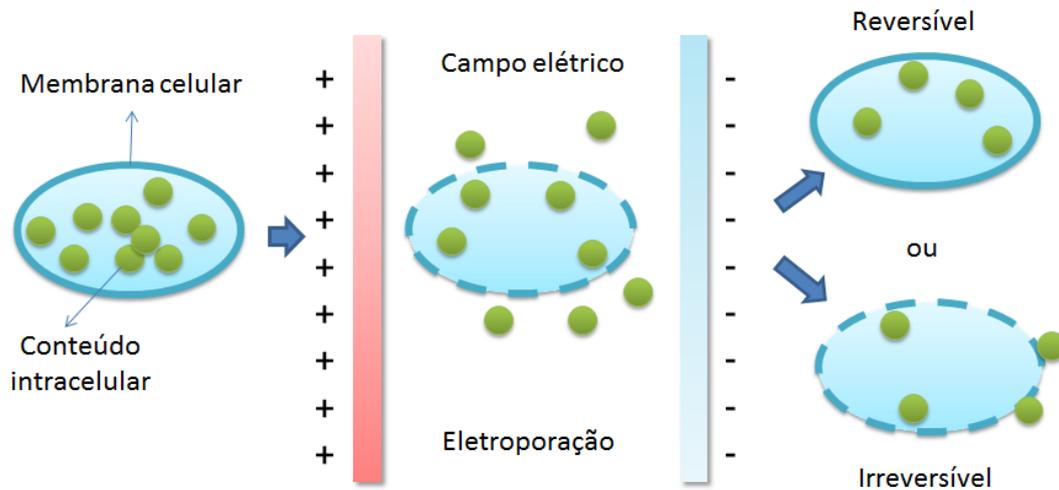
SASTRY, 2010). Esses efeitos, que nem sempre foram considerados, e não são, ainda, completamente compreendidos (MERCALI et al., 2014).

A técnica consiste na aplicação de um campo elétrico gerado pela passagem de uma corrente elétrica alternada aplicada de maneira contínua em um meio onde estejam localizadas células vegetais ou animais, que podem ser consideradas um corpo condutor rodeado por uma camada dielétrica.

A presença de um potencial induzido na membrana fornece a energia livre suficiente para rearranjar as estruturas dos fosfolipídios da membrana celular, permitindo a formação de poros hidrofílicos. Este efeito é chamado de eletroporação ou eletropermeabilização, que consiste na formação de poros e consequente aumento da permeabilidade da membrana celular. A ocorrência de poros acarreta em uma menor resistência, facilitando a difusão de componentes internos da célula (LOGHAVI; SASTRY; YOUSEF, 2015).

Se o campo elétrico aplicado for superior a um valor crítico resultará num dano celular irreversível ocasionando a ruptura da célula, ou seja, ocorrerá a formação de poros permanentes. Se o campo elétrico for menor do que o valor crítico, os danos serão reversíveis e, assim, quando a aplicação do campo for cessada a célula recuperará sua estrutura e funcionalidade. Na Figura 6 está representado um esquema do processo de eletroporação em uma célula vegetal com danos celulares reversíveis e irreversíveis, onde há a representação de um composto interno à célula que permeia a membrana celular até atingir o meio.

Figura 6 – Mecanismo de eletroporação



O processamento por campo elétrico moderado envolve a aplicação de corrente alternada gerando um campo elétrico, normalmente com frequência de 50 Hz, e intensidade de campo elétrico inferior a 1000 V cm^{-1} . Conforme a exposição elétrica e térmica a que a célula será exposta em cada processamento, é possível obter-se inúmeras combinações de efeitos em materiais biológicos e ainda existe um grande número de aplicações potenciais para serem investigadas (VOROBIEV; LEOVKA, 2008).

Campos com maiores tensões e menores frequências apresentam resultados melhores na facilitação do processo difusivo. Esta facilitação é mais evidente quando o produto a ser tratado possui células intactas. Estes resultados foram apresentados por Kulshrestha e Sastry (2003), que estudaram a os efeitos de campos de 0 a $23,9 \text{ V cm}^{-1}$ e frequências de 0 a 5 kHz sobre a difusão do corante de beterraba.

2.4. EXTRAÇÃO COM ULTRASSOM

Ultrassom é um dos métodos mais usado hoje para melhorar o fenômeno de transferência de massa. Sua viabilidade para a extração de metabólitos secundários, como flavonoides e polifenóis, em plantas medicinais tem sido alvo de várias pesquisas

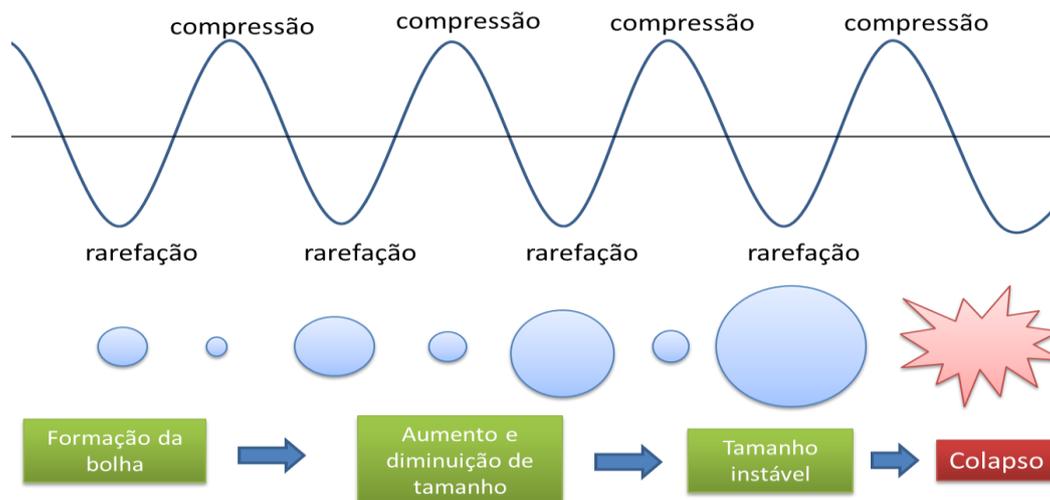
(CORRALES et al., 2008; WU; LIN; CHAU, 2001). Embora a extração assistida por ultrassom seja comumente empregado na extração de compostos bioativos, pouco material pode ser encontrado sobre extração de saponinas (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). Um resumo dos trabalhos publicados empregando o uso de ultrassom para a extração de saponinas a partir de fontes vegetais está apresentado na Tabela 1.

O ultrassom é uma onda mecânica que se diferencia do som audível pelos seres humanos por apresentar frequências maiores que 20 kHz (LUQUE DE CASTRO; PRIEGO-CAPOTE; PERALBO-MOLINA, 2011). Um dos fenômenos produzidos pela propagação de ultrassons em líquidos é a cavitação. Caracterizada pela formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas entrem em colapso, muitas vezes, de forma violenta, liberando grande quantidade de calor e exercendo elevadas pressões próximas à região da implosão (ESCLAPEZ et al., 2011). Este fenômeno está esquematicamente ilustrado na Figura 7.

Tabela 1 – Aplicação de ultrassom para extração de saponinas

| Material vegetal | Autores |
|---|----------------------|
| <i>Allium nigrum</i> L | MOSTAFA et al., 2013 |
| <i>Panax quinquefolium</i> , <i>Panax ginseng</i> | WU; LIN; CHAU, 2001 |
| <i>Bacopa monnieri</i> | GANZERA et al., 2004 |
| <i>Chiocacca alba</i> | BORGES et al., 2013 |
| <i>Caulophyllum thalictroides</i> | AVULA et al., 2011 |
| <i>Dioscorea panthaica</i> | WANG et al., 2012 |
| <i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> | ZHANG et al., 2010 |
| <i>Platycodi Radix</i> | HA et al., 2006 |
| <i>Ziziphus jujube</i> , <i>Z.jujuba</i> var <i>spinosa</i> | GUO et al., 2011 |

Figura 7 – Mecanismo de cavitação ultrassônica



Efeitos mecânicos do ultrassom permitem uma penetração mais rápida e mais completa do solvente no interior das células, melhorando a transferência de massa. A presença de materiais sólidos no sistema provoca uma implosão assimétrica das microbolhas, gerando jatos que colidem com as superfícies sólidas e também ocasiona a circulação de líquidos devido à turbulência gerada. Essas colisões fazem com que as paredes celulares das células vegetais sejam rompidas, facilitando a difusão do solvente (CASTRO; CAPOTE, 2007). Soma-se a isso, o calor liberado pelas implosões que aumentam a solubilidade dos analitos e consequentemente a eficiência de extração. O uso de ultrassom resulta na diminuição do tempo de operação e quantidade de solvente necessária. Baixas frequências (20 kHz) são eficazes para a extração de compostos provenientes de fontes vegetais, uma vez que bolhas formadas em baixas frequências são maiores que as formadas em altas frequências, e implodem de maneira mais violenta, sendo consequentemente mais eficientes nos processos de extração (ESCLAPEZ et al., 2011).

As principais variáveis a serem observadas no processo de sonicação são: a natureza do tecido do material a ser extraído e a localização dos compostos de interesse na estrutura deste tecido, o tipo de composto que se deseja extrair, os efeitos da disruptura celular causada pelo ultrassom, o aumento da superfície de transferência de massa, a difusão intraparticular e a redução do tempo de extração (VILKHU et al., 2008).

2.5. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

A extração supercrítica é um método de separação e purificação amplamente utilizado em processos de separação de produtos naturais que apresenta vantagens em comparação com os métodos tradicionais (REVERCHON, 1996). Em relação a processos em grande escala, destaca-se a extração de nicotina do cigarro e na indústria de alimentos, os processos de descafeinização de café e chá, assim como a produção de lúpulo para a produção de cervejas. A partir de 1980, vem ocorrendo um grande desenvolvimento nos processos de extração com fluidos supercríticos para diferentes produtos como: a remoção de colesterol da manteiga, a remoção de solventes residuais presentes em monômeros, a obtenção de óleos essenciais a partir de produtos naturais e outros (TAYLOR, 1996).

Processos de extração supercrítica em escala piloto são fundamentalmente empregados em desenvolvimento de processo e produção de extratos de elevado valor agregado. Entre as aplicações mais comuns se encontram as extrações de aromas e fragrâncias de alto valor agregado como são os casos dos óleos essenciais de rosas e jasmim (BRUN, 2012). Seu uso para a extração de compostos bioativos a partir de fontes naturais foi revisado por da Silva, Rocha-Santos e Duarte (2016).

O fluido supercrítico apresenta propriedades, tais como alta difusividade, baixa viscosidade e baixa tensão superficial, o que lhe confere características atraentes como solvente para extração de componentes de matrizes sólidas (TAYLOR, 1996). A extração por fluido supercrítico é altamente seletiva, o solvente é facilmente removido do extrato de interesse e as temperaturas operacionais são moderadas, o que permite a preservação de espécies termolábeis no extrato.

A técnica compreende a passagem do solvente em condições supercríticas por um vaso extrator, onde a matéria prima é depositada, constituindo assim um leito fixo no vaso extrator. A obtenção de solutos presentes em produtos naturais, empregando este processo, consiste na extração de princípios ativos de determinadas matrizes sólidas através da solubilização dos mesmos em um solvente nas condições supercríticas. O processo abrange duas etapas principais: primeiramente ocorre a etapa de dissolução do soluto da matriz vegetal seguida da etapa referente ao transporte deste soluto da fase sólida para a fase fluida. Na etapa de

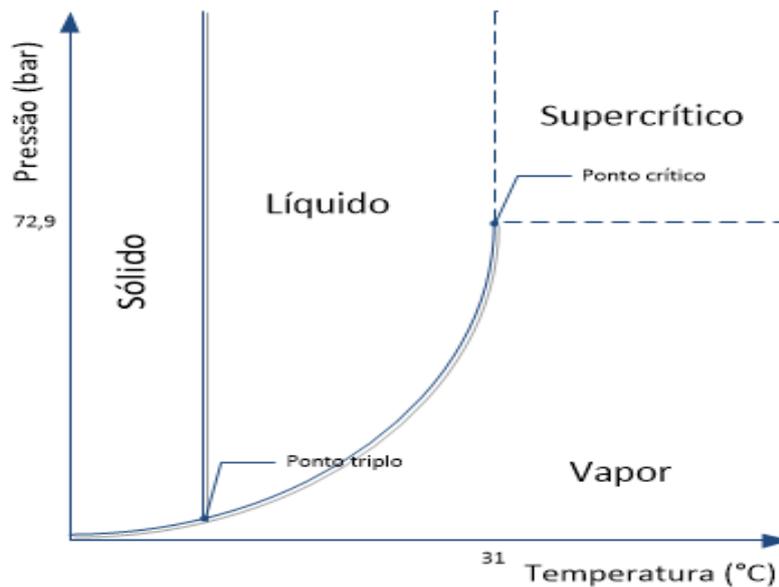
extração, o solvente percorre o leito fixo de partículas sólidas e dissolve os compostos de interesse presentes na matéria prima. A matriz sólida absorve o solvente supercrítico e em paralelo os compostos a serem extraídos são dissolvidos no solvente. Estes compostos dissolvidos são transportados para a superfície do sólido através do mecanismo de difusão (CASSEL; VARGAS; BRUN, 2008a).

Na interface sólido-fluido se processa a transferência dos compostos extraídos para fase fluida. Esta transferência é regulada pelo equilíbrio de fases sólido-fluido. Os princípios ativos dissolvidos no fluido supercrítico seguem em direção à etapa de expansão, momento no qual ocorre a precipitação do soluto, devido à passagem do solvente do estado supercrítico para o estado gasoso. A facilidade na qual ocorre a separação solvente-soluto é um dos motivos para o destaque da extração supercrítica nos setores alimentício e farmacêutico (CASSEL; VARGAS; BRUN, 2008b).

O dióxido de carbono (CO_2) é o solvente mais comumente empregado por ser considerado atóxico, inerte, seguro e acessível. Outras vantagens da utilização de dióxido de carbono em condições supercríticas (Figura 8) são seletividade e solubilidade (AZEVEDO et al., 2008; BRENNECKE; ECKERT, 1989; CARDOZO et al., 2007; CASSEL; VARGAS; BRUN, 2008a).

Especificamente para o caso de extratos oriundos de matéria-prima vegetal, este processo se torna importante porque opera a baixas temperaturas, devido à baixa temperatura crítica do CO_2 , evitando a degradação térmica dos compostos obtidos. Vários estudos apontam que os extratos obtidos com dióxido de carbono em condições supercríticas apresentam características diferenciadas quando comparados à obtenção dos mesmos por vias tradicionais, tal como a extração com uso de solventes orgânicos a baixa pressão.

Figura 8 – Diagrama de fase do dióxido de carbono



O CO₂ possui capacidade limitada em dissolver compostos polares a altas pressões, o que é o caso das saponinas, e o uso do cossolvente, geralmente água ou etanol, é justificado pelo aumento do poder de solvência e solubilidade do processo de extração supercrítica (ALMEIDA et al., 2013; BITENCOURT et al., 2014; DOMINGUES et al., 2012).

2.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Trabalhos experimentais são de extrema importância na compreensão do funcionamento de sistemas e processos. A validade das conclusões que é delineada a partir de um experimento depende profundamente da forma como a experiência foi conduzida. Desta forma, o planejamento experimental desempenha um papel fundamental na solução final para o problema que inicialmente motivou o experimento.

O planejamento fatorial de experimentos é uma ferramenta que se destaca pela avaliação do efeito das interações de fatores, variando os níveis de um conjunto de fatores simultaneamente. A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas, úteis para a modelagem e avaliação da influência de várias

variáveis sobre uma ou mais respostas e tendo como principal objetivo a otimização da resposta.

Na maior parte dos problemas de metodologia de superfície de resposta, a forma da relação entre a resposta e as variáveis independentes é desconhecida. Normalmente, polinômios de ordens inferiores são empregados. Se a resposta for bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, a função de aproximação é o modelo de primeira ordem. Porém se houver uma curvatura no sistema, um polinômio de grau mais elevado, tal como o modelo de segunda ordem é necessário para descrever as respostas (MONTGOMERY; RUNGER, 2010).

Obviamente, é improvável que modelos polinomiais venham a ser aproximações razoáveis da verdadeira relação física ao longo de todo o espaço das variáveis independentes, entretanto, eles normalmente funcionam muito bem para regiões relativamente pequenas. O objetivo principal do método é levar o experimentador de modo rápido à zona de idealidade.

A relação entre as variáveis e a resposta é modelada ajustando-se os resultados experimentais através de modelos polinomiais com o auxílio do método dos mínimos quadrados para a estimação dos parâmetros. Na MSR as respostas geralmente são representadas em gráficos de superfície em espaços tridimensionais. Para facilitar a visualização do formato da resposta de superfície e como ela é afetada em determinados níveis das variáveis em estudo, gráficos de contorno da resposta de superfície são frequentemente utilizados (MONTGOMERY; RUNGER, 2010; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

O delineamento experimental tem sido uma poderosa ferramenta na triagem e otimização de variáveis que afetam a extração de compostos bioativos, tornando-se obrigatório, a fim de alcançar maiores rendimentos e prever resultados (DOMINGUES et al., 2013; LI et al., 2010; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). A metodologia de superfície de resposta tem sido adotada em estudos recentes, para a otimização de extrações assistidas por ultrassom que visam a obtenção de compostos bioativos (MINJARES-FUENTES et al., 2014; WANG et al., 2008), como também para a otimização da extração de compostos como ácidos triterpênicos por fluido supercrítico (DOMINGUES et al., 2013; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

2.7. MODELAGEM MATEMÁTICA

Modelos matemáticos confiáveis são úteis para processos de *scale up* e necessários para determinar condições ótimas de operação. Não há um modelo genérico que possa ser aplicado a qualquer fenômeno de transferência de massa, uma vez que fatores como tipo de produto, matéria prima, solvente e geometria do vaso extrator podem influenciar a curva de extração. Desta forma, diversos modelos com diferentes abordagens têm sido desenvolvidos e empregados na descrição de processos de extrativos.

Os modelos podem ser construídos a partir de hipóteses que buscam representar o fenômeno real associado ao processo extrativo. A inclusão detalhada dos mecanismos da extração faz com que os modelos representem de modo mais satisfatório o fenômeno. Entretanto, isso pode acarretar em um aumento desnecessário da complexidade do modelo, dificultando a sua solução matemática, tornando-o pouco atraente para uso em processos industriais, onde respostas rápidas e de fácil obtenção são favorecidas, mesmo apresentando certo grau de imprecisão (GASPAR et al., 2003).

Será apresentada a seguir uma breve revisão abordando alguns dos diferentes modelos mais aplicados a técnicas baseadas em campo elétrico, aplicação de ultrassons e extrações supercríticas.

Não é incomum encontrar modelos empíricos, que muitas vezes são pouco mais que uma interpolação de dados experimentais, sendo utilizados para correlacionar os efeitos da aplicação de campo elétrico em processos difusivos. Kusnadi e Sastry (2012) correlacionaram o coeficiente de difusividade efetivo de sal em diferentes vegetais, calculado através da equação da segunda lei de Fick, à mobilidade iônica com intensidades de campos e temperatura através da regressão de um polinômio linear (SARANG; SASTRY, 2007).

Os modelos difusivos deduzidos a partir da segunda lei de Fick são bastante empregados para modelar o fenômeno de transporte de massa (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015).

Modelos de lei de potência, notavelmente usados para descrever extrações sólido-líquido, também são frequentemente usados para modelar a extração de compostos intracelulares (LUENGO et al., 2016; SEGOVIA et al., 2015; VOROBIEV; LEBOVKA, 2006). Estes modelos são característicos por apresentar um único parâmetro ajustável que leva em consideração o coeficiente de difusão do composto de interesse, a área de superfície total, o volume de solvente e a geometria das partículas sólidas. O modelo é bastante simples, porém limitado a condições específicas de um processo. As equações utilizadas não apresentam um forte vínculo com o fenômeno físico propriamente dito, mas servem para representar de forma aproximada os processos de extração.

Quanto às extrações assistidas por ultrassom poucos estudos foram feitos com foco na descrição teórica da cinética de extração. Apesar disso, a maioria dos estudos atribui os efeitos positivos de ultrassons sobre a cinética de extração a um aumento na taxa de difusão (KOTOVICZ; WYPYCH; ZANOELO, 2014). Modelos de lei de potência também são comumente usados para descrever os dados experimentais para este tipo de extração (GOULA, 2013; NARVÁEZ-FLORES et al., 2015; TAO; ZHANG; SUN, 2014).

Veličković *et al.*, (2006) investigaram o uso de modelos cinéticos clássicos empregados na extração de compostos bioativos como modelos de difusão não estacionária em materiais vegetais, teoria de filme e a equação empírica de Ponomaryov aplicados a extrações assistidas por ultrassom.

O processo de transferência de massa associado ao estudo em leito fixo de extração supercrítica pode ser modelado por equações diferenciais vinculadas ao balanço material realizado na fase solvente e outro na fase sólida que constitui este leito. Este tipo de procedimento de cálculo é usado por vários pesquisadores e Sovová (2005) apresenta uma extensa revisão sobre sua aplicação a produtos naturais mostrando que os trabalhos publicados diferem na descrição de equilíbrio de fases, padrão de fluxo e difusão de soluto na fase sólida.

A abordagem, com base em balanço diferencial de massa ao longo do leito de extração, requer mecanismos de transferência de massa e uma relação de equilíbrio. Para esse modelo, parâmetros ajustáveis derivados a partir de dados experimentais são necessários (MARRONE et al., 1998; VARGAS et al., 2006).

Um dos primeiros modelos a considerar o balanço diferencial para as fases envolvidas na extração supercrítica aplicado para obtenção de óleos essenciais foi proposto por (SOVOVÁ, 1994). A autora propõe que a matriz a ser extraída pode ser representada como um sistema composto de células rompidas, originadas do processo de moagem, e células intactas. A partir destas considerações, o modelo é separado em estágios diferentes dependendo de qual das resistências à transferência de massa considerada esteja controlando o processo de extração. A primeira etapa do modelo está relacionada à transferência de massa do soluto de fácil acesso, ou seja, o soluto proveniente das células rompidas. Uma vez esgotado o soluto de fácil acesso, inicia-se a fase lenta da extração, onde o óleo essencial localizado no interior da partícula começa a ser extraído ao longo de todo leito. Nesta etapa, a resistência à transferência de massa apresentada é superior, quando comparada a da primeira. Entre as duas etapas mencionadas existe um período onde tanto o soluto de fácil acesso como o de difícil acesso, está sendo extraído dependendo da região do leito considerada. A mesma autora apresentou posteriormente um modelo simplificado onde no primeiro período a concentração de equilíbrio com a fase fluida corresponde à solubilidade do soluto puro no solvente e esta concentração é menor no segundo período, quando o soluto de fácil acesso já foi esgotado, cada etapa é então representada por uma linha reta (SOVOVÁ et al., 2007).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os equipamentos utilizados para a extração de saponinas dos frutos imaturos de erva mate através das técnicas de campo elétrico moderado, ultrassom e fluido supercrítico. Em um primeiro momento são apresentados testes preliminares, usados para avaliar a viabilidade das técnicas para a extração de saponinas. As condições experimentais associadas ao planejamento de experimentos também são apresentadas assim como os modelos matemáticos que foram empregados para representar a cinética dos diferentes métodos de extração investigados. As metodologias de identificação e quantificação das saponinas nos extratos obtidos também está descrita neste item, assim como a técnica de concentração de saponinas nos extratos.

3.1. AQUISIÇÃO DOS FRUTOS

Os frutos verdes de erva mate colhidos, em janeiro de 2015, foram fornecidos pela Ervateira Baldo (Encantado, RS) *in natura*. Após o recebimento, os frutos foram congelados com N₂ líquido e armazenados a -40 °C para posterior processo de liofilização (Terroni LS, Brasil).

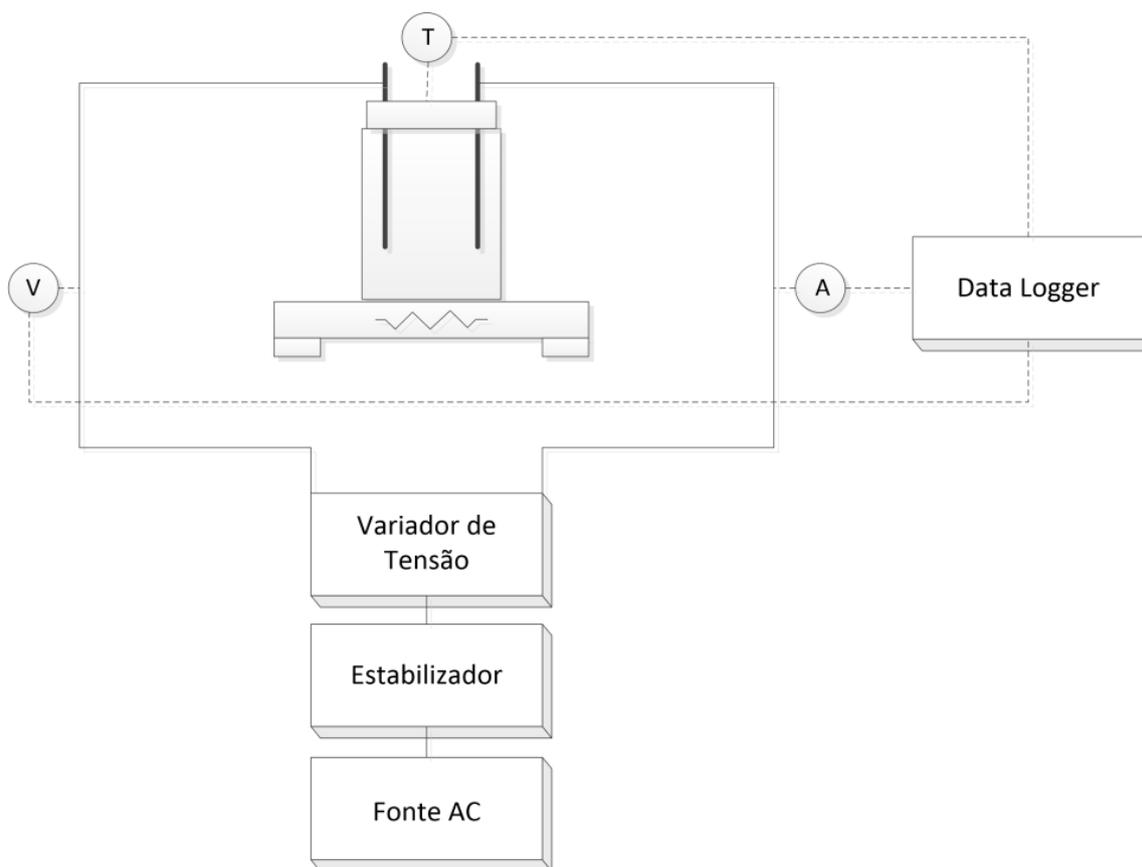
3.2. EQUIPAMENTOS

3.2.1. EXTRAÇÕES ASSISTIDAS POR CAMPO ELÉTRICO MODERADO

O equipamento utilizado para as extrações assistidas por campo elétrico moderado é composto por um sistema de fornecimento de energia, um sistema de aquisição de dados e uma célula ôhmica. Um diagrama esquemático do equipamento usado está apresentado na Figura 9.

O sistema de fornecimento de energia consiste em um estabilizador (Forceline, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil), um variador de tensão, que pode ser ajustado em tensões entre 0 e 220 V (Sociedade Técnica Paulista LTDA, modelo Varivolt, Brasil) e um disjuntor (Siemens, Brasil). O estabilizador foi conectado à rede local, utilizando corrente alternada com frequência de 60 Hz. O sistema de aquisição de dados é responsável pelo monitoramento e registro de dados relativos à corrente elétrica, tensão e temperatura em função do tempo (Novus, modelo Field logger, Brasil). O monitoramento da temperatura foi feito por um medidor de temperatura tipo Pt-100 (Novus, Brasil), previamente calibrado, com haste de aço inoxidável revestida com uma liga de níquel-fósforo a fim de evitar reações de corrosão. Para o monitoramento da tensão foi utilizado um transdutor de tensão CA (Yokogawa, modelo 2374A-T13-VRX/AN, Taiwan) e a corrente elétrica foi monitorada através de um transdutor de corrente CA (Yokogawa, modelo 2374A-T13-ALS/NA, Taiwan).

Figura 9 – Diagrama esquemático do sistema de campo elétrico moderado



A célula ôhmica, ou célula de extração, consiste em um recipiente de vidro de 100 mL encamisado conectado a um banho de resfriamento (Lauda RM12, Alemanha). Foram utilizados eletrodos de platina (3,5 x 3,5 cm), tipo placas paralelas, distantes 4 cm. As intensidades de campo foram definidas a partir da intensidade máxima alcançada pelo equipamento.

3.2.2. EXTRAÇÕES ASSISTIDAS POR ULTRASSOM

Para extração assistida por ultrassom, um equipamento do tipo sonda VC7 750 (Sonics, USA) de 750 W de potência e 20 kHz de frequência foi utilizado. A sonda de titânio com diâmetro de 13 mm e comprimento de 135 mm, submersa 2,5 cm, é usada para transmitir ondas de ultrassom para a amostra que se encontra em contato com o solvente. Para evitar o

aquecimento gerado pelo processo de sonicação, uma célula encamisada conectada a um banho de resfriamento (Lauda RM8, Alemanha) é usada. Uma foto do equipamento utilizado, com destaque para a célula de extração pode ser observada na Figura 10.

Figura 10 – Equipamento de ultrassom tipo sonda



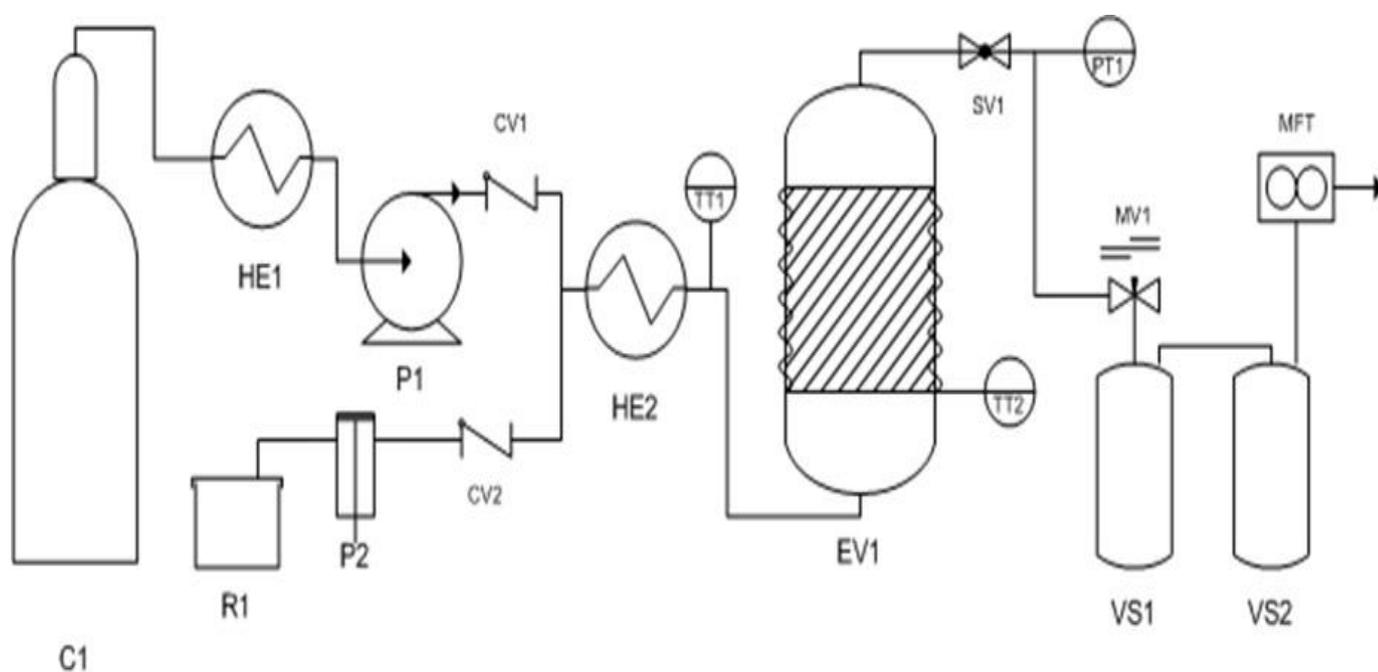
3.2.3. EXTRAÇÕES POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Os experimentos de extração supercrítica foram realizados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da Pontifícia universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) em uma unidade piloto automatizada. Um diagrama esquemático do equipamento é mostrado na Figura 11.

A unidade experimental inclui uma bomba de alta pressão (P1) (Maximator G35–CO₂) para transporte do solvente, um vaso de extração de 100 mL (EV1) e vasos separadores (VS1 e VS2). O vaso de extração é revestido por uma jaqueta de aquecimento e possui controlador de temperatura. O cossolvente é alimentado no sistema por uma bomba de alta pressão (P2) (ISCO 260-D) em um vaso de mistura antes do pré-aquecedor (HE2), onde ocorre a homogeneização com o CO₂. Fitas de aquecimento foram usadas nas tubulações para manter uma temperatura constante na seção de extração. As taxas de fluxo do solvente foram medidas usando um medidor de vazão em massa tipo coriolis (MFT) (Sitraus FC mass flow

6000 – Siemens). Válvulas micrométricas foram utilizadas para o controle de fluxo ao longo do aparelho. Fitas de aquecimento com controle automático de temperatura também foram usadas em torno dessas válvulas para evitar o congelamento do solvente devido ao efeito Joule-Thompson do CO₂ e consequente precipitação do soluto sólido na etapa de depressurização. A pressão no extrator foi monitorada com um sistema transdutor digital (PT1) ((Novus 8800021600) Novus Produtos Eletrônicos (Brasil)), com uma precisão de $\pm 1,0$ bar e o controlador de temperatura foi conectado a termopares (TT2) (PT-100, com uma precisão de 0,5 K). O vaso separador foi mantido a temperatura ambiente.

Figura 11 – Diagrama esquemático dos equipamentos do processo de extração com fluido supercrítico



Fonte: Brun, 2012

3.3. ENSAIOS PRELIMINARES

Inicialmente, buscou-se avaliar a influência dos principais efeitos de cada uma das técnicas relatadas no presente estudo (intensidade de campo para o campo elétrico moderado, intensidade de ultrassom e pressão para a extração supercrítica). Variáveis comuns aos

tratamentos como temperatura, massa de frutos e tempo de extração foram fixadas em 40 °C, 10 g do fruto liofilizado e 1 h de extração, respectivamente, de forma que fosse possível avaliar o uso das técnicas para a obtenção de extratos ricos em saponina.

Campo elétrico moderado

As intensidades de campo foram definidas a partir da tensão máxima alcançada pelo equipamento (200 V). Desta forma, campos de 50 V cm⁻¹, 37,5 V cm⁻¹ e 25 V cm⁻¹ foram escolhidos para serem investigados no presente estudo. Estes valores são obtidos dividindo-se a tensão aplicada pela distância ente os eletrodos. Testes preliminares demonstraram que a modificação estrutural ocorre totalmente nos minutos iniciais de extração, não se justificando o uso da tecnologia por longos períodos de tempo, desta forma, o tempo de tratamento foi fixado em 15 min. Como solvente foi utilizada uma solução hidroalcoólica a 30% na proporção de 1:10 (sólido:solvente) (ATHAYDE; SCHENKEL, 2000).

Amostras de 10 g do fruto liofilizado foram adicionadas à célula de extração juntamente à solução hidroalcoólica. A célula foi conectada a um banho de resfriamento, previamente mantido à temperatura de 10 °C, de forma que a temperatura dos experimentos não ultrapassasse 40 °C com a aplicação dos campos elétricos. Em seguida inicia-se a etapa de pré-tratamento com a passagem de corrente elétrica, utilizando tensões de 200V, 150V e 100V, que correspondem aos campos de 50 V cm⁻¹, 37,5 V cm⁻¹ e 25 V cm⁻¹. Após 15 minutos, a passagem de corrente elétrica foi cessada e inicia-se a fase difusiva do processo, que nada mais é que uma extração sólido-líquido sob agitação e aquecimento. O objetivo da aplicação de campos elétricos é a formação de poros nas membranas celulares dos frutos, de forma que estes facilitem a extração das saponinas por parte do solvente.

Ultrassom

Para os experimentos utilizando ultrassom como pré-tratamento, a mesma célula de tratamento utilizada para o campo elétrico foi empregada. Amostras de 10 g do fruto liofilizado foram adicionadas à célula de extração juntamente com 100 mL de uma solução hidroalcoólica a 30%. O banho de resfriamento foi mantido à temperatura adequada para cada condição experimental, de forma que a temperatura do experimento não ultrapassasse os 40 °C. A amplitude do ultrassom foi variada em 100%, 75% e 50%, correspondendo a

intensidade de ultrassom de 565, 423 e 282 W cm⁻². As amostras foram sonicadas por 15 min e após esse período, procedeu-se a etapa difusiva de forma análoga ao campo elétrico.

O objetivo da aplicação de ultrassom é a disruptura mecânica da paredes celulares dos frutos, aumentando assim a superfície de contato e facilitando o acesso do solvente às saponinas.

Difusão

Sendo o campo elétrico moderado e ultrassom técnicas que visam alterar a configuração estrutural das células, através de eletropermeabilização e disruptura, respectivamente, seus efeitos podem ser observados nos momentos iniciais de extração e prolongar o tempo de aplicação dos tratamentos não resulta em uma aumento de rendimento. Desta forma, testes preliminares foram realizados para identificar o tempo necessário para o processo de extração alcançar o equilíbrio, que para estes casos é caracterizado como a saturação do solvente usado na extração. Assim, após os tratamentos não convencionais (campo elétrico moderado e ultrassom), a suspensão de frutos da erva mate foi mantida na célula de extração por mais 45 min a 40 °C sob agitação constante para que o solvente fosse capaz de penetrar nas células e solubilizar os compostos de interesse. Esta etapa foi chamada de fase difusiva.

Controle

A fim de se avaliar os efeitos não térmicos durante os tratamentos por campo elétrico moderado e ultrassom, extrações controle foram realizadas nas mesmas condições de temperatura, agitação e proporção sólido:solvente durante 1 h. Amostras de 10 g dos frutos foram extraídas com a mesma solução hidro etanólica a 30% a 40 °C sob agitação mecânica constante.

Extração por fluido supercrítico

Como solvente foi utilizado dióxido de carbono (99,9% de pureza – Air Products) a vazão de 2,22 10⁻⁴ kg s⁻¹. As extrações foram conduzidas utilizando uma mistura de etanol 96% em proporção de 30% em massa ao CO₂ supercrítico, a fim de promover a extração de compostos mais polares (DOMINGUES et al., 2013). O CO₂ possui capacidade limitada em

dissolver compostos polares e o uso do cossolvente é justificado pelo aumento do poder de solvência e solubilidade do processo de extração supercrítica (ALMEIDA et al., 2013). A temperatura de operação foi mantida a 40°C durante o processo extrativo e três condições distintas de pressão investigadas: 10 MPa, 20 MPa e 30 MPa. Os valores de pressão escolhidos são devidos às limitações operacionais da unidade de extração.

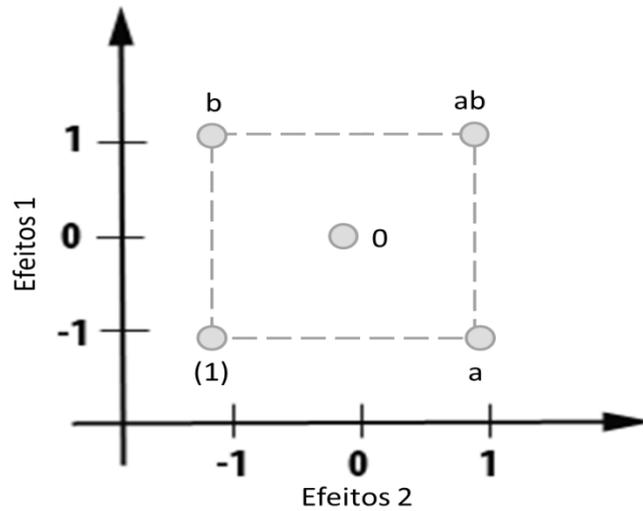
Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e seus resultados apresentados como a média dos valores mais ou menos o desvio padrão. Para a comparação das médias os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste Tukey ($p < 0,05$), usando o software Statistica® 10 (StatSoft, Inc., 2011).

3.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento fatorial é frequentemente usado em experimentos que envolvem vários fatores onde é necessário estudar o efeito conjunto dos fatores sobre uma resposta. Assim, o método estatístico fatorial 2^2 com repetição no ponto central foi aplicado aos resultados a fim de obter a tendência para melhor condição de processo, a Figura 12 apresenta o esquema genérico de um planejamento experimental 2^2 com ponto central (MONTGOMERY; RUNGER, 2010).

Figura 12 – Planejamento fatorial 2² com ponto central



Os símbolos (1),a,b,ab e 0 representam os resultados obtidos nesses pontos do planejamento. Os efeitos de interesse nos planejamentos fatoriais feitos para cada uma das técnicas de extração estão discriminados na Tabela 2.

Tabela 2 – Efeitos dos planejamentos fatoriais

| Tratamento | Efeito 1 | Efeito 2 | Interação |
|------------|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| CEM | Campo (x_{1C}) | Temperatura (x_2) | ($x_{1C}x_2$) |
| US | Intensidade de ultrassom (x_{1P}) | Temperatura (x_2) | ($x_{1P}x_2$) |
| EFS | Vazão (x_{1V}) | Temperatura (x_2) | ($x_{1V}x_2$) |

Para estimar os efeitos 1, a fim de realizar o método estatístico fatorial 2² com ponto central, foi realizada a média dos resultados do lado direito do quadrado da Figura 14 e subtraído desse valor a média das observações do lado esquerdo do quadrado, como mostra a Equação 3.2 :

$$Efeitos\ 1 = \frac{a + ab}{2} - \frac{b + (1)}{2} \tag{3.2}$$

De maneira análoga, os efeitos 2 são encontrados fazendo a média das observações no topo do quadrado e subtraindo com a média das observações na parte inferior do quadrado, representado na Equação 3.3 :

$$\text{Efeitos 2} = \frac{b + ab}{2} - \frac{a + (1)}{2} \quad (3.3)$$

Por fim, a interação é estimada tomando a diferença das médias das diagonais do quadrado da Figura 14, apresentado na Equação 3.4 :

$$\text{Interação} = \frac{ab + (1)}{2} - \frac{a + b}{2} \quad (3.4)$$

Com os resultados da análise estatística fatorial 2^2 com ponto central foi realizada uma análise de regressão com o objetivo de examinar um modelo matemático para prever respostas. O modelo genérico está representado na Equação 3.5:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 \quad (3.5)$$

As variáveis codificadas x_1 e x_2 representam os efeitos 1 e 2, respectivamente. Os níveis considerados nos experimentos como baixo e alto são valores denotados por -1 e +1 respectivamente, e 0 representa o ponto central. O termo do produto cruzado $x_1 x_2$ representa o efeito da interação entre essas variáveis. O termo independente β_0 é obtido através da média global das observações realizadas. O coeficiente β_1 é a metade da estimativa dos efeitos 1, tendo em vista que os coeficientes da regressão medem o efeito de uma variação unitária em x_1 , e a estimativa do efeito está baseado na variação de duas unidades, de -1 a +1. De maneira análoga, o coeficiente β_2 é a metade dos efeitos 2, e o valor do coeficiente β_{12} é a metade do efeito da interação. O coeficiente β_{jj} corresponde ao erro quadrático puro e é definido como a diferença entre a média das observações em todos os níveis (\bar{y}_f) menos a média das observações no ponto central (\bar{y}_n).

A fim de determinar se os efeitos principais e de interação são significativos, uma análise de variância (ANOVA) deve ser realizada. A Tabela 3 apresenta um sumário de como esta análise foi calculada. A soma dos quadrados dos efeitos principais e de interação é calculada utilizando as equações 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9 respectivamente.

$$SQ_{efeitos1} = \frac{(b + ab - (1) - a)^2}{4n_r} \quad (3.6)$$

$$SQ_{efeitos2} = \frac{(a + ab - (1) - b)^2}{4n_r} \quad (3.7)$$

$$SQ_{int} = \frac{(ab + (1) - b - a)^2}{4n_r} \quad (3.8)$$

$$SQ_{curvatura} = \frac{n_f n_c (\bar{y}_f - \bar{y}_c)^2}{n_f - n_c} \quad (3.9)$$

Tabela 3 – Análise da variância

| Fontes de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios (QM) | F _{cal} | F _{tab} |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| Efeitos 1 | $SQ_{efeitos1}$ | $k - 1$ | $\frac{SQ_{efeitos1}}{k - 1}$ | $\frac{QM_{efeitos1}}{QM_{Res}}$ | 18,51 |
| Efeitos 2 | $SQ_{efeitos2}$ | $k - 1$ | $\frac{SQ_{efeitos2}}{k - 1}$ | $\frac{QM_{efeitos1}}{QM_{Res}}$ | 18,51 |
| Interação | SQ_{int} | $k - 1$ | $\frac{SQ_{int}}{k - 1}$ | $\frac{QM_{int}}{QM_{Res}}$ | 18,51 |
| Curvatura | $SQ_{curvatura}$ | $k - 1$ | $\frac{SQ_{curvatura}}{k - 1}$ | $\frac{QM_{curvatura}}{QM_{Res}}$ | 18,51 |
| Resíduo | SQ_{Res} | $n_c - 1$ | $\frac{SQ_{res}}{n_c - 1}$ | - | |
| Total | SQ_{Tot} | $kn_r - 1$ | - | - | |

Onde n_r é número de repetições, k é níveis dos fatores e F_{tab} com 95% de confiança.

A soma dos quadrados totais e residuais são obtidas utilizando as equações 3.10 e 3.11 respectivamente, sendo: y o resultado obtido no experimento e n , o número de experimentos realizados.

$$SQ_{Tot} = \sum_{ij} y_{ij}^2 - n\bar{y}^2 \quad (3.10)$$

$$SQ_{Res} = SQ_{Tot} - SQ_{efeitos1} - SQ_{efeitos2} - SQ_{Int} - SQ_{curvatura} \quad (3.11)$$

A determinação da qualidade do ajustamento da reta de regressão com os dados experimentais é calculada utilizando a Equação 3.12.

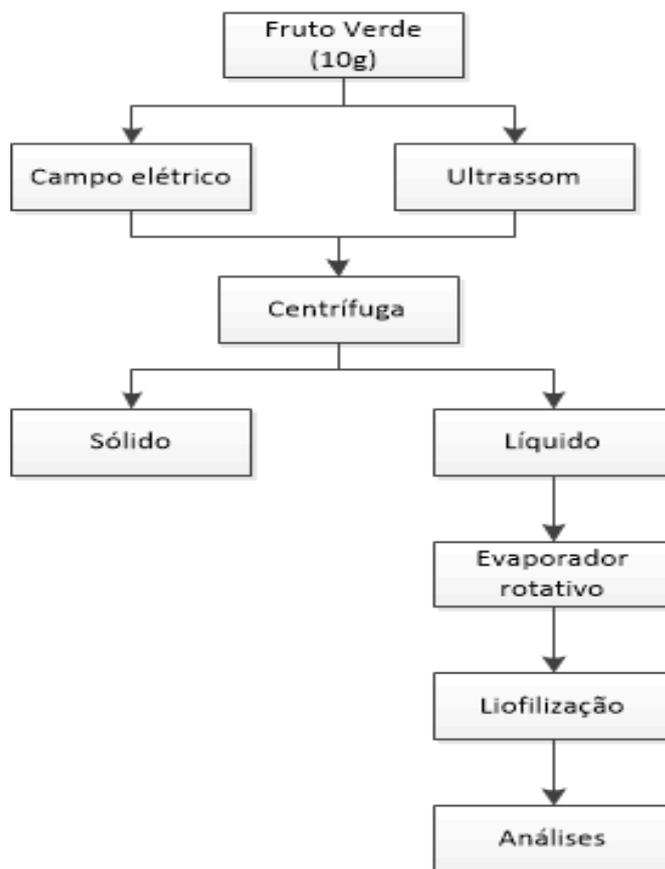
$$R^2 \% = \left(\frac{SQ_{efeitos1} + SQ_{efeitos2} + SQ_{Int} + SQ_{curvatura}}{SQ_{Tot}} \right) \times 100 \quad (3.12)$$

3.5. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

Um dos desafios de se trabalhar com saponinas está na secagem dos extratos aquosos. Devido à ampla formação de espuma sob agitação e vácuo, apenas o secador rotativo não é eficiente para evaporar todo solvente. Para contornar este problema, os extratos foram, inicialmente, centrifugados (Sigma 2-16KL) por 20 min a 11000 rpm. Então, apenas o sobrenadante foi concentrado em secador rotativo para eliminar o etanol (observando-se o volume de etanol recuperado e o início da formação de espuma) da amostra a 45 °C. A amostra concentrada pôde então ser liofilizada e sua massa seca quantificada. A Figura 13 apresenta um fluxograma deste processo de secagem de solvente.

Os extratos obtidos por extração com CO₂ supercrítico foram secos apenas em secador rotativo e o etanol recuperado. Após a etapa de secagem, procedeu-se a quantificação de saponinas totais nos extratos brutos.

Figura 13 – Fluxograma de preparação de amostras em solução aquosa



3.6. ENRIQUECIMENTO DA FRAÇÃO SAPONOSÍDICA

A fim de obter-se um extrato mais rico em saponinas e com menos compostos interferentes para realizar a identificação das saponinas presentes nos extratos através da técnica de cromatografia em camada delgada, cerca de 20 mg dos extratos brutos liofilizados de maior rendimento em saponinas obtidos por campo elétrico moderado e ultrassom e por fluido supercrítico foram submetidos a partições líquido-líquido. Os extratos secos foram redissolvidos em 20 mL de água Milli-Q e fracionados em funil de separação inicialmente com 25 mL de clorofórmio (CHCl₃). A fração clorofórmica, rica em lipídeos, foi então descartada e o resíduo aquoso submetido a um novo fracionamento com 25 mL de n-butanol. O resíduo aquoso desta segunda etapa foi descartado e a fração butanólica seca em

evaporador rotativo de modo a se obter um extrato branco, rico em saponinas e triterpenos (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2003).

3.7. ANÁLISES DE SAPONINAS

Entre os métodos de análises qualitativos e quantitativos aplicados às saponinas, métodos por HPLC (*high performance liquid chromatography*) tem grande destaque devido à rapidez de análise, sensibilidade e adaptabilidade a compostos polares não-voláteis. Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura a respeito do uso de HPLC para a quantificação de saponinas em folhas e frutos da erva mate (BORRE et al., 2010; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; PEIXOTO et al., 2012).

Por outro lado, o uso de detectores UV/VIS fica limitado a 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 apenas a detecção não específica entre 200 e 210 nm. Desta forma, técnicas de análises alternativas como cromatografia por camada delgada e análises espectrofotométricas são opções mais rápidas e simples que geram boas referências para novos planejamentos experimentais.

3.7.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A separação e quantificação cromatográfica das saponinas é ainda um desafio, devido ao fato das saponinas ocorrerem como uma mistura multicomponente 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.

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação de compostos de uma mistura através da migração sobre uma camada de adsorvente, chamada de fase

estacionária. O adsorvente mais utilizado é a sílica gel. Esta migração se dá por capilaridade com ajuda de um solvente, denominado fase móvel (LUCAS, 2015).

A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel Alugram® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) de 20 cm x 20 cm, usando como fase móvel CHCl₃:EtOH:H₂O a proporção de 20:10:0,5 (v/v/v) em cuba pré-saturada com o sistema eluente. As placas são visualizadas em lanterna de luz UV (Boiton) com comprimento de onda de 264 e 365 nm, saponinas não apresentam absorvância em comprimentos de onda superiores a 220 nm, então as manchas visualizadas são descartadas. Após a visualização na luz são reveladas com uma solução de anisaldeído sulfúrico (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA; KOWALSKA, 2008) e aquecidas até aproximadamente 105°C. Todos os reagentes utilizados são da marca Merck. A Figura 14 mostra um esquema básico de desenvolvimento de uma CCD.

Cromatografias em camada delgada com padrões dos compostos ilexosídeo II, Ziyu-glicosídeo, matesídeo e ácido 23-hidroxiursólico, apresentados anteriormente na Figura 4, foram realizadas e seus fatores de retenção (R_f) calculados segundo a Equação 3.1.

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pelo composto}}{\text{Distância percorrida pelo solvente}} \quad (3.1)$$

Seus valores, assim como colorações observadas após a revelação com anisaldeído estão apresentados na Tabela 4. Os valores de R_f foram então comparados com os fatores de retenção dos compostos identificados nos extratos obtidos por campo elétrico, ultrassom e fluido supercrítico.

Figura 14 – Esquema ilustrativo do desenvolvimento da cromatografia em camada delgada simulando a separação dos compostos

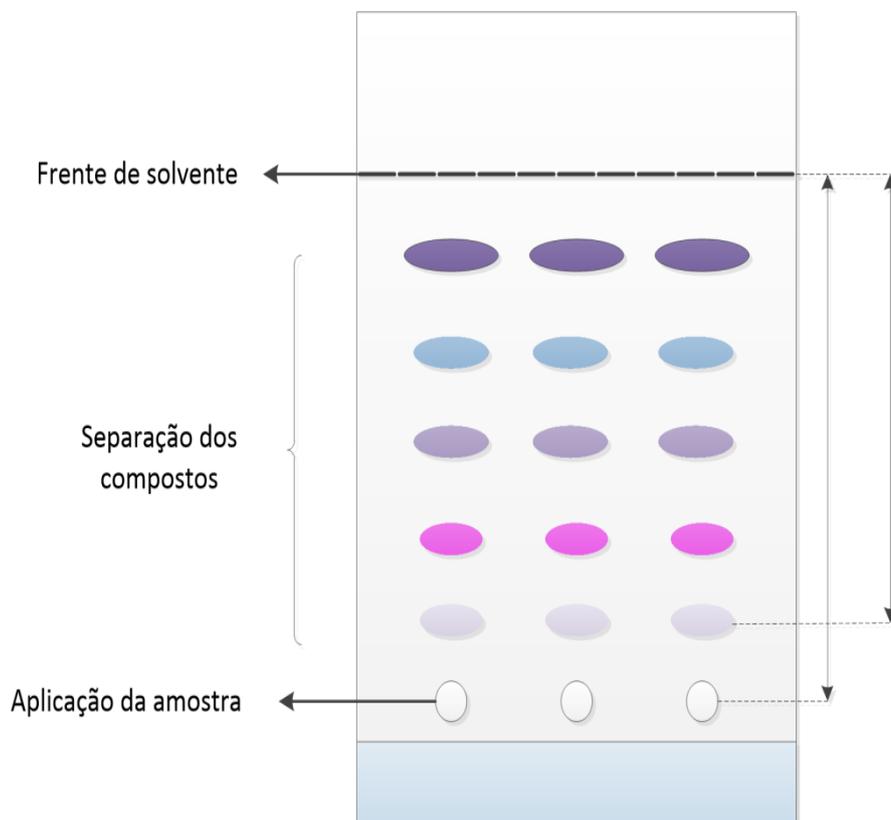


Tabela 4 – Fatores de retenção dos padrões de saponinas e sapogenina

| Saponina | R_f | Coloração |
|------------------------|-------|-----------|
| Ilexosídeo II | 0,215 | Rosa |
| Ziyu | 0,630 | Rosa |
| Matesídeo | 0,810 | Azul |
| Ác. 23-hidroxiursólico | 0,935 | Púrpura |

3.7.2. ANÁLISE DE SAPONINAS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA

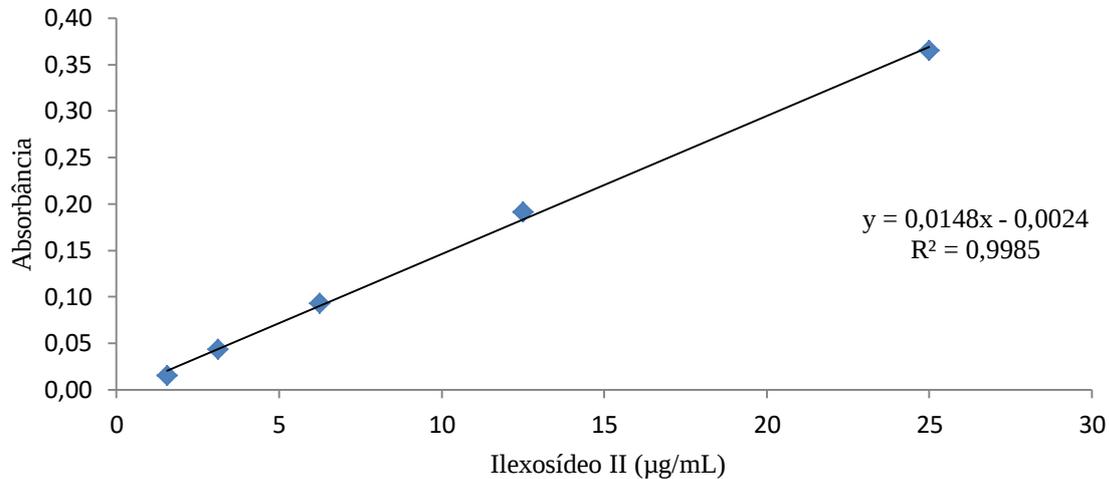
O motivo pelo qual métodos espectrofotométricos se popularizaram na quantificação de saponinas proveniente de matéria vegetal é devido ao fato de serem simples, rápidos e baratos. O método de quantificação de saponinas totais, também conhecido como ensaio de

vanilina sulfúrica é a técnica mais comumente escolhida. O princípio baseia-se na reação de oxidação de triterpenos com vanilina. Ácido sulfúrico é utilizado como oxidante e uma coloração púrpura resulta desta reação e o teor de saponinas totais é expresso em equivalente de um composto padrão (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014).

As análises de saponinas totais dos extratos dos frutos de erva mate foram realizadas através do método descrito por Dini (2009) com algumas modificações. Os extratos foram dissolvidos em uma solução de metanol a 80% e a uma alíquota de 1 mL desta solução foram adicionados 1 mL de uma solução etanólica de vanilina 8% e 8 mL de H₂SO₄ 72%. A mistura dos reagentes foi realizada em banho de gelo e, logo após, aquecida a 70°C por 30 min. Foi realizada uma varredura de espectro de 350 a 700 nm. O comprimento de onda que apresentou os valores máximos de absorbância, 540 nm, foi escolhido para aferição das absorbâncias. Para a leitura, foi utilizado um espectrofotômetro (Gehaka, modelo UV-330G). Antes das análises, o equipamento foi deixado estabilizar e zerado com um branco preparado da mesma forma descrita anteriormente, porém sem a amostra de extrato.

A curva de calibração foi construída usando como padrão a saponina isolada dos frutos verdes de erva mate, Ilexosídeo II, que foi gentilmente cedido pela professora Grace Gossman da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A concentração da curva variou de 1,56 a 25 µg mL⁻¹. A curva foi feita em duplicata e suas médias apresentadas nas Figuras 15, os desvios de cada ponto foram menores que 0,001. Os resultados foram expressos em micrograma de equivalente de ilexosídeo II por miligrama de extrato de fruto seco. O uso do Ilexosídeo II como padrão de saponina é justificado pelos relatos na literatura que o apontam como saponina majoritária nos frutos (BORRE et al., 2010; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; PEIXOTO et al., 2012).

Figura 15 – Curva de calibração de Ilexosídeo II



3.8. MODELAGEM MATEMÁTICA

Dois modelos cinéticos de diferentes ordens (DAGOSTIN; CARPINÉ; CORAZZA, 2015) e um modelo difusivo para soluções em volume limitado (CRANK, 1975) foram utilizados para modelar as extrações por campo elétrico moderado e ultrassom. Tais modelos são consistentes com as características da extração sólido-líquido, onde o soluto é removido do material sólido, depositado em um banho, para a fase fluida deste banho que se encontra confinado em um tanque de armazenagem.

O processo de extração supercrítica é comumente caracterizado pela curva de extração que consiste no plote do acúmulo do extrato (massa extraída/massa de fruto seco) *versus* o tempo de extração. Para a modelagem matemática e obtenção dos parâmetros do fenômeno foi utilizado um modelo clássico, proposto por Sovová (1994), baseado na disponibilidade do soluto. Tal operação de extração consiste na passagem contínua de solvente supercrítico através de um leito, constituído do material sólido, remetendo, portanto à ideia de um leito fixo de extração.

A avaliação dos modelos foi realizada a partir da determinação dos desvios relativos médios absolutos (DRMA) e as raiz da média dos erros quadrados (RMEQ) com vistas a identificar a eficiência dos modelos utilizados em descrever os dados experimentais das extrações (Equações 3.13 e 3.14, respectivamente).

$$DRMA = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{C_{exp} - C_{cal}}{C_{exp}} \right| \times 100 \quad (3.13)$$

$$RMEQ = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(C_{exp} - C_{cal})^2}{n}} \quad (3.14)$$

Onde n é o número de dados experimentais, C_{exp} é a concentração de extrato coletada experimentalmente para um dado tempo de extração e C_{cal} é a concentração de extrato estimada pelo modelo matemático.

3.8.1. MODELOS CINÉTICOS

Apesar de modelos de Lei de Potência serem mais utilizados em processos de adsorção, também são capazes de descrever processos de extração sólido-líquido. As equações tem a forma de $Y = kX^n$, onde X e Y são as variáveis de interesse, n indica ordem da equação e k é uma constante. Do balanço de massa para o solvente onde o soluto é acumulado devido a sua remoção do material vegetal, a seguinte equação diferencial é válida:

$$\dot{m}_e - \dot{m}_s = \frac{\partial m}{\partial t} \quad (3.15)$$

onde \dot{m}_e é a vazão mássica de entrada e \dot{m}_s a vazão mássica de saída. O termo \dot{m}_s é nulo para processos em batelada. Multiplicando a equação 3.15 pelo volume tem-se:

$$Vk(C_s - C) = \frac{\partial CV}{\partial t} \quad (3.16)$$

onde k é a constante de extração, C_s é a concentração de soluto na saturação e C é a concentração de extrato no solvente para um tempo t (DAGOSTIN; CARPINÉ; CORAZZA, 2015). Considerando a cinética de extração representada por um modelo tipo Lei de Potência, este assume a forma de:

$$\frac{dC}{dt} = k(\Delta C^n) = k(C_\infty - C)^n \quad (3.17)$$

e C_∞ ($\text{g}_{\text{extrato}} \text{g}^{-1}_{\text{fruto seco}}$) é a concentração de soluto em equilíbrio com o solvente junto à superfície externa do sólido. Dependendo da ordem de cinética, n , considerada a equação diferencial anterior produz diferente resposta para a concentração do extrato no solvente.

Primeira ordem

Neste caso n será igual a 1. Além disso, se no início do processo ($t = 0$), a concentração de extrato no solvente é nula ($C = 0$), a equação 3.16 quando integrada gera a seguinte expressão para a concentração de soluto no solvente como função do tempo:

$$C = C_\infty(1 - e^{-k_1 t}) \quad (3.18)$$

Segunda ordem

Modelos de segunda ordem são apontados como os que descrevem mais adequadamente processos de extração sólido-líquido. Inicialmente, a maior parte do soluto é extraída rapidamente devido ao contato com o solvente novo, em um segundo momento, o processo torna-se mais lento, sendo governado pela difusão externa do soluto restante na solução (SAYYAR et al., 2009). Assumindo as mesmas condições iniciais da primeira ordem, após a integração da equação 3.16, considerando $n = 2$, obtém-se:

$$C = t \left(\frac{1}{k_2 C_\infty^2} + \frac{t}{C_\infty} \right)^{-1} \quad (3.19)$$

3.8.2. MODELO DIFUSIVO PARA VOLUME LIMITADO (MDVL) – CRANK (1975)

Se uma esfera é desorvida em um volume de solução tão grande que a quantidade de soluto desorvida pela esfera é uma fração negligenciável do todo, e a solução é bem agitada, então a concentração na solução permanece constante. Se, entretanto, existe apenas um volume limitado de solução, a concentração do soluto na solução aumenta conforme o soluto sai da esfera. Sendo a solução bem agitada, a concentração na solução depende apenas do tempo, e é determinada essencialmente pela condição de que a quantidade total de soluto no sistema, ou seja, a soma do que está na solução com a quantidade presente na esfera permanece constante durante o processo difusivo. Em casos onde a difusão é radial, a 2ª Lei de Fick para difusão com um coeficiente de difusão constante é expressa como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (3.20)$$

Onde D é o coeficiente de difusividade, C é a concentração de soluto na esfera, r é a coordenada na direção radial:

$$u = Cr \quad (3.21)$$

A equação 3.20 pode ser reescrita como:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \quad (3.22)$$

A solução estabelecida por Crank (1975) é obtida através de transformada de Laplace assumindo como condições:

$$t = 0 \quad u = aC_0 \quad 0 < r < a \quad (3.23)$$

$$t > 0 \quad u = rf(r) \quad 0 < r < a \quad (3.24)$$

Supõe-se que a esfera de raio a ocupe o espaço $r < a$, enquanto o volume de solução (excluindo o espaço ocupado pela esfera) é V . A concentração de soluto na solução é sempre uniforme e inicialmente a esfera está livre do solvente. A quantidade total de soluto C_t na solução depois de um tempo t é expressa como uma fração da quantidade total extraída depois de um tempo infinito (C_∞) pela relação (Crank, 1975):

$$\frac{C_t}{C_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6 \alpha (\alpha + 1) \exp(-\frac{D\theta_n^2 t}{a^2})}{9 + 9 \alpha + \theta_n^2 \alpha^2} \quad (3.25)$$

onde θ_n são as raízes positivas de

$$\tan\theta_n = \frac{3\theta_n}{3 + \alpha \theta_n^2} \quad (3.26)$$

e

$$\alpha = \frac{3V}{K4\pi a^3} \quad (3.27)$$

onde K é um adimensional, chamado de coeficiente de partição entre o soluto em equilíbrio na esfera e na solução. Significa dizer que a concentração de soluto na superfície da esfera é K vezes a concentração na solução.

Para a determinação da densidade específica do fruto imaturo da erva mate, necessária para o cálculo do raio da esfera equivalente, utilizou-se a técnica de picnometria a gás (OPPENHEIMER; MARTIN; WALKER, 1997; RUGGIERI et al., 2009) com o uso de multipicnômetro (Quantachrome). O gás recomendado deve ser inerte e de pequeno tamanho molecular, de forma que nitrogênio foi escolhido como gás de trabalho.

Inicialmente foi determinada a massa da amostra que se deseja conhecer o volume. Em seguida, a amostra foi introduzida na célula de análise e esta foi colocada na câmara de reservatório de gás. É importante destacar que a pressão residual que permanece na câmara foi liberada, zerando a escala do manômetro. O picnômetro utilizado permite trabalhar com células de três diferentes tamanhos: célula micro, pequena e grande. Neste trabalho, foi utilizada a célula de maior tamanho para possibilitar o uso de uma maior quantidade de matéria prima e, conseqüentemente, retornar resultados mais precisos.

Após a adição do fruto na célula, a válvula que conecta as duas câmaras foi aberta, deixando o sistema à pressão atmosférica. Em seguida, a câmara de expansão é pressurizada com N₂ até 17 psig (± 0,001 psi) (*P1*). A válvula de expansão é aberta e o gás passa da câmara de expansão para a câmara de reservatório de gás, conseqüentemente sofrendo uma redução no seu valor de pressão (*P2*). Em posse destes dois valores, o volume real da amostra é calculado pela Equação 3.28.

$$V_s = V_c - V_R \left(\frac{P_1}{P_2} - 1 \right) \quad (3.28)$$

Onde *V_s* é o volume real do sólido que se deseja conhecer, *V_c* é o volume da célula calibrada e *V_R* é o volume de referência da câmara de expansão. A partir do volume real e da massa da amostra, é possível determinar a densidade específica do material (*ρ_e*) pela Equação 3.29.

$$\rho_e = \frac{m}{V_s} \quad (3.29)$$

3.8.3. MODELO PARA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA – SOVOVÁ (1994)

Este modelo descreve o processo considerando um vaso extrator cilíndrico onde o solvente flui em direção axial com determinada velocidade superficial (*u*) através de um leito que contém os frutos a serem extraídos. O tamanho das partículas e sua concentração inicial

de soluto são considerados homogêneos. Outra hipótese é de que a pressão e a temperatura no leito são constantes. O balanço material do sistema é descrito pelas Equações 3.30 e 3.31.

$$-\rho_s(1 - \varepsilon) \frac{\partial x}{\partial t} = J(x, y) \quad (3.30)$$

$$\rho \varepsilon \left(\frac{\partial y}{\partial t} + u \frac{\partial y}{\partial h} \right) = J(x, y) \quad (3.31)$$

Onde ρ_s é a densidade da fase sólida, ρ é a densidade da fase fluida, ε é a porosidade do leito, x é a fração de soluto na fase sólida, expressa em base livre de soluto, y é fração de soluto na fase fluida, em base livre, J é a taxa de transferência de massa, u é a velocidade superficial do solvente, t é o tempo de extração e h é a coordenada na direção axial.

O modelo divide o processo de extração em períodos que estão relacionados à disponibilidade do soluto na matriz. No primeiro período da extração, considera-se que apenas o soluto de fácil acesso, em contato direto com o solvente, é extraído. Na segunda etapa, o soluto facilmente acessível é esgotado gradualmente da entrada até a saída do leito e por fim, e na terceira etapa, resta apenas soluto de difícil acesso, contido no interior das partículas.

Para possibilitar a solução de uma forma analítica, a autora desconsidera o termo de acúmulo na equação diferencial associada ao balanço na fase fluida $\left(\frac{\partial y}{\partial t}\right)$ e considerando as condições:

$$y|_{h=0,t} = 0; x|_{h,t=0} = x_0 \quad (3.32)$$

A taxa de massa é descrita pelas Equações 3.33 e 3.34 para as fases fluida e sólida, respectivamente, sendo x_k a concentração inicial soluto de fácil acesso no interior das partículas, y_r a solubilidade, k_f e k_s os coeficientes de transferência de massa da fase fluida e sólida, respectivamente.

$$J(x > x_k, y) = k_f a_0 \rho (y_r - y) \quad (3.33)$$

$$J(x \leq x_k, y) = k_s a_0 \rho_s \left(1 - \frac{y}{y_r}\right) \quad (3.34)$$

Sendo área específica para a esfera, a_0 , é calculada pela Equação 3.35, onde d é o diâmetro médio da partícula.

$$a_0 = \frac{6(1 - \varepsilon)}{d} \quad (3.35)$$

A partir das considerações apresentadas anteriormente, Sovová (1994) apresenta a solução:

$$e = \begin{cases} q y_r [1 - \exp(-Z)], & q < q_m \\ y_r [q - q_m \exp(z_w - Z)], & q_m \leq q \leq q_n \\ x_0 - \frac{y_r}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp\left(W \frac{x_0}{y_r} - 1\right) \exp[W(q_m - q)] \frac{x_k}{x_0} \right] \right\}, & q \geq q_n \end{cases} \quad (3.36)$$

Sendo e a massa de extrato relativa à massa de sólido sem contabilizar a massa de soluto. Nas equações anteriores:

$$q = \frac{Qt}{N} \quad (3.37)$$

$$q_m = \frac{(x_0 - x_k)}{y_r Z} \quad (3.38)$$

$$q_n = q_m + \frac{1}{W} \ln \frac{x_k + (x_0 - x_k) \exp\left(\frac{W x_0}{y_r}\right)}{x_0} \quad (3.39)$$

$$\frac{z_w}{Z} = \frac{y_r}{W x_0} \ln \frac{x_0 \exp[W(q - q_m)] - x_k}{x_0 - x_k} \quad (3.40)$$

A vazão de solvente é dada por Q , quantidade específica de solvente é q , e os subscritos m e n correspondem ao início da extração do interior das partículas e fim da extração de soluto de fácil acesso. O termo z_w corresponde à coordenada de contorno entre a

extração rápida e lenta. Os parâmetros ajustáveis Z e W , relativos aos períodos rápido e lento, respectivamente, são diretamente proporcionais aos coeficientes de transferência de massa de cada fase. O equacionamento dos mesmos está descrito a seguir:

$$Z = \frac{k_f a_0 \rho}{\dot{q}(1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (3.41)$$

$$W = \frac{k_s a_0}{\dot{q}(1 - \varepsilon)} \quad (3.42)$$

onde, ρ a massa específica do CO_2 e \dot{q} a vazão mássica de solvente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS PRELIMINARES

Todos os experimentos da fase preliminar foram realizados em duplicata e as médias de seus resultados, assim como seus desvios padrões estão apresentadas a seguir.

4.1.1. CAMPO ELÉTRICO MODERADO

Inicialmente, buscou-se avaliar os efeitos de campo elétrico no rendimento dos extratos. Para isso, fixou-se a temperatura (40 °C) e demais condições operacionais, como proporção sólido-solvente e tempo de aplicação de campo, e três níveis de campo foram investigados. Estes resultados foram comparados com uma extração controle, realizada as mesmas condições, porém sem a aplicação do campo elétrico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

A primeira coluna da Tabela 5 apresenta os resultados de rendimento mássico total de cada extração, os valores são referentes à massa extrato obtida em relação a 10 g do fruto liofilizado. A segunda coluna traz os resultados para a concentração de saponinas nos extratos brutos em equivalente de Ilexosídeo II por massa de extrato bruto. Estes valores foram

obtidos interpolando os valores de absorvância das reações dos extratos com vanilina e ácido sulfúrico na curva apresentada na Figura 15.

Tabela 5 – Rendimento mássico (% $g_{\text{extrato}}g^{-1}$ fruto seco) e concentração de saponinas (% $g_{\text{ilex}}g^{-1}$ extrato) para os extratos obtidos com auxílio de campo elétrico moderado

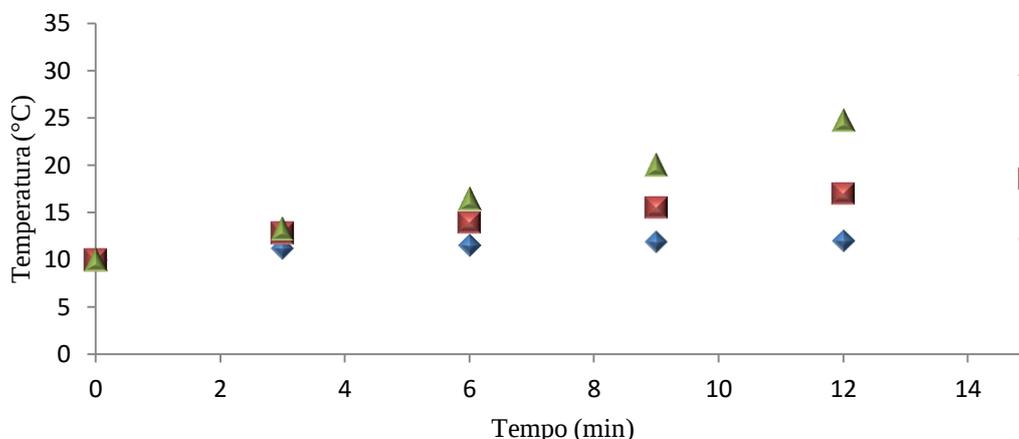
| | Campo elétrico (V cm^{-1}) | Rendimento mássico (% $g_{\text{extrato}}g^{-1}$ fruto seco) | Saponinas totais (% $g_{\text{ilex}}g^{-1}$ extrato) |
|----------|----------------------------------|---|---|
| Controle | - | 3,806 ^b ± 0,038 | 5,224 ^{ab} ± 0,243 |
| | 50,0 | 5,504 ^a ± 0,124 | 6,011 ^a ± 0,402 |
| CEM | 37,5 | 4,950 ^a ± 0,510 | 4,924 ^{ac} ± 0,047 |
| | 25,0 | 5,053 ^a ± 0,316 | 4,231 ^{bc} ± 0,175 |

Valores com as mesmas letras sobrescritas em cada coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao nível de 95% de confiança, o uso de campos elétricos resultou em um aumento do rendimento mássico dos extratos brutos ($p < 0,05$), mas não foi observada uma diferença significativa entre as médias dos extratos obtidos com os diferentes campos. O campo elétrico também influencia no rendimento de saponinas ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as médias dos extratos obtidos a 50 e 37,5 Vcm^{-1} , como pode ser observado na Tabela 5. Porém a um nível de confiança de 95% não é possível rejeitar a hipótese de igualdade entre as médias dos extratos obtidos com auxílio de campo elétrico e o extrato controle e o extrato obtido com o menor campo é menor em relação aos extratos obtidos a tensões mais altas. Este resultado sugere que campos muito baixos não são suficientes para permeabilizar as membranas celulares dos frutos, fazendo com que a condutividade do meio não aumente tanto quanto no caso dos outros dois campos aplicados (37,5 e 50 $V cm^{-1}$) o que resulta num aumento mais lento da temperatura do meio, diminuindo a penetração do solvente na matriz vegetal.

Os perfis de temperaturas para cada uma das condições de campo elétrico avaliadas estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Perfis de temperatura para as diferentes condições de campos elétricos aplicados aos frutos.



Curvas de temperatura (°C) em função do tempo (min) para campos elétricos de: 50 V cm⁻¹ (▲); 37,5 V cm⁻¹ (■); 25 V cm⁻¹ (◆).

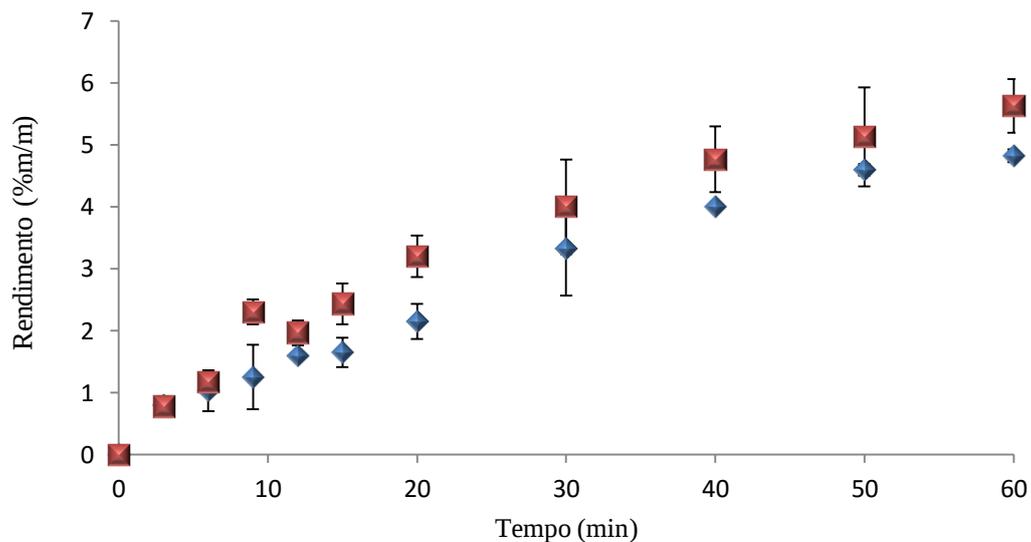
É possível observar que para a menor tensão aplicada (100 V, correspondente ao campo de 25 Vcm⁻¹) a variação de temperatura durante o tratamento é de aproximadamente 2 °C. Para as maiores tensões (200 V e 150 V, correspondentes aos campos de 50 e 37,5 Vcm⁻¹), nota-se um aumento mais acentuado da temperatura ao longo da aplicação dos campos elétricos.

Devido à rampa de temperatura presente no início da extração, uma extração controle mais adequada, que leve em consideração o aquecimento inicial, se faz necessária para isolar os efeitos produzidos pelo campo elétrico dos efeitos térmicos associados. Desta forma, não havendo diferença significativa entre os rendimentos de extrato bruto e de concentração de saponinas nos extratos obtidos com campo de 50 V cm⁻¹ e 37,5 V cm⁻¹, uma nova extração foi realizada aplicando-se 37,5 V cm⁻¹ aos frutos imaturos de erva mate, durante 15 min e amostras de 1 mL foram coletadas de 3 em 3 minutos a fim de se investigar a cinética da extração. Após cessado o campo elétrico, os frutos em contato com o solvente foram aquecidos até 40 °C, sob agitação mecânica e mantidos a esta condição por mais 45 min. Durante a fase difusiva, amostras foram coletadas em intervalos de 10 min para o levantamento da cinética nesta fase da extração. Estas amostras foram centrifugadas em um

Eppendorf® MiniSpin e o sobrenadante foi seco por liofilização e quantificado para o levantamento da curva em percentual de massa de extrato por massa de fruto.

Uma nova extração controle, sem aplicação de campo elétrico, foi realizada, simulando o aquecimento gerado pelo campo elétrico com o auxílio de dois banhos termostáticos que funcionaram como fontes de frio e calor e um arranjo de mangueiras. A cinética deste novo controle foi levantada, de modo análogo ao descrito anteriormente tomando-se o cuidado de que as amostras coletadas nos mesmos tempos estivessem à mesma temperatura. A comparação entre as duas extrações está apresentada na Figura 17. Os rendimentos foram expressos em porcentagem de grama de extrato seco por g de fruto seco em função do tempo de extração, expresso em minutos.

Figura 17 – Cinética de extração do campo de $37,5 \text{ V cm}^{-1}$ vs cinética do controle de temperatura



Curva experimental obtida aplicando-se um campo de $37,5 \text{ V cm}^{-1}$ (■); Curva experimental obtida para extração controle simulando a rampa de aquecimento obtida a $37,5 \text{ V cm}^{-1}$, sem a aplicação de campo (◆).

Analisando as cinéticas de extração dos extratos brutos obtidos, nota-se que para uma mesma condição de temperatura, após os 9 minutos iniciais de extração, há um aumento

gradual do rendimento da extração com campo elétrico em relação ao controle. Este aumento de rendimento pode ser devido ao início da formação de poros nas células dos frutos, facilitando a extração de compostos internos. Este comportamento pode ser observado até os 20 min de extração. Como o campo é cessado aos 15 min de extração, supõe-se que este aumento de rendimento seja devido ao salto de temperatura que ocorre neste intervalo de tempo. Nos 40 min finais de extração, a cinética da extração que sofreu a aplicação de campo elétrico segue sendo mais rápida em relação a extração controle, de forma que é possível inferir que um campo moderado de $37,5 \text{ V cm}^{-1}$ é suficiente para gerar alterações estruturais permanente nas células vegetais que facilitem a extração de compostos intracelulares.

4.1.2. ULTRASSOM

De forma análoga ao apresentado na Tabela 5, a Tabela 6 apresenta os resultados de rendimento de extrato bruto e saponinas para os extratos obtidos aplicando-se diferentes intensidades de ultrassom.

Tabela 6 – Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}^{-1} \text{ fruto seco}$) e concentração de saponinas ($\% \text{ g}_{\text{illex}} \text{ g}^{-1} \text{ extrato}$) para os extratos obtidos com auxílio de ultrassom

| | Intensidade W cm^{-2} | Rendimento mássico total ($\% \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}^{-1} \text{ fruto seco}$) | Saponinas totais ($\% \text{ g}_{\text{illex}} \text{ g}^{-1} \text{ extrato}$) |
|----------|-----------------------------------|---|--|
| Controle | - | $3,806^b \pm 0,038$ | $5,224^b \pm 0,243$ |
| | 565 | $7,075^a \pm 0,045$ | $6,680^a \pm 0,113$ |
| US | 423 | $6,205^a \pm 0,715$ | $5,473^b \pm 0,104$ |
| | 282 | $5,741^{ab} \pm 0,118$ | $5,070^b \pm 0,134$ |

Valores com as mesmas letras sobrescritas em cada coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao nível de 95% de confiança, a aplicação de ultrassom resultou em um aumento significativo do rendimento mássico dos extratos brutos ($p < 0,05$), sendo que as maiores intensidades de ultrassom (565 e 423 W cm^{-2}) resultaram em maiores rendimentos e não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade entre os resultados médios do extrato obtido com 282

W cm⁻² e o extrato controle. O ultrassom também influenciou no rendimento de saponinas ($p < 0,05$). As extrações a 565 W cm⁻² apresentaram um rendimento médio em saponinas totais superior não só ao controle como também em relação às outras duas intensidades investigadas no presente estudo.

Para equipamentos de ultrassom do tipo sonda a intensidade do campo acústico gerado é extremamente alta na região logo abaixo do dispositivo, porém esta intensidade cai significativamente quanto mais longe da sonda (KENTISH; FENG, 2014). A hipótese para o rendimento de saponinas inferior ao esperado para as menores intensidades de ultrassom, quando comparada com o controle, é de que a intensidade do ultrassom não foi suficiente para danificar as células a ponto de aumentar a extração. Outra hipótese a ser considerada é de que a maior parte dos frutos não tenham ficado em contato direto com o campo acústico gerado pela sonda, tendo migrado para a parte superior da célula de tratamento, evitando os danos mecânicos causado pelo ultrassom.

4.1.3. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Os resultados dos rendimentos de extratos brutos obtidos na extração com dióxido de carbono supercrítico a 10, 20 e 30 MPa estão apresentados na Tabela 7, juntamente aos resultados de saponinas totais.

Para as condições investigadas nesta fase preliminar, a pressão do fluido supercrítico não foi um parâmetro significativo para o rendimento mássico de extrato bruto por grama de fruto seco, nem na concentração de equivalente de saponinas por grama de extrato bruto seco ($p > 0,05$). Com base nestes resultados, a menor pressão investigada, de 10 MPa, foi fixada como para as próximas etapas de extração. A principal hipótese para a não significância da pressão são os elevados desvios obtidos para a extração com a mistura de etanol e dióxido de carbono supercrítico. Estes desvios são devidos a dificuldade operacional de manter as elevadas pressões constantes ao longo do processo extrativo.

Tabela 7 – Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}^{-1} \text{ fruto seco}$) e concentração de saponinas ($\% \text{ g}_{\text{ilex}} \text{ g}^{-1} \text{ extrato}$) para os extratos obtidos por extração supercrítica

| Pressão (MPa) | Rendimento mássico ($\% \text{ g}_{\text{extrato}} \text{ g}^{-1} \text{ fruto seco}$) | Saponina total ($\% \text{ g}_{\text{ilex}} \text{ g}^{-1} \text{ extrato}$) |
|---------------|---|---|
| 30 | $3,550^a \pm 1,767$ | $8,051^a \pm 0,639$ |
| 20 | $5,000^a \pm 0,283$ | $8,241^a \pm 0,381$ |
| 10 | $3,750^a \pm 1,344$ | $8,653^a \pm 0,286$ |

Valores com sobrescritos iguais em cada coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

4.1.4. FRAÇÕES SAPONOSÍDICAS

Com base nos resultados obtidos para o rendimento de saponinas dos extratos brutos na fase preliminar, os que apresentaram melhores respostas em concentração de equivalentes de saponinas nos extratos brutos foram fracionados para a obtenção de frações ricas em saponinas. Os extratos obtidos por campo elétrico a $37,5 \text{ V cm}^{-1}$, ultrassom a 565 W cm^{-2} e o extrato controle foram redissolvidos em água Milli-Q e particionados com clorofórmio e *n*-butanol (Merk). As frações butanólicas obtidas, ricas em saponinas, foram secas em evaporador rotativo a pressão reduzida e denominadas $\text{Controle}_{\text{sap}}$, CEM_{sap} e US_{sap} , respectivamente. Para as extrações por fluido supercrítico, a pressão de 10 MPa foi considerada ótima e seu extrato selecionado para o fracionamento. O extrato foi dissolvido em água Milli-Q e particionado apenas com butanol. Esta fração foi chamada de EFS_{sap} . Estas novas frações enriquecidas foram submetidas novamente aos ensaios de quantificação de saponinas totais e os resultados estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração de saponinas nas frações butanólicas obtidas por partição líquido-líquido

| | Saponinas totais ($\% \text{ g}_{\text{ilex}} \text{ g}^{-1} \text{ extrato purificado}$) |
|--------------------------------|---|
| $\text{Controle}_{\text{sap}}$ | $7,94^c \pm 0,84$ |
| CEM_{sap} | $13,23^b \pm 0,20$ |
| US_{sap} | $17,88^a \pm 0,27$ |
| EFS_{sap} | $18,21^a \pm 0,07$ |

Valores com as mesmas letras sobrescritas não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$)

A um nível de 95% de confiança pode-se afirmar que o tratamento é significativo no rendimento em saponinas das extrações a partir de frutos verdes de erva mate. Tanto a fração enriquecida obtida por campo elétrico quanto por ultrassom apresentaram concentrações de saponinas significativamente superiores em relação ao controle.

A fração enriquecida obtida do extrato supercrítico apresentou uma concentração de saponinas estatisticamente igual à fração obtida por ultrassom. Esse resultado sugere que a recuperação de saponinas pela técnica de partição é eficiente na concentração de saponinas em uma fração, uma vez que o resultado médio do ultrassom ficou próximo ao do extrato obtido por fluido supercrítico que foi a técnica que apresentou um maior grau de seletividade para saponinas.

4.1.5. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

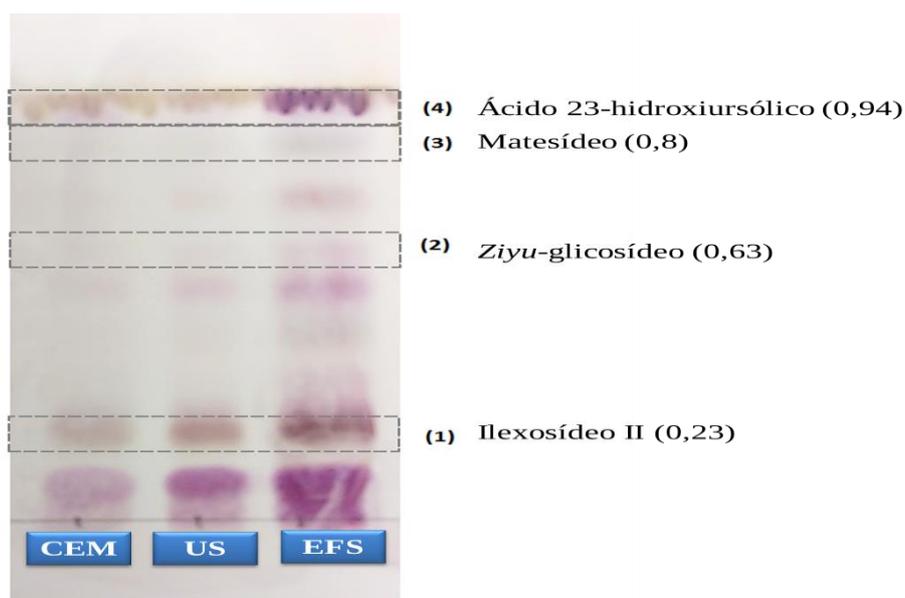
Os extratos saponosídicos obtidos no item 4.1.4 tiveram seu perfil cromatográfico investigados por CCD em sistema eluente composto por clorofórmio:etanol:água (20:10:0,5 v/v/v), a fim de se identificar algumas das saponinas dos extratos, por meio da comparação com padrões. A placa cromatográfica, revelada com anisaldeído sulfúrico está apresentada Figura 18.

Colorações do azul ao púrpura se desenvolveram após a reação das saponinas com uma solução de anisaldeído sulfúrico e aquecimento. A comparação dos R_f das manchas destacadas (1), (2), (3) e (4) na Figura 18 com os da Tabela 4 indica que se tratam dos compostos Ilexosídeo II, Ziyu-glicosídeo, matesídeo e ácido 23-hidroxiursólico, respectivamente. Os valores de R_f encontrados para as amostras estão indicados entre parênteses ao lado do nome dos compostos.

Deste modo, pelos perfis cromatográficos, não se observou diferenças quanto ao número, intensidade e posição das manchas relacionadas às saponinas para os extratos obtidos através de campo elétrico moderado e ultrassom. No entanto, observam-se diferenças quanto à intensidade das manchas relacionadas às saponinas para os extratos obtidos através de extrações a pressão atmosférica. O perfil cromatográfico do extrato purificado obtido por

extração supercrítica indica a presença dos compostos matesídeo, *Ziyu*-glicosídeo e Ilexosídeo II (manchas (3), (2) e (1)) em maior quantidade assim como a presença da saponina ácido 23-hidroxiursólico não observada nos perfis obtidos para campo elétrico moderado e ultrassom.

Figura 18 – Cromatografia em camada delgada das frações butanólicas dos extratos purificados



4.1.6. CONSIDERAÇÕES

Analisando-se apenas o rendimento de extrato bruto, o campo elétrico moderado e o ultrassom melhoraram o rendimento de extração em relação ao controle. Porém ao analisar os resultados de rendimento de saponina, apenas a condição de amplitude máxima (565 Wcm^{-2}) foi superior ao controle a um nível de 95% de confiança. Isso pode ser explicado pela localização dos compostos no interior das células vegetais. Açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e compostos bioativos como saponinas são encontrados em maiores quantidades dentro dos vacúolos (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015). Campos elétricos de moderada intensidade atuam modificando a estrutura das membranas celulares, aumentando sua

permeabilidade e este efeito pode ser cessado caso o campo não seja forte o suficiente. Ultrassons atuam nas paredes celulares, que protegem as células de danos mecânicos, porém a relação entre a intensidade do ultrassom e danos celulares não são necessariamente lineares. Dependendo da potência aplicada, zonas estacionárias podem ser formadas, reduzindo o contato do solvente com a matriz vegetal e impactando negativamente o rendimento de compostos bioativos. Para as condições investigadas é razoável afirmar que a maior intensidade de ultrassom foi capaz de promover um maior dano estrutural, aumentando a área de contato e assim a extração de saponinas.

Os extratos obtidos por extração por fluido supercrítico apresentaram rendimentos de extrato bruto inferiores em sua maioria aos obtidos por campo elétrico moderado e ultrassom, porém, aparentemente, foram mais seletivos para saponinas do que os obtidos através das duas técnicas a pressão atmosférica.

4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Com vistas a utilizar um tratamento estatístico mais rigoroso que permita análises mais seguras e confiáveis, foi utilizada uma metodologia de análise de superfície de resposta tendo em vista a maximização do rendimento de saponinas dos extratos obtidos através das três técnicas de extração em estudo no presente trabalho.

Uma vez observada a influência da intensidade de campo elétrico e de ultrassom sobre os rendimentos de saponina dos extratos, buscou-se investigar os efeitos de diferentes temperaturas sobre o rendimento de extração e a correlação entre os fatores. Para isso, as condições de campo ($37,5 \text{ V cm}^{-1}$) e intensidade de ultrassom (423 W cm^{-2}) médias foram utilizadas, ambas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, como ponto central para a construção de fatoriais 2^2 , resultando em um total de seis experimentos para cada tecnologia.

Para a EFS, a pressão foi fixada em 10MPa e construiu-se um fatorial 2^k com repetição no ponto central, utilizando os resultados obtidos na fase de testes preliminares na pressão ótima e avaliando os efeitos dos fatores temperatura e vazão de solvente. As vazões de CO_2 variaram de $1,64 \times 10^{-4}$ a $2,78 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ e temperaturas de 30 (subcrítico) a 50°C .

Para realizar o ajuste do modelo de predição, análise da variância e superfície de resposta foi utilizado o programa estatístico Statistica 10® e as superfícies de resposta foram obtidas com o auxílio do *software* Matlab®. A otimização foi realizada em função de saponina total extraída que foi expressa em micrograma de equivalente de Ilexosídeo II por miligrama de extrato bruto. As matrizes de delineamento dos experimentos com os níveis de cada fator e resultados, modelos ajustados e curvas de níveis geradas estão apresentados a seguir.

4.2.1. CAMPO ELÉTRICO MODERADO

A matriz de delineamento de experimentos para campo elétrico e os resultados em rendimento de saponinas totais para cada condição de extração estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Planejamento fatorial 2² com repetição no ponto central variando campo e temperatura para as extrações auxiliadas por campo elétrico moderado

| Amostra | Variáveis codificadas | | Variáveis decodificadas | | Respostas |
|---------|-----------------------|-------|-------------------------|----|----------------|
| | x_{1C} | x_2 | C* | T* | Saponina total |
| 1 | 1 | -1 | 50,0 | 30 | 45,39 |
| 2 | 1 | 1 | 50,0 | 50 | 64,26 |
| 3 | -1 | -1 | 25,0 | 30 | 30,57 |
| 4 | -1 | 1 | 25,0 | 50 | 61,56 |
| 5 | 0 | 0 | 37,5 | 40 | 49,70 |
| 6 | 0 | 0 | 37,5 | 40 | 48,77 |
| 7 | 0 | 0 | 37,5 | 40 | 48,09 |

* C = x_{1C} = Campo elétrico (V cm⁻¹); *T = x_2 = Temperatura (°C); Saponina total ($\mu\text{g}_{\text{illex}}\text{mg}^{-1}_{\text{extrato}}$);

Os dados da Tabela 9 foram submetidos a análise da variância (ANOVA) com o auxílio do Statistica® para os resultados de saponinas totais e estão apresentadas na Figura 19. A curvatura não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) e o termo quadrático pôde ser desconsiderado, reduzindo o modelo preditivo a um modelo linear de primeira ordem.

Figura 19 – Análise da variância do fatorial 2² com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas com auxílio de campo elétrico

| | SS | df | MS | F | p |
|-------------------------|----------------------|------|--------|--------|------|
| Campo (linear) | 76,73 | 1,00 | 76,73 | 40,59 | 0,01 |
| Temperatura (linear) | 621,53 | 1,00 | 621,53 | 328,84 | 0,00 |
| Campo x Temperatura | 36,77 | 1,00 | 36,77 | 19,46 | 0,02 |
| Erro | 5,67 | 3,00 | 1,89 | | |
| SS total | 740,70 | 6,00 | | | |
| R ² = 0,9923 | MS residual = 1,8900 | | | | |

Conforme os dados da ANOVA, a intensidade de campo elétrico, temperatura e a interação entre os dois fatores são estatisticamente significativas ($p < 0,05$) considerando um nível de confiança de 95%. A análise indica também que a regressão é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e assim pode-se aplicar o modelo para descrever a variação do rendimento de saponina no extrato. Assim, os coeficientes de regressão para variáveis codificadas da superfície de resposta foram estimados (Tabela 10) pelo modelo linear sendo obtida a Equação 4.1 para saponinas totais (Tabela 11).

Tabela 10 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas com auxílio de campo elétrico moderado

| Termo | Coeficiente codificado | p |
|--------------|------------------------|------|
| β_0 | 49,77 | 0,00 |
| β_1 | 4,38 | 0,01 |
| β_2 | 12,47 | 0,00 |
| β_{12} | -3,03 | 0,02 |

Observando-se os termos betas, é possível observar que o fator que apresenta o maior impacto no rendimento de saponinas é a temperatura, seguido do campo. O fato dos coeficientes serem positivos indica que quanto maiores as temperaturas e os campos aplicados, maiores os rendimentos de saponinas. Ao mesmo tempo, o termo de interação tem um efeito contrário no rendimento.

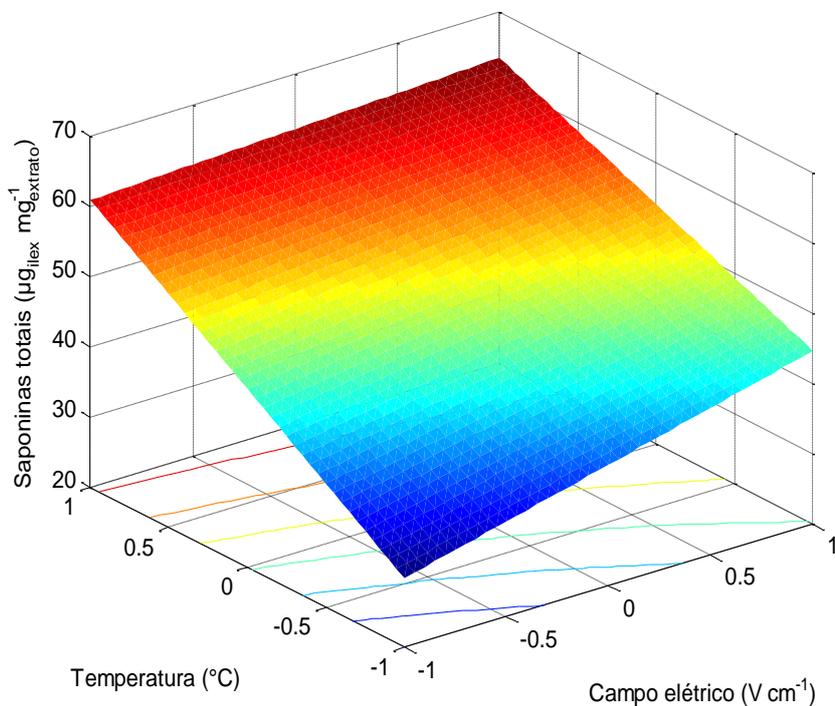
Tabela 11 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 9

| Resposta | Modelo linear | Eq. | R ² | Erro(%) |
|---|---|-------|----------------|---------|
| $\mu\text{g}_{\text{ilex}} \text{mg}^{-1}$ extrato bruto | $y_{\text{ilex}} = 49,77 + 4,38 x_{1C} + 12,46x_2 - 3,03x_{1C} x_2$ | (4.1) | 0,9934 | 1,9272 |

Com base nos coeficientes de determinação igual a 99,34% e o baixo erro percentual calculado é possível afirmar que o modelo linear ajustado descreve adequadamente os dados experimentais.

O modelo obtido (Eq. 4.1) foi utilizado para a construção da superfície de resposta para saponinas totais (Figura 20) que está apresentada a seguir. Os dados representados pela Figura 20 indicam um aumento mais expressivo do rendimento em micrograma de saponinas por miligrama de extrato a condições de campo e temperatura mais elevadas. Desta forma, pode-se definir como melhor condição para a extração de saponinas a partir de frutos verdes de erva mate por campo elétrico moderado a temperatura de 50 °C e intensidade de campo de 50 V cm⁻¹. Extrapolando-se o modelo, pode-se inferir que campos mais elevados e maiores temperaturas poderiam resultar em maiores rendimentos de saponinas. Entretanto, limitações no equipamento de campo elétrico restringem a intensidade de campo ao máximo de 50 V cm⁻¹ e por uma questão de segurança não é recomendado trabalhar a temperaturas muito superiores a 50 °C uma vez que o equipamento não é vedado e vapores da solução hidroalcoólica usada como solvente podem causar faíscas durante a aplicação do campo.

Figura 20 – Superfície de resposta para a concentração de saponinas em função da intensidade de campo e temperatura para extrações auxiliadas por campo elétrico moderado



4.2.2. ULTRASSOM

A matriz de delineamento de experimentos para extrações com ultrassom e os resultados em rendimento de saponinas totais para cada condição de extração estão apresentadas na Tabela 12.

Os dados da Tabela 12 foram submetidos à análise da variância (ANOVA) com o auxílio do *software* Statistica® para os resultados em saponinas totais e estão apresentadas. Conforme os dados da ANOVA (Figura 21), apenas intensidade de ultrassom e temperatura apresentam significância estatística ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), não sendo verificada a significância da interação entre os fatores ($p > 0,05$). A curvatura e a interação entre os fatores não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) e tanto o termo quadrático quanto o de interação foram desconsiderados.

Tabela 12 – Planejamento fatorial 2² com repetição no ponto central variando intensidade de ultrassom e temperatura para as extrações auxiliadas por ultrassom

| Amostra | Variáveis codificadas | | Variáveis decodificadas | | Respostas |
|---------|-----------------------|-------|-------------------------|----|----------------|
| | x_{1P} | x_2 | P* | T* | Saponina total |
| 1 | 1 | -1 | 565 | 30 | 51,46 |
| 2 | 1 | 1 | 565 | 50 | 68,30 |
| 3 | -1 | -1 | 282 | 30 | 31,92 |
| 4 | -1 | 1 | 282 | 50 | 44,72 |
| 5 | 0 | 0 | 423 | 40 | 53,69 |
| 6 | 0 | 0 | 423 | 40 | 55,77 |

* P = x_{1P} = Intensidade de ultrassom ($W\ cm^{-2}$); *T = x_2 = Temperatura ($^{\circ}C$); Saponina total ($\mu g_{ilex}\ mg^{-1}$ extrato bruto);

Figura 21 – Análise da variância do fatorial 2² com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas com auxílio de ultrassom

| | SS | df | MS | F | p |
|---------------------------|-----------------------|----|--------|-------|------|
| Intensidade (linear) | 464,92 | 1 | 464,92 | 28,74 | 0,01 |
| Temperatura (linear) | 219,75 | 1 | 219,75 | 13,59 | 0,03 |
| Intensidade x Temperatura | - | - | - | - | - |
| Erro | 48,52 | 3 | 16,17 | | |
| SS total | 733,20 | 5 | | | |
| $R^2 = 0,7550$ | MS residual = 35,6990 | | | | |

Os coeficientes de regressão da superfície de resposta foram estimados pelo modelo linear (Tabela 13) sendo obtida a Equação 4.2 para saponinas totais, expressas em micrograma de equivalente de Ilexosídeo II por miligrama de extrato bruto seco e estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas com auxílio de ultrassom

| Termo | Coeficiente codificado | p |
|-----------|------------------------|------|
| β_0 | 50,98 | 0,00 |
| β_1 | 10,78 | 0,01 |
| β_2 | 7,41 | 0,03 |

Analisando os coeficientes betas e seus valores p, é possível observar que o fator mais significativo na concentração de saponinas nos extratos brutos é a intensidade do ultrassom aplicado. Ambos os coeficientes lineares são positivos, indicando uma tendência da resposta em saponinas aumentar para valores de intensidade de ultrassom e temperaturas mais elevadas.

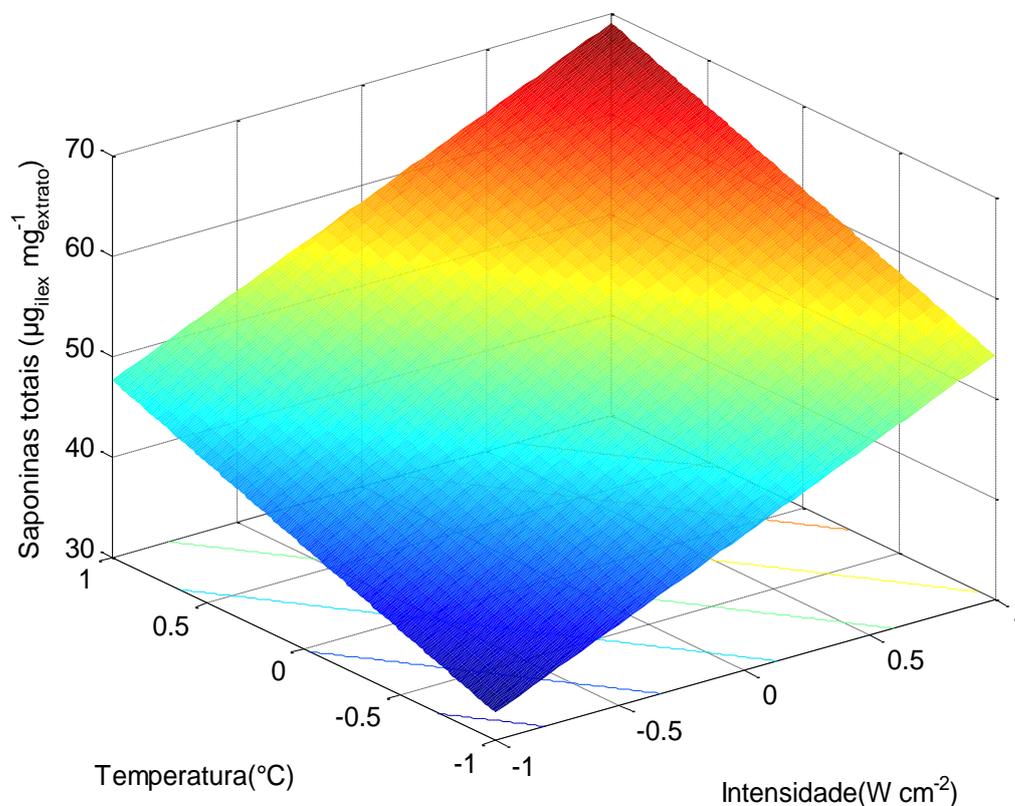
Tabela 14 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 12

| Resposta | Modelo linear | Eq. | R ² | Erro (%) |
|---|--|-------|----------------|----------|
| $\mu\text{g}_{\text{ilex}} \text{mg}^{-1} \text{ extrato}$ bruto | $y_{\text{ilex}} = 50,98 + 10,78x_{1P} + 7,41 T x_2$ | (4.2) | 0,9338 | 4,9500 |

Com base nos coeficientes de determinação igual a 93,38% e erro percentual de 4,95 é razoável afirmar que o modelo linear ajustado descreve adequadamente os dados experimentais. O modelo obtido foi utilizado para a construção da superfície de resposta para saponinas totais (Figura 22) apresentada a seguir:

Os dados representados pela Figura 20 indicam um aumento mais expressivo do rendimento em micrograma de saponinas por miligrama de extrato a condições de intensidade e temperatura mais elevadas. Desta forma, pode-se definir como melhor condição para a extração de saponinas a partir de frutos verdes de erva mate por ultrassom a temperatura de 50 °C e intensidade de ultrassom de 565 W cm⁻². As curvas de nível obtidas sugerem o aumento mais acentuado do rendimento em μg de saponinas por miligrama de extrato com a ascendência da intensidade de ultrassom aplicada.

Figura 22 – Superfície de resposta para a concentração de saponinas em função da intensidade de ultrassom e temperatura para extrações auxiliadas por ultrassom



4.2.3. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

A matriz de delineamento de experimentos para extrações com fluido supercrítico e os resultados em rendimento saponinas totais para cada condição de extração estão apresentadas na Tabela 15. Como nos resultados preliminares, não foi observado influência da pressão sobre os rendimentos, foram incluídas na análise fatorial as variáveis vazão e temperatura. Os dados da Tabela 15 foram submetidos à análise da variância (ANOVA) com o auxílio do *software* Statistica 10® para os resultados em saponinas totais (Figura 23).

Conforme os dados da ANOVA, a vazão de dióxido de carbono, a temperatura e a interação entre os dois fatores não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) a um nível de confiança de 95%. Os coeficientes de regressão da superfície de resposta foram estimados

pelo modelo linear (Tabela 16) sendo obtida a Equação 4.3 para saponinas totais expressas em micrograma de equivalente por miligrama de extrato bruto seco:

Tabela 15 – Planejamento fatorial 2² com repetição no ponto central variando vazão de CO₂ e temperatura para as extrações por fluido supercrítico

| Amostra | Variáveis codificadas | | Variáveis decodificadas | | Respostas |
|---------|-----------------------|-------|-------------------------|----|----------------|
| | x_{1V} | x_2 | V* | T* | Saponina total |
| 1 | 1 | -1 | 2,78 | 30 | 83,92 |
| 2 | 1 | 1 | 2,78 | 50 | 100,96 |
| 3 | -1 | -1 | 1,67 | 30 | 79,86 |
| 4 | -1 | 1 | 1,67 | 50 | 98,53 |
| 5 | 0 | 0 | 2,22 | 40 | 89,75 |
| 6 | 0 | 0 | 2,22 | 40 | 83,99 |
| 7 | 0 | 0 | 2,22 | 40 | 98,53 |

* V = x_{1V} = Vazão de CO₂ x 10⁻⁴ (kg s⁻¹) *T = x_2 = Temperatura (°C);
Saponina total (µg_{ilex} mg⁻¹ extrato bruto).

Figura 23 – Análise da variância do fatorial 2² com repetição no ponto central para saponinas totais obtidas por extração supercrítica

| | SS | df | MS | F | p |
|-------------------------|-----------------------|----|--------|------|------|
| Vazão(linear) | 10,5444 | 1 | 10,54 | 0,30 | 0,62 |
| Temperatura (linear) | 318,9671 | 1 | 318,97 | 8,93 | 0,06 |
| Vazão x Temperatura | 0,6590 | 1 | 0,66 | 0,02 | 0,90 |
| Erro | 107,0970 | 3 | 35,70 | | |
| SS total | 437,2675 | 6 | | | |
| R ² = 0,9338 | MS residual = 16,1743 | | | | |

O único coeficiente significativo é o termo associado com a média das observações realizadas. O termo associado a temperatura é o que apresenta maior significância entre os coeficientes calculados para os dados experimentais obtidos no presente trabalho, porém não é significativo a um nível de 95 % de confiança.

Apesar das variáveis independentes, temperatura e vazão, serem estatisticamente não significativas a um nível de confiança de 95%, com a quantidade de ensaios realizados é possível observar que os dados representados pela Tabela 15 indicam um pequeno aumento

do rendimento em μg de saponinas por grama de extrato a vazões e temperaturas mais elevadas. Esta tendência está em acordo com o esperado segundo dados da literatura para extração de glicosídeos triterpênicos (CHEN; XIE; GONG, 2007; PALMA et al., 2000; PASQUEL et al., 2000). Com temperaturas mais elevadas é possível que a solubilidade das espécies passíveis de remoção que reajam com vanilina aumente e com isso se obtenha uma maior rendimento de saponinas e saponinas equivalentes.

Tabela 16 – Coeficientes codificados para a regressão da superfície de respostas para a concentração de saponinas obtidas por extração supercrítica

| Termo | Coeficiente codificado | p |
|--------------|------------------------|-------|
| β_0 | 90,79 | <0,05 |
| β_1 | 1,62 | 0,624 |
| β_2 | 8,92 | 0,058 |
| β_{12} | -0,40 | 0,900 |

Tabela 17 – Modelos lineares completos ajustados aos dados da Tabela 15

| Resposta | Modelo linear | Eq. | R ² | Erro% |
|---|--|-------|----------------|--------|
| $\mu\text{g}_{\text{ilex}} \text{mg}^{-1}$ extrato bruto | $y_{\text{ilex}} = 90,79 + 1,62 V + 8,92 T - 0,40 V * T$ | (4.3) | 0,75501 | 2,8694 |

Desta forma, com base nos resultados obtidos analisando como condições de extração vazões de CO_2 de 1,68 a $2,78 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ e temperaturas de 30 a 50 °C, a concentração de saponinas no extrato bruto é independente da vazão e temperatura empregadas para a extração de saponinas a partir de frutos verdes de erva mate usando misturas de etanol e dióxido de carbono em estados sub e super crítico. Isso pode ser afirmado, especificamente, para as condições investigadas no presente estudo. Dessa forma não há sentido em gerar uma superfície de resposta para a equação encontrada. O modelo linear não se mostrou adequado para descrever os rendimentos dos extratos obtidos através desta técnica.

4.3. MODELAGEM MATEMÁTICA

4.3.1. CAMPO ELÉTRICO MODERADO E ULTRASSOM

Neste estudo, os dados cinéticos das extrações que apresentaram maiores rendimentos de saponinas ($37,5 \text{ V cm}^{-1}$ e 565 W cm^{-2}) e extração controle a temperatura e agitação constante da fase de testes preliminares foram determinados coletando-se alíquotas de 1 mL em intervalos de tempo de 3 min durante os primeiros 15 min de extração e de 10 min para os 45 min finais. Para descrever os processos extrativos, modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem, assim como um modelo difusivo para volume limitado (MDLV), foram ajustados aos dados experimentais com o auxílio do software Matlab®. Os parâmetros obtidos para cada modelo estão apresentados nas Tabelas 18, 19 e 21 na ordem em que os modelos foram apresentados.

Ambos os modelos cinéticos representaram satisfatoriamente os dados experimentais para as curvas de extração. A diferença entre os modelos foi considerada não significativa sendo que seus coeficientes de determinação para cada tecnologia foram bastante próximos assim como os desvios absolutos (DRMA) de cada modelo. As curvas experimentais e as geradas pelo ajuste do modelo matemático estão apresentadas nas Figuras 24.a (1ª ordem) e 24.b (2ª ordem). Os gráficos foram expressos em $\% g_{\text{extrato}} g^{-1}_{\text{frutoseco}}$ em função do tempo em minutos.

Estes modelos mostram que a taxa de extração, representada pelo parâmetro ajustável k e a concentração de soluto na solução após um tempo infinito, representada por C_{∞} , são consideravelmente maiores para a técnica de ruptura celular mais agressiva (ultrassom). O menor valor de k para a extração auxiliada por campo elétrico quando comparada com o controle pode ser atribuída à diferença de velocidade de extração nos minutos iniciais de extração com o campo, quando o solvente teve que ser mantido sob resfriamento para evitar um sobreaquecimento decorrente da passagem de corrente elétrica através da matriz vegetal.

Para o modelo difusivo MDLV (Crank, 1975) foram calculados as raízes de q_n e o valor da Difusividade (D) e coeficiente de partição (K) foram estimados. Os parâmetros de entrada necessários para este modelo foram: V , equivalente ao volume de solvente utilizado, que para fins de simplificação foi considerado 100 mL; a , que corresponde ao raio da esfera

equivalente de 10 g de frutos imaturos de erva mate, uma vez que o modelo prevê a dessorção do soluto a partir de uma esfera única, calculada através da densidade do sólido. Uma vez conhecida a densidade específica do sólido e a massa total de frutos usado no experimento, através da relação massa e volume é possível calcular o raio da esfera equivalente de 10 g de fruto verde de erva mate. Foram determinadas três medidas de densidade e a média das medidas mais ou menos o desvio, assim como o raio da esfera equivalente calculado estão apresentados na Tabela 20, onde ρ_e é a densidade específica.

Tabela 18 – Parâmetros estimados pelo modelo de primeira ordem para as curvas a 40 °C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom

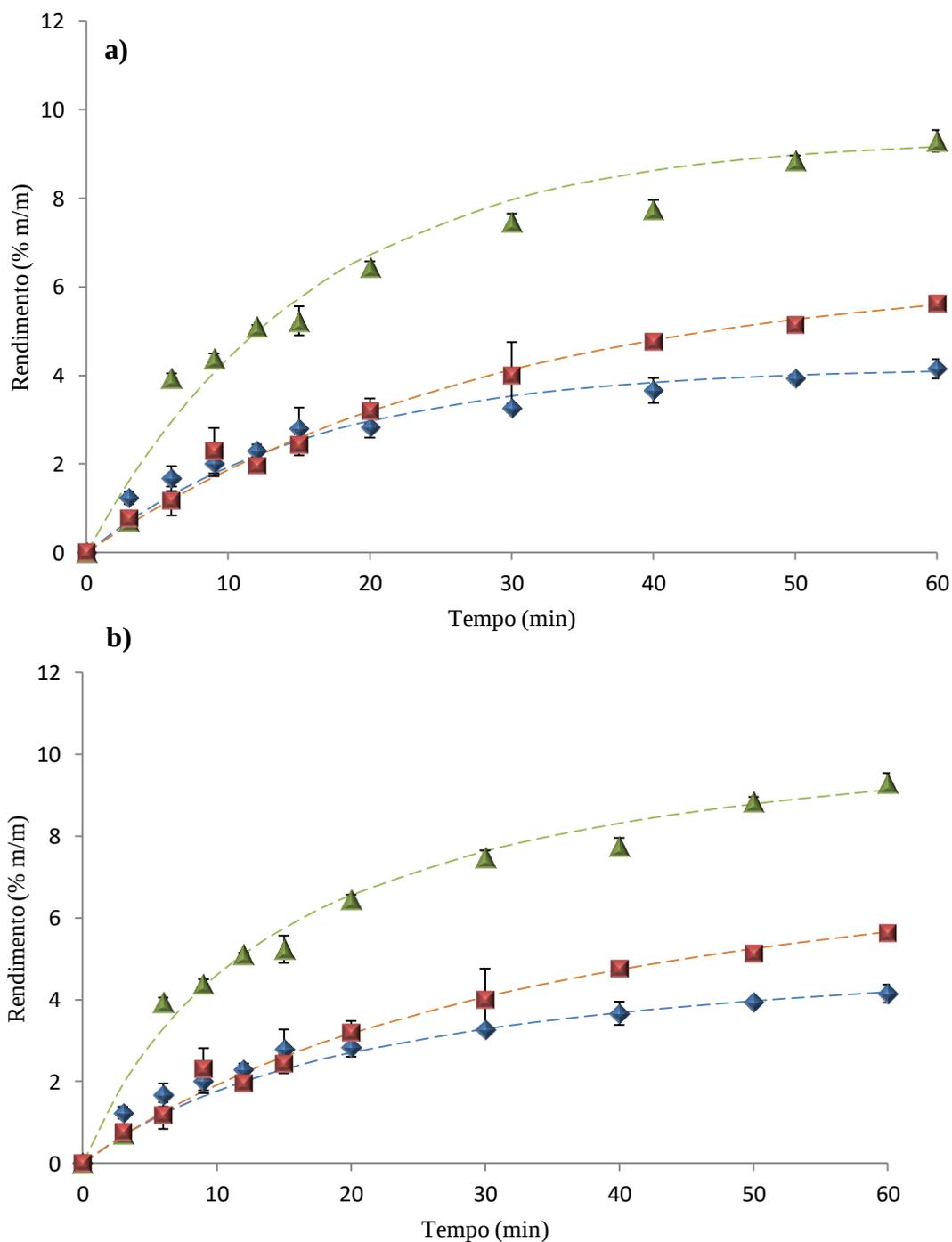
| | C_{∞} (g _{extrato} g ⁻¹ fruto seco) | k (min ⁻¹) | R ² | DRMA | RMEQ |
|-----------------------|---|-----------------------------|----------------|---------|--------|
| Primeira ordem | | | | | |
| Controle | 0,0420 | 0,0615 | 0,9882 | 10,0797 | 0,0091 |
| CEM | 0,0647 | 0,0330 | 0,9938 | 6,0879 | 0,0032 |
| US | 0,0938 | 0,0631 | 0,9841 | 18,0383 | 0,0097 |

Tabela 19 – Parâmetros estimados pelo modelo de segunda ordem para as curvas a 40 °C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom

| | C_{∞} (g _{extrato} g ⁻¹ fruto seco) | k (g g _{fruto seco} ⁻¹ min ⁻¹) | R ² | DRMA | RMEQ |
|----------------------|---|---|----------------|---------|--------|
| Segunda ordem | | | | | |
| Controle | 0,0578 | 0,7599 | 0,9877 | 11,8481 | 0,0057 |
| CEM | 0,0923 | 0,2797 | 0,9943 | 6,0500 | 0,0031 |
| US | 0,1137 | 0,5978 | 0,9875 | 19,4391 | 0,0022 |

Em posse de todos os parâmetros de entrada necessários para a modelagem matemática, procedeu-se então o ajuste dos parâmetros D (difusividade) e K (coeficiente de partição). Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 21. As curvas experimentais e as geradas pelo ajuste do modelo matemático estão apresentadas nas Figuras 25. Os gráficos foram expressos em % g_{extrato}g⁻¹ fruto seco em função do tempo em minutos.

Figura 24 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados das extrações de maior rendimento da fase preliminar ajustadas por modelos cinéticos



a) Modelos de primeira ordem; **b)** Modelos de segunda ordem; Curva experimental obtida por ultrassom (▲); Curva experimental obtida por campo elétrico (■); Curva experimental obtida pela extração controle (◆); Modelos ajustados (---);

Tabela 20 – Densidade específica do fruto de erva mate e raio da esfera equivalente

| | | | | |
|----------|--------|---|-------|--------------------|
| ρ_e | 1176,5 | ± | 0,007 | kg m ⁻³ |
| a | 0,0126 | | | m |

Os valores de difusividade calculados foram compatíveis com o comportamento apresentado pelas curvas de extração. A maior difusividade calculado foi para a curva obtida com o auxílio do ultrassom, que foi aproximadamente o dobro das difusividades calculadas para as curvas obtidas por campo elétrico e extração controle. Com isso pode-se afirmar que o ultrassom, dentre as técnicas não convencionais a baixa pressão investigadas no presente estudo, é o tratamento mais eficaz para o aumento da difusividade dos compostos intracelulares, aumentando assim o rendimento global de extração. Os coeficientes de partição também se mostram coerentes, uma vez que significam dizer que a concentração de soluto na superfície da esfera é K vezes a concentração na solução. O maior valor de K corresponde à curva que apresentou o menor rendimento em extrato bruto, que foi a curva controle.

Tabela 21 – Parâmetros estimados pelo modelo de difusividade de uma esfera em uma solução de volume limitado para as curvas a 40 °C da fase preliminar das extrações auxiliadas por campo elétrico moderado e ultrassom

| | C_∞ (g _{extrato} g ⁻¹ fruto seco) | D (m ² s ⁻¹) | K | R ² | DRMA | RMEQ |
|----------|---|--|---------|----------------|--------|--------|
| Controle | 0,0525 | 2,27 x 10 ⁻⁹ | 14,1981 | 0,9926 | 6,2947 | 0,0031 |
| CEM | 0,0725 | 2,06 x 10 ⁻⁹ | 12,5858 | 0,9930 | 7,7770 | 0,0045 |
| US | 0,1000 | 4,04 x 10 ⁻⁹ | 11,9174 | 0,9939 | 3,4944 | 0,0045 |

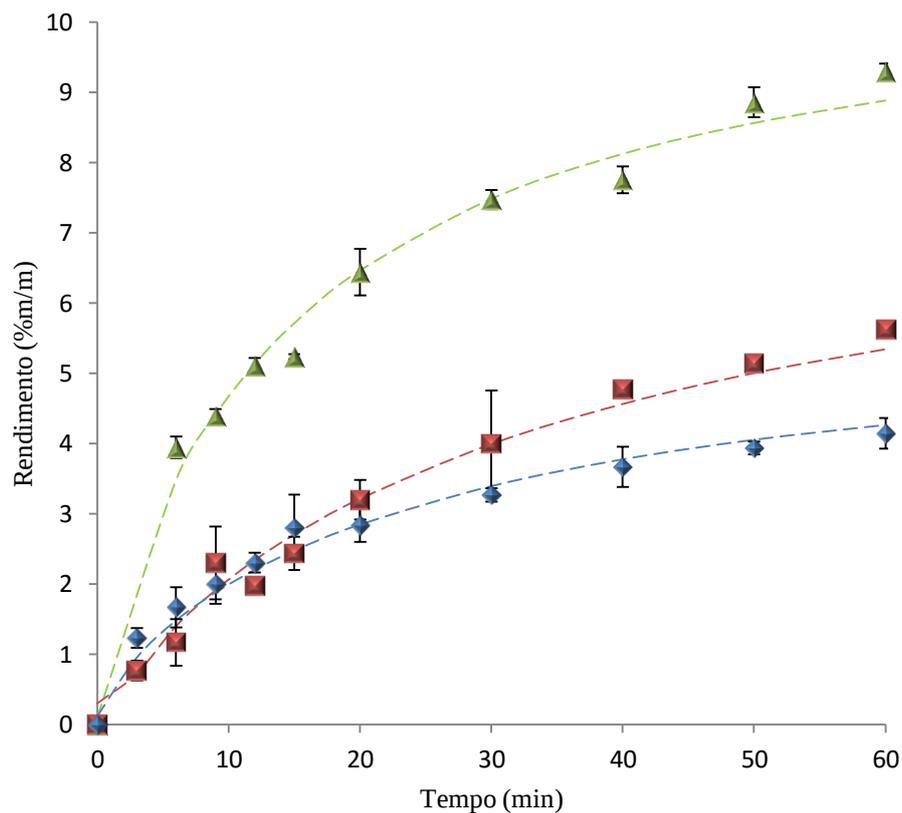
Analisando os coeficientes de determinação para cada tecnologia assim como os desvios absolutos (DRMA) do modelo difusivo em relação aos obtidos através dos modelos de cinética de primeira e segunda ordem, determinou-se o modelo difusivo (MDVL) como o que melhor descreve os dados experimentais da fase preliminar. Assim, o mesmo modelo foi utilizados para a modelagem das curvas de extração nas condições ótimas encontradas com o planejamento fatorial 2² para o campo elétrico moderado (50 V cm⁻¹ e 50 °C) e o ultrassom (565 W cm⁻² 50 °C). As curvas foram construídas de forma similar a descrita anteriormente

para a fase preliminar, porém em intervalos de 5 min para os primeiros 15 min e de 10 min para os 45 min finais. As curvas estão apresentadas na Figura 26:

O modelo difusivo (MDLV) foi ajustado aos dados experimentais com o auxílio do software Matlab ®. Os parâmetros obtidos para cada modelo estão apresentados na Tabela 22.

O modelo difusivo foi capaz de descrever os dados experimentais obtidos para as condições ótimas do campo elétrico e ultrassom retornando coeficientes de correlação iguais a 0,9968 e 0,9918, respectivamente.

Figura 25 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados ($\%g_{\text{extrato}}g^{-1}_{\text{fruto seco}}$) das extrações de maior rendimento da fase preliminar ajustadas pelo modelo difusivo (MDVL)

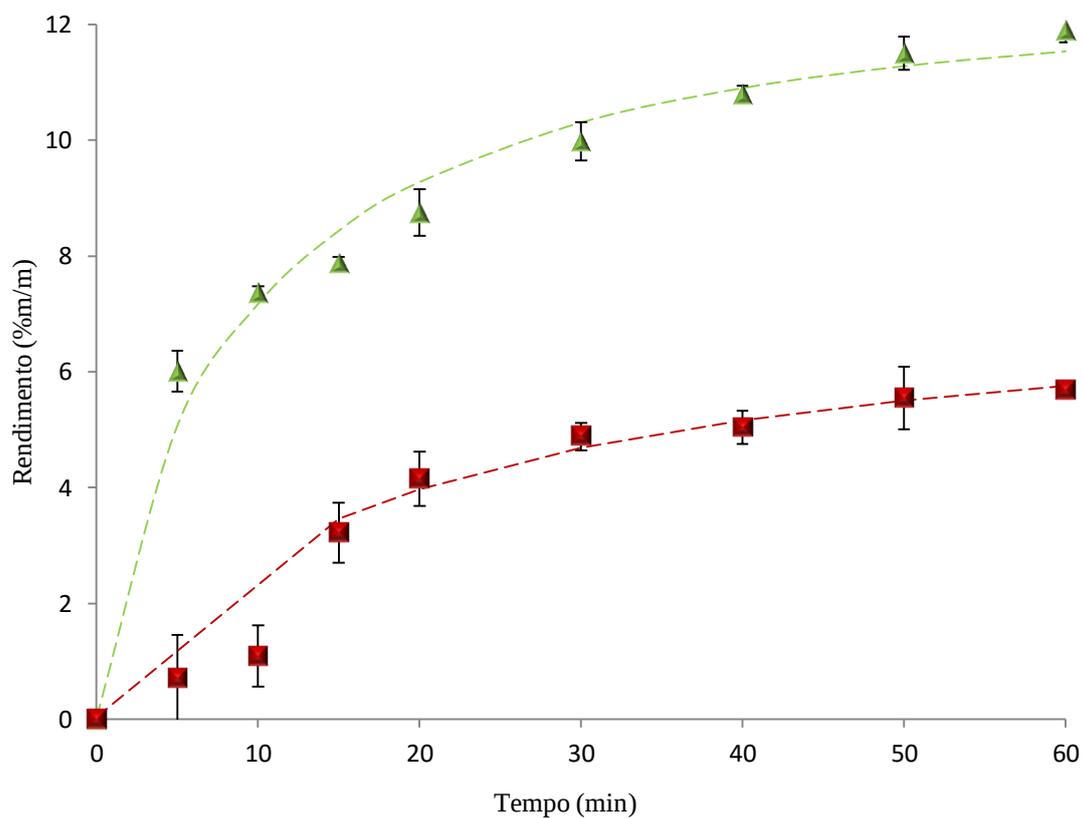


Curva experimental obtida por ultrassom (▲); Curva experimental obtida por campo elétrico (■);
Curva experimental obtida pela extração controle (◆); Modelos ajustados (---);

Tabela 22 – Parâmetros estimados para as condições ótimas de campo elétrico moderado e ultrassom pelo modelo difusivo

| | C_{∞} ($g_{\text{extrato}}g_{\text{fruto seco}}^{-1}$) | D ($m^2 s^{-1}$) | K | R ² | DRMA | RMEQ |
|----------------------|--|-------------------------|---------|----------------|--------|--------|
| CEM _{ótimo} | 0,0685 | $3,08 \times 10^{-9}$ | 11,9922 | 0,9968 | 2,9245 | 0,0023 |
| US _{ótimo} | 0,1215 | $6,31 \times 10^{-9}$ | 12,3942 | 0,9918 | 4,5269 | 0,0079 |

Figura 26 – Rendimentos mássicos experimentais e simulados (%gextratog-1fruto seco) das extrações nas condições ótimas para campo elétrico moderado e ultrassom ajustados pelo modelo difusivo (MDVL)



Curva experimental obtida por ultrassom (▲); Curva experimental obtida por campo elétrico (■)
Modelos ajustados (---);

4.3.2. EXTRAÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO

Como os resultados do planejamento experimental indicam que tanto a vazão quanto a temperatura não são fatores estatisticamente significativos na concentração de saponinas presentes nos extratos obtidos por extração supercrítica, optou-se por construir curvas experimentais de extração apenas para as extrações a $2,22 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$, que caracterizam o ponto central do experimento, e definido como rendimento percentual de massa seca de extrato por massa de fruto seco por tempo, visto que eram as extrações com maior número de replicas.

Para a modelagem matemática do processo os seguintes parâmetros de entrada tiveram que ser calculados: área específica (a_0), porosidade (ϵ), densidade do fruto (ρ_s), vazão de CO_2 (\dot{q}_{CO_2}) e massa específica do CO_2 (ρ_{CO_2}). Para a determinação da massa específica do CO_2 foi utilizada a equação de Peng-Robinson (REID; PRAUSNITZ; POLING, 1987). A porosidade foi calculada pela relação entre o volume do leito de extração e o volume das partículas de matéria prima. A área específica foi estimada pela Equação 3.35, onde o diâmetro médio da partícula (d) foi considerado 5 mm. Todos os parâmetros de entrada do modelo estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 – Parâmetros de entrada para resolução das equações da modelagem da extração por fluido supercrítico

| Parâmetros de entrada | | |
|---|--------------------|-----------------------|
| a_0 | m^{-1} | 336,13 |
| ϵ | | 0,72 |
| ρ_s | kg m^{-3} | 1176,50 |
| \dot{q}_{CO_2} | kg s^{-1} | $2,22 \times 10^{-4}$ |
| $\rho_{\text{CO}_2}^{40^\circ\text{C}}$ | kg m^{-3} | 896,06 |

Os parâmetros estimados estão apresentados na Tabela 24.

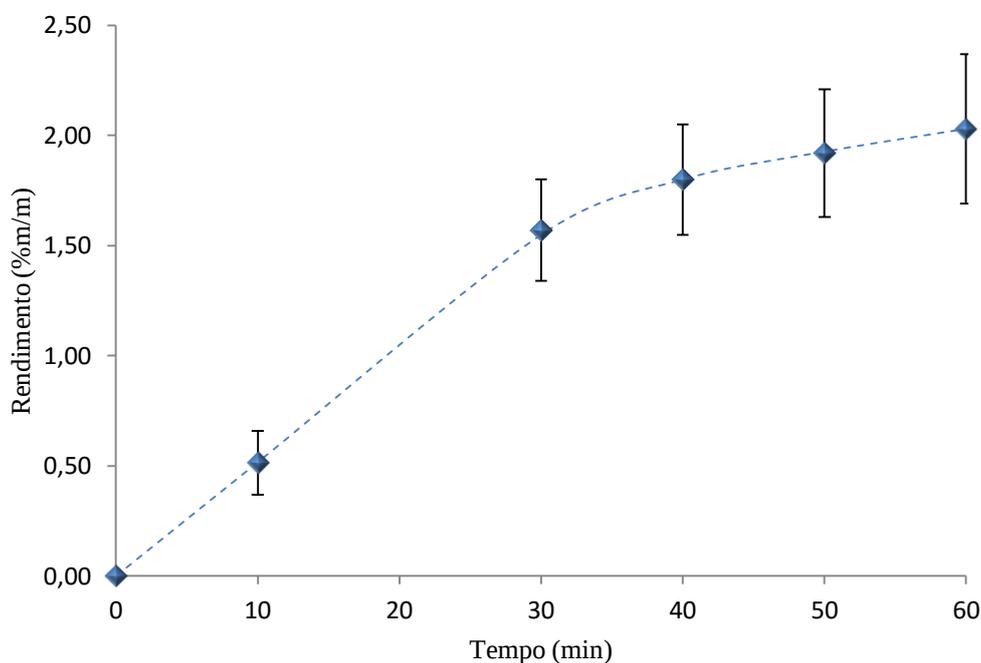
Tabela 24 – Parâmetros estimados através do modelo de Sovová (1994) e coeficientes de transferência de massa calculados para a extração a 10 MPa, 40°C e vazão de $2,22 \times 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}$ de CO_2

| C_∞ ($\text{g}_{\text{extrato}}\text{g}^{-1}_{\text{fruto seco}}$) | x_k | y_r | Z | W |
|--|-----------------------|----------------|--------|--------|
| 0,0250 | 0,0081 | 0,0074 | 0,0539 | 0,0150 |
| k_s | k_s | R ² | DRMA | RMEQ |
| $2,78 \times 10^{-9}$ | $1,31 \times 10^{-8}$ | 0,9999 | 0,3214 | 0,0125 |

Analisando o coeficiente de correlação de 0,9999 e erros obtidos, pode-se afirmar que a curva modelada através das equações propostas por Sovová (1994) descreve adequadamente os dados experimentais da curva de extração supercrítica de extrato bruto a partir de frutos da erva mate expressa em % $\text{g}_{\text{extrato}}\text{g}^{-1}_{\text{fruto seco}}$, em função do tempo em minutos. O valor do coeficiente de transferência de massa da fase sólida (k_s) menor que o do coeficiente de transferência de massa na fase fluida (k_f) indica que os efeitos do mecanismo de convecção são maiores que os de difusão para este processo extrativo. A curva experimental e modelada pode ser observada na Figura 27.

Com a modelagem da extração foram obtidos parâmetros importantes na predição do processo, que possibilitam a simulação do rendimento da extração alterando outras condições experimentais como, por exemplo, volume do extrator, porosidade do leito, granulometria das partículas, entre outras.

Figura 27 – Rendimento mássico experimental e simulado na condição de 10 MPa, 40 °C e $2,2 \times 10^{-4}$ kg s⁻¹ de CO₂



Médias dos rendimentos experimentais em % $g_{\text{extrato}}g_{\text{fruto seco}}^{-1}$ (◆) e desvios médios a 40 °C e $2,22 \times 10^{-4}$ kg s⁻¹; Modelo ajustado (- - -);

5. CONCLUSÕES

Este trabalho buscou avaliar o uso de campo elétrico de moderada intensidade, ultrassom e fluido supercrítico na extração de saponinas, glicosídeos triterpênicos de interesse para indústrias alimentícia e farmacêutica, dos frutos verdes de *Ilex paraguariensis* St. Hill. As cinéticas de extração para cada uma das técnicas foram modeladas matematicamente e parâmetros desconhecidos dos modelos foram obtidos com sucesso. A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção de padrões de saponinas por cromatografia em camada delgada e a quantificação foi baseada em um método espectrofotométrico gerando boas referências para novos planejamentos experimentais.

Em um primeiro momento, as intensidades de campo e de ultrassom foram estudadas e sua influência no rendimento de extração foi avaliada. O ultrassom apresentou tanto rendimentos de extrato bruto quanto de saponinas superiores aos obtidos com campo elétrico. A análise das frações purificadas de saponinas mostrou que as duas técnicas foram mais eficientes na extração seletiva de compostos em relação ao extrato controle obtido por extração com uma solução hidro alcoólica a 30% na temperatura de 40 °C e agitação mecânica. As concentrações de saponinas nos extratos secos e purificados foram 225,1%, para o ultrassom, e 166,6%, para o campo elétrico, superiores ao extrato obtido pela extração controle.

As condições de extração que apresentaram maiores rendimentos em saponina (37,5 V cm⁻¹ e 565 W cm⁻², ambas a 40 °C) foram modeladas matematicamente juntamente a curva obtida para a extração controle (sem a aplicação dos tratamentos). Todos os modelos avaliados apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais apresentando coeficientes de correlação superiores a 98%. O modelo difusivo (Crank, 1975) foi o que melhor representou as curvas experimentais, com coeficientes de determinação superiores a 99% para todas as curvas.

Os efeitos do campo elétrico, intensidade de ultrassom e temperatura foram avaliados, em uma segunda etapa, através de um planejamento fatorial associado ao método de superfície de resposta. Para as extrações por campo elétrico moderado, os parâmetros intensidade de campo e temperatura e a interação dos dois fatores foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) a um nível de 95% de confiança. A condição ótima de extração foi a 50 °C com aplicação de um campo de 50 V cm⁻¹ por 15 min, com rendimentos de 6,42% em saponina por grama de extrato bruto.

Para extrações com ultrassom apenas intensidade de ultrassom e temperatura se mostraram estatisticamente significantes a um nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). A condição ótima de extração foi a 50 °C com aplicação de uma intensidade de 565 W cm⁻² por 15 min, com rendimento de 6,83% em saponina por grama de extrato bruto.

Pode-se concluir com base nos resultados obtidos no presente estudo, que técnicas de disruptura celular, tais como campos elétricos e ultrassons, podem ser usadas na obtenção de saponinas a partir dos frutos de erva mate por extração com solvente e agitação mecânica.

Ambos os métodos apresentam baixo custo de equipamentos, facilidade operacional e maiores rendimentos de extrato bruto como vantagens, porém, a etapa de separação soluto-solvente é um fator crítico. A necessidade de se trabalhar com soluções aquosas nos tratamentos por campo elétrico e sua limitação de ação a materiais intactos tornam esta técnica menos recomendada para extrações de saponinas dos frutos de erva mate.

O uso de uma mistura de etanol e dióxido de carbono em estado supercrítico foi o método mais eficaz para extração seletiva de saponinas. Inicialmente, testes preliminares para determinar a influência da pressão de operação na obtenção de extratos ricos em saponinas foram conduzidos. Para frutos inteiros, a temperatura de 40 °C e usando 30% de etanol em massa, a pressão não foi um fator significativo no processo. Desta forma, a pressão de 10 MPa foi definida como pressão de trabalho para os demais ensaios experimentais.

Em uma segunda etapa, avaliaram-se os efeitos da temperatura e vazão de solvente fixando a pressão em 10 MPa através de um planejamento fatorial. A análise estatística mais uma vez não apontou os fatores como significativos nem sua interação a um nível de confiança de 95% ($p > 0,05$). O modelo de regressão linear não se mostrou adequado para descrever o comportamento do rendimento em resposta de saponinas para as condições de extração supercrítica investigadas no presente trabalho.

A extração realizada na fase preliminar, a 10 MPa foi modelada matematicamente. O modelo proposto por Sovová (1994) foi usado para descrever de forma satisfatória os dados experimentais da curva de extração de extrato bruto, apresentando coeficiente de determinação superior a 99%. Parâmetros importantes na predição do processo foram obtidos, viabilizando simulações de rendimentos de extração alterando condições experimentais. Dessa forma, o processo com fluido supercrítico é tecnicamente viável na extração de saponinas a partir dos frutos verdes de erva mate. Extração por fluido supercrítico foi a técnica mais seletiva dentre as estudadas neste trabalho (campo elétrico moderado, ultrassom e extração por fluido supercrítico), apresentando extratos com até 10,1% de saponinas, tendo como diferencial a facilidade da separação extrato-solvente, uma vez que o etanol usado como cossolvente pode ser completamente rota evaporado e reaproveitado em outras extrações.

REFERÊNCIAS

ALBERICE, J. V. et al. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 130–135, 2012.

ALMEIDA, R. N. et al. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol+water as co-solvent. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 70, p. 95–102, 2013.

ATHAYDE, M. L.; SCHENKEL, E. P. **Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Anais Do 2º Congresso Sul-Americano Da Erva-Mate. **Anais...2000**

AUGUSTIN, J. M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435–457, 2011.

AVULA, B. et al. Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum thalictroides* (L.) Michx. Using UPLC, HPLC and HPTLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 5, p. 895–903, 2011.

AZEVEDO, A. B. A. DE et al. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 543–552, 2008.

AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BARBA, F. J. et al. Trends in Food Science & Technology Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 222–228, 2015.

BARLETTE, A. G. **Avaliação química e biológica do extrato hidroetanólico de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.).** [s.l: s.n.].

BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2007.

BINOTI, M. L. Aplicação de campo elétrico pulsado de moderada intensidade na qualidade funcional de abóbora. 2012.

BITENCOURT, R. G. et al. Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 272–281, 2014.

BORGES, R. M. et al. Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their in vitro anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 96–100, 2013.

BORRE, G. et al. Comparison of Methylxanthine, Phenolics and Saponin Contents in Leaves, Branches and Unripe Fruits From *Ilex Paraguariensis* a. St.-Hil (Mate). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, n. 3, p. 362–374, 2010.

BRENNECKE, J. F.; ECKERT, C. A. Phase equilibria for supercritical fluid process design. **AIChE Journal**, v. 35, n. 9, p. 1409–1427, 1989.

BRUN, G. W. **Processo de produção de erva-mate descafeinada e de micro / nanopartículas de caféina usando dióxido de engenharia e tecnologia de materiais.** [s.l: s.n.].

CANTO, G. S. DO. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno,** 2007.

CARDOZO, E. L. et al. Selective liquid CO₂ extraction of purine alkaloids in different *Ilex paraguariensis* progenies grown under environmental influences. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6835–6841, 2007.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W. Processos de Extração Supercrítica

Aplicados a Produtos Naturais. **Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Porto Alegre: EDIPUCRS**, p. 213–228, 2008a.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G. W. Supercritical extraction of essential oil from *Ilex paraguariensis* leaves. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 3, p. 373–378, 2008b.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Analytical Applications of ultrasound. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 413, 2007.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A. et al. Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. v. 192, p. 90–97, 2016.

CHEN, Y.; XIE, M. Y.; GONG, X. F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 162–170, 2007.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16–40, 2014.

CORRALES, M. et al. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85–91, jan. 2008.

CRANK, J. The Mathematics of Diffusion, 2nd Ed. **Oxford Science Publications UK**, 1975.

DAGOSTIN, J. L. A.; CARPINÉ, D.; CORAZZA, M. L. Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 69–75, 2015.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 411–419, 2009.

DOMINGUES, R. M. A et al. Optimization of the supercritical fluid extraction of triterpenic acids from *Eucalyptus globulus* bark using experimental design. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 105–114, 2013.

DOMINGUES, R. M. A. et al. Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of Eucalyptus globulus bark: influence of the operating conditions upon yields and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 176–185, 2012.

ELEKOFEHINTI, O. O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants – A review. **Pathophysiology**, v. 22, n. 2, p. 95–103, 2015.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108–120, 2011.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199–204, 2002.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of Ilex paraguariensis fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, 2016.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of Ilex paraguariensis and related species. **Nutrition research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 06, p. 587, 2002.

GANZERA, M. et al. Separation of the major triterpenoid saponins in Bacopa monnieri by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 516, n. 1-2, p. 149–154, 2004.

GASPAR, F. et al. Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 25, n. 3, p. 247–260, 2003.

GERHARDT, M. Colonos ervateiros: história ambiental e imigração no Rio Grande do Sul. **Esboços - Revista do Programa de Pós-Graduação em História da UFSC**, v. 18, n. 25, p. 73–95, 2011.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC Method to Assay Total Saponins in Ilex paraguariensis Aqueous Extract. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 4, p. 723–

726, 2005.

GOULA, A. M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil - Kinetic modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 492–498, 2013.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339–344, 2009.

GUO, S. et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 264–70, 2011.

HA, Y. W. et al. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in *Platycodi Radix* by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, n. 1, p. 27–35, 2006.

HAO, W. et al. Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 59, n. 3, p. 316–323, 2011.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of food science**, v. 72, n. 9, p. R138–51, 2007.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Saponins**. [s.l.] Cambridge University Press, 2005.

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. v. 28, 2013.

KENTISH, S.; FENG, H. Applications of power ultrasound in food processing. **Annual review of food science and technology**, v. 5, p. 263–84, 2014.

KOTOVICZ, V.; WYPYCH, F.; ZANOELO, E. F. Pulsed hydrostatic pressure and ultrasound assisted extraction of soluble matter from mate leaves (*Ilex paraguariensis*): Experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 1–9, 2014.

KOUBAA, M. et al. Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural**

and Food Chemistry, v. 63, n. 31, p. 6835–6846, 2015.

KULSHRESTHA, S. A.; SASTRY, S. K. Changes in permeability of moderate electric field (MEF) treated vegetable tissue over time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 78–83, 2010.

KULSHRESTHA, S.; SASTRY, S. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 189–194, 2003.

KUSNADI, C.; SASTRY, S. K. Effect of moderate electric fields on salt diffusion into vegetable tissue. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 329–336, 2012.

LI, J. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 637–643, 2010.

LOGHAVI, L.; SASTRY, S. K.; YOUSEF, A. E. Effect of Moderate Electric Field Frequency and Growth Stage on the Cell Membrane Permeability of *Lactobacillus acidophilus*. 2015.

LUCAS, A. M. **Estudos sistemáticos de obtenção e impregnação supercrítica de extratos de Baccharis**. [s.l: s.n.].

LUENGO, E. et al. Effects of millisecond and microsecond pulsed electric fields on red beet cell disintegration and extraction of betanines. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 28–33, 2016.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 17-18, p. 1189–1195, 2011.

MARRONE, C. et al. Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 21, p. 3711–3718, 1998.

MELLO, D. R. DE. **Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005 ementa não**

oficial: Aprova o“ REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS”Diário Oficial da UniãoPoder Executivo, , 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/40512000474583248e6ede3fbc4c6735/informe_45.pdf?mod=ajperes>.>

MERCALI, G. D. et al. Ascorbic acid degradation and color changes in acerola pulp during ohmic heating: Effect of electric field frequency. **Journal of Food Engineering**, v. 123, n. 2014, p. 1–7, 2014.

MILGATE, J.; ROBERTS, D. C. K. The nutritional and biological significance of saponins. **Nutrition Research**, v. 15, n. 8, p. 1223–1249, 1995.

MINJARES-FUENTES, R. et al. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 179–189, 2014.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. 6 th ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010.

MOSTAFA, A. et al. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 274–280, 2013.

NARVÁEZ-FLORES, M. et al. Ultrasound assisted extraction modeling of fructans from agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul) at different temperatures and ultrasound powers. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 232–239, 2015.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. [s.l.] Editora da UNICAMP, 1995.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, n. 1, 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.

OLIVEIRA, C. F. DE et al. Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 201–208, 2015.

OLIVEIRA, S. V. DE; WAQUIL, P. D. Dinâmica de produção e comercialização da erva-mate no Rio Grande do Sul , Brasil. p. 750–756, 2015.

OPPENHEIMER, J. R.; MARTIN, A. G.; WALKER, L. P. Measurements of air-filled porosity in unsaturated organic matrices using a pycnometer. **Bioresource Technology**, v. 59, n. 2, p. 241–247, 1997.

PALMA, M. et al. Supercritical fluid extraction of grape glycosides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 775–9, 2000.

PASQUEL, A. et al. Extraction of stevia glycosides with CO₂+ water, CO₂+ ethanol, and CO₂+ water+ ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 3, p. 271–282, 2000.

PEIXOTO, M. P. G. et al. LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterisation of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) unripe fruits. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 4, p. 415–420, 2012.

PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. J. Food Hydrocolloids Beverage emulsions : Recent developments in formulation , production , and applications. **Food hydrocolloids**, v. 42, p. 5–41, 2014.

PONTILHO, DE M. P. et al. Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil) and Risk Factors for Cardiovascular Diseases. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, n. 3, p. 182–190, 2015.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E. The properties of gases and liquids. 1987.

REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. **AIChE Journal**, v. 42, n. 6, p. 1765–1771, 1996.

RUGGIERI, L. et al. Air filled porosity measurements by air pycnometry in the composting process: a review and a correlation analysis. **Bioresource technology**, v. 100, n. 10, p. 2655–

2666, 2009.

SARANG, S.; SASTRY, S. K. Diffusion and equilibrium distribution coefficients of salt within vegetable tissue: Effects of salt concentration and temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 3, p. 377–382, 2007.

SAYYAR, S. et al. Extraction of oil from *Jatropha* seeds-optimization and kinetics. **American Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1390–1395, 2009.

SCHENKEL, E. P. et al. Saponins from maté (*Ilex paraguariensis*) and other South American *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. **Ciênc. cult.(São Paulo)**, v. 49, n. 5/6, p. 359–363, 1997.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 711–740, 2003.

SEAB. Produtos Florestais - Erva-mate. n. 41, 2014.

SEGOVIA, F. J. et al. Improvements in the aqueous extraction of polyphenols from borage (*Borago officinalis* L.) leaves by pulsed electric fields: Pulsed electric fields (PEF) applications. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 390–396, 2015.

SILVA, R. P. F. F. DA; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, fev. 2016.

SIMPSON, R. et al. Diffusion mechanisms during the osmotic dehydration of Granny Smith apples subjected to a moderate electric field. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 204–211, 2015.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. modeling of extraction curves. **Chem. Eng. Sci**, v. 49, p. 409–414, 1994.

SOVOVÁ, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 1, p. 35–52, 2005.

SOVOVÁ, H. et al. Supercritical fluid extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, n. 1, p. 88–95, 2007.

SOVOVÁ, H.; KUCERA, J.; JEZ, J. Rate of vegetable oil extraction with supercritical CO₂ - II. Extraction of grape seed oil. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 3, p. 415–420, 1994.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219–243, 2004.

TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004.

TAKETA, A. T. C. **Phytochemical Investigation on the Triterpenes and Triterpenoid Glycosides from the Fruits and Leaves of South American Ilex Species**, 2001.

TANAKA, O. et al. Application of saponins in foods and cosmetics: Saponins of Mohave yucca and *Sapindus mukurossi*. In: **Saponins used in food and agriculture**. [s.l.] Springer, 1996. p. 1–11.

TAO, Y.; ZHANG, Z.; SUN, D. W. Experimental and modeling studies of ultrasound-assisted release of phenolics from oak chips into model wine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1839–1848, 2014.

TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction**. [s.l.] Wiley-Interscience, 1996. v. 4

VALDUGA, E. et al. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adultração do mate. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 1997.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Impact of high-intensity pulsed electric fields on carotenoids profile of tomato juice made of moderate-intensity pulsed electric field-treated tomatoes. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3131–8, 2013.

VARGAS, R. M. F. et al. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 3, p. 375–382, 2006.

VELIČKOVIĆ, D. T. et al. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. **Ultrasonics**

Sonochemistry, v. 13, n. 2, p. 150–156, 2006.

VILKHU, K. et al. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161–169, 2008.

VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. **Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials**. New York: Springer, 2008.

VOROBIEV, E.; LEOVKA, N. I. Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In: **Pulsed electric fields technology for the food industry**. [s.l.] Springer, 2006. p. 153–193.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. [s.l.] CRC Press, 2008.

WANG, J. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804–810, 2008.

WANG, W. et al. Quantification of saponins in *Dioscorea panthaica* Prain et Burk rhizomes with monolithic column using rapid resolution liquid chromatography coupled with a triple quadruple electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 71, p. 152–156, 2012.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093–8105, 1 out. 2005.

WOJCIECHOWSKI, K. et al. Effect of β -casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 208–216, 2014.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 4, p. 347–352, 2001.

YANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Food Hydrocolloids Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. **Food hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 712–720,

2013.

ZANON, A. **CIRCULAR TÉCNICA Nº 16 ISSN 0101-1847 PRODUÇÃO DE SEMENTES DE ERVA MATE** Curitiba EMBRAPA - CNPF, , 1988.

ZHANG, T. et al. Qualitative and quantitative analysis of steroidal saponins in crude extracts from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and *P. polyphylla* var. *chinensis* by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 1, p. 114–124, 2010.