RENATA VARDANEGA

OBTENÇÃO DE SAPONINAS DE RAÍZES DE GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia glomerata*) POR EXTRAÇÃO DINÂMICA A BAIXA PRESSÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

CAMPINAS
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA VARDANEGA

OBTENÇÃO DE SAPONINAS DE RAÍZES DE GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia glomerata*) POR EXTRAÇÃO DINÂMICA A BAIXA PRESSÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Co-orientador: Dr. Diego Tresinari dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA VARDANEGA E ORIENTADA PELA PROFA. M. ANGELA A. MEIRELES

Assinatura do Orientador

_____

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Vardanega, Renata.

V423o Obtenção de saponinas de raízes de ginseng brasileiro (Pfaffia glomerata) por extração dinâmica a baixa pressão assistida por ultrassom / Renata Vardanega. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Angela de Almeida Meireles.
Coorientador: Diego Tresinari dos Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ginseng brasileiro (Pfaffia glomerata).
2. Saponinas. 3. Extração dinâmica a baixa pressão.
4. Ultrassom. 5. Beta-ecdisona. I. Meireles, Maria Angela de Almeida, 1953- II. Santos, Diego Tresinari dos.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título em inglês: Obtaining saponins from Brazilian ginseng roots (Pfaffia glomerata) by dynamic low-pressure solvent extraction assisted by ultrasound
Palavras-chave em inglês:
Brazilian ginseng (Pfaffia glomerata)
Saponin
Dynamic low pressure extraction
Ultrasound
Beta-ecdysone
Área de concentração: Engenharia de Alimentos
Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos
Banca examinadora: Maria Angela de Almeida Meireles [Orientador]
Cintia Bernardo Gonçalves
Juliana Martin do Prado
Data da defesa: 22-02-2013
Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
Orientadora

Profa Dra. Cintia Bernardo Gonçalves
Membro titular
FZEA/USP

Dra. Juliana Martin do Prado
Membro titular
DEA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
Membro suplente
DEPAN/FEA/UNICAMP

Dr. Paulo Roberto Nogueira Carvalho
Membro Suplente
ITAL

Aos meus pais, Norberto e Nilsa,
e ao meu irmão querido, Roberto,
que me incentivam todos os dias a seguir,
sempre em frente, na busca pelos nossos ideais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui com confiança e alento;

À Dra. Maria Angela de Almeida Meireles, por me acolher sob sua orientação e proporcionar crescimento profissional e pessoal de inestimável valor, através das oportunidades concedidas, da confiança depositada e, acima de tudo, de seu exemplo como pesquisadora;

Ao Dr. Diego Tresinari dos Santos, pela paciência e disponibilidade irrestrita para me auxiliar e incentivar durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

À UNICAMP, por oferecer toda estrutura necessária para a realização deste trabalho;

À CAPES, pelo auxílio financeiro (PROEX) que proporcionou a participação no 16º Congresso Internacional de Ciência e Tecnologia de Alimentos- IUFoST, em Foz do Iguaçu, PR.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro recebido (09/17234-9);

À Dra. Gláucia Maria Pastore, por disponibilizar seu laboratório para a realização de análises referentes a este trabalho;

Aos membros da banca, pela atenção dedicada a este trabalho e pela valiosa contribuição;

Ao Ariovaldo Astini, pela amizade, paciência e auxílio diário no laboratório e aos amigos e colegas do LASEFI, especialmente ao Giovani e ao Moysés, pelas horas agradáveis que passamos dentro e fora do laboratório.

À querida Bebel, por ser alegria e confiança todos os dias no LASEFI;

Aos queridos Guilherme e Alessandro, por serem casa, amizade e companheirismo;

À prima-irmã Carla, por ser luz no meu caminho;

Aos meus pais que, mesmo longe, são força e inspiração todos os dias da minha vida e me fazem crer que os sonhos são possíveis quando se busca com fé;

À família Abdalla, por me acolher como filha e ser uma segunda família pra mim, especialmente ao meu querido Francisco, por acreditar em mim e me fazer acreditar que esta conquista é só o começo do que podemos ser;

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTORA: Renata Vardanega
TÍTULO: Obtenção de saponinas de raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) por extração dinâmica a baixa pressão assistida por ultrassom.
ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
CO-ORIENTADOR: Dr. Diego Tresinari dos Santos

RESUMO

Espécies do gênero *Pfaffia* (Amaranthaceae) têm sido comercializadas como substitutas para *Panax* (ginseng, Araliaceae) e em função da morfologia similar de suas raízes são popularmente conhecidas como ginseng brasileiro. Dentre as espécies de *Pfaffia* conhecidas, a *Pfaffia glomerata* é a mais importante, uma vez que esta é a única que possui o composto β-ecdisona, o qual representa a saponina de maior interesse desta planta, devido a seus efeitos terapêuticos. Atualmente, cápsulas contendo extratos de *P. glomerata* são comercializadas sob indicação de auxiliar da memória e tônico. Além destas indicações, as raízes desta planta apresentam teores expressivos de saponinas (10-17%), o que faz com que o extrato das raízes de *P. glomerata* apresente um grande potencial para aplicação como emulsificante/surfactante. Comercialmente, extratos de *P. glomerata* são obtidos por percolação em leito fixo, no entanto, com baixos rendimentos. O objetivo deste estudo foi obter um extrato de ginseng brasileiro (*P. glomerata*) rico em saponinas empregando o processo de extração por percolação a baixa pressão, o qual é um processo de extração já estabelecido comercialmente, sob a assistência do ultrassom, que vem se destacando como uma técnica emergente na melhoria de processos de extração. Deste modo, as variáveis resposta estudadas foram o rendimento global de extração (X_0) e as propriedades emulsificantes/surfactantes dos extratos obtidos: Índice de emulsificação (E_{24}) e redução da tensão superficial da água (RTSA)*;* os parâmetros

avaliados foram: método de extração (percolação, PE; percolação assistida por ultrassom durante toda extração, PEU; percolação assistida por ultrassom durante o início da extração, PEUI e percolação assistida por ultrassom com pulsos, PEUP), temperatura (40 e 60°C) e solventes (água; etanol:água [35:65, v/v]; etanol:água [70:30, v/v], isopropanol:água [35:65, v/v] e isopropanol:água [70:30, v/v]). As condições de extração que proporcionaram maiores valores de X_0 (62,8%), E_{24} (54,4%) e RTSA (36,3%) foram água, 60°C, PEUP; isopropanol:água (70:30, v/v), 60°C, PEUP e isopropanol:água (70:30, v/v), 60°C, PEUI, respectivamente. Estas condições foram selecionadas para estudo cinético e obtenção de parâmetros cinéticos ajustados que mostraram que, quando água foi empregada como solvente de extração sob ultrassom, obteve-se a maior recuperação de extrato com menor t_{CER} (período de taxa de extração constante). Portanto, a condição de extração com água, 60°C, PE, representa a condição ótima em termos de rendimento. Ainda, realizou-se a quantificação do teor de β-ecdisona nos extratos obtidos nas cinéticas, onde obteve-se ~11-14% (base seca) de β-ecdisona nos extratos das raízes de *P. glomerata.* A condição de extração que proporcionou os extratos com maior teor de β-ecdisona foi a isopropanol:água (70:30), 60°C, PEUI, comprovando a maior seletividade de extração da mistura de solventes isopropanol:água (70:30, v/v), já que este foi também o solvente que apresentou extratos com maiores propriedades surfactantes. Portanto, pode-se concluir que ao final deste estudo, ao empregar o método de percolação em leito fixo assistida por ultrassom no início da extração utilizando isopropanol:água (70:30) como solvente de extração a 60°C, obteve-se uma condição de extração otimizada que fornece extratos das raízes de *P. glomerata* com alta recuperação de compostos bioativos.

Palavras- chave: Ginseng brasileiro, *Pfaffia glomerata,* saponinas, β- ecdisona, extração dinâmica a baixa pressão, ultrassom.

MASTER THESIS

AUTHOR(A): Renata Vardanega
TITLE: Obtaining saponins from Brazilian ginseng roots (*Pfaffia glomerata*) by dynamic low-pressure solvent extraction assisted by ultrasound.
MAJOR PROFESSOR: Maria Angela de Almeida Meireles
CO-MAJOR PROFESSOR: Diego Tresinari dos Santos

ABSTRACT

Species of the genus *Pfaffia* (Amaranthaceae) have been commercialized as substitute to *Panax* (ginseng, Araliaceae). Due to the similar morphology of its roots to those of ginseng, they are popularly known as Brazilian ginseng. Among the species of *Pfaffia*, the *P. glomerata* is the most important because it is the only one that contains β- ecdysone; which is the most important saponin from this plant due their therapeutic effects. Nowadays, capsules containing *P. glomerata* roots extracts are commercialized under indication to of improving the memory and as a tonic. Besides these indications, the *P. glomerata* roots exhibit expressive saponins content (10-17%); therefore, its extract can potentially be used as an emulsifier/ surfactant. Commercially, *P. glomerata* roots extracts are obtained by low-pressure solvent extraction in fixed bed extractors, however, with low yields. The aim of this study was to obtain an extract from Brazilian ginseng roots (*P. glomerata*) rich in saponins applying the process of low-pressure solvent extraction, which is an extraction process commercially established, assisted by ultrasound ; ultrasound assisted extraction is an emerging technique used to improve extraction process. The effects of the following parameters were evaluated on the overall extraction yield (X_0) and surfactant properties (Emulsification index, E_{24} and reduction of water surface tension, RTSA) of *P. glomerata* roots extracts: extraction method (percolation, PE; ultrasound assisted percolation during the entire process, PEU; ultrasound assisted percolation at the

beginning of the process, PEUI and ultrasound assisted percolation with pulses, PEUP), temperature (40 and 60°C) and extracting solvents (water, ethanol:water [35:65], ethanol:water [70:30], isopropanol:water [35:65] and isopropanol:water [70:30]). The extraction conditions that provided higher values to X_0 (water, 60°, PEUP), E_{24} (isopropanol:water [70:30], 60°C, PEUP) and RTSA (isopropanol:water [70:30], 60°C, PEUI) were selected for the kinetic study; the kinetic parameters were estimated fitting the experimental data to a linear spline with 3 straight lines. The kinetic parameters showed that when water was used as extracting solvent assisted by ultrasound, the higher extract recovery was obtained with the shortest t_{CER} (constant extraction rate period). Therefore, the extraction condition with water, 60°C, PEUP is the optimum condition with respect to the X_0. The content of β-ecdysone was evaluated on the extracts obtained from kinetic study. The content of β-ecdysone in the *P. glomerata* roots extracts were ~ 11-14% (dry base, d.b.). The extraction condition that provided the higher extraction of β-ecdysone was that using isopropanol:water [70:30], 60°C, PEUI; the extracts with the best surfactant properties were obtained in this extracting condition . Therefore, it was concluded that applying ultrasound at the beginning of process using $IsoC_3OH$:water (70:30) as extracting solvent at 60°C, was the optimized extraction condition to obtain extracts from *P. glomerata* roots .

Keywords: Brazilian ginseng, *P. glomerata*, saponin, β-ecdysone, low pressure solvent extraction, ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Esquema de um extrator por percolação em leito fixo 9

Figura 3. 2: Ondas ultrassônicas e suas propriedades 12

Figura 3. 3: Esquema de extração em banho ultrassônico 15

Figura 3. 4: Esquema de extrator com sonda ultrassônica 15

Figura 3. 5: Gingeng brasileiro (*Pfaffia glomerata*): (a) partes aéreas (Fotografia tirada no campo experimental do CPQBA, Campinas, SP); (b) raízes 18

Figura 3.6: Compostos isolados e identificados a partir do extrato metanólico das raízes de ginseng brasileiro (*P. glomerata*). Fonte: NAKAMURA *et al.* (2010) 19

Figura 3.7: Estruturas das agliconas presentes em saponinas: (a) triterpênica; (b) esteroidal. Fonte: Adaptado de GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA (2007). 21

Figura 3.8: Estrutura química da β-ecdisona. Fonte: adaptado de Zimmer *et al.* (2006). ..22

Figura 3.9: Representação gráfica da relação entre a tensão superficial e concentração de surfactante em meio aquoso. 25

Figura 4.1: Diagrama de fluxo das atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho. 27

Figura 4.2:Esquema do aparato de percolação assistida por ultrassom 31

Figura 4.3: Preparo do leito de extração contendo a matéria-prima e o material inerte.....34

Figura 5.1: Análise gráfica dos efeitos principais dos parâmetros estatisticamente significativos (solvente) sobre o rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata*. Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) IsoC_3OH:água (35:65); (5) IsoC_3OH:água (70:30) 44

Figura 5.2: Análise gráfica dos efeitos principais do parâmetro estatisticamente significativo sobre o índice de emulsificação (E_{24}) dos extratos das raízes de *P. glomerata.* Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) IsoC_3OH:água (35:65); (5) IsoC_3OH:água (70:30). 48

Figura 5.3: Análise gráfica dos efeitos de interação dos parâmetros estatisticamente significativos sobre a RTSA dos extratos das raízes de ginseng brasileiro. Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) IsoC_3OH:água (35:65); (5) IsoC_3OH:água (70:30). Métodos: (PE) Percolação; (PEU): Percolação assistida por ultrassom; (PEUI) Percolação assistida por ultrassom durante o início da extração; (PEUP) Percolação assistida por ultrassom com pulsos.....52

Figura 5. 4: Estrutura química dos surfactantes da família dos Tweens: (a) Tween 20; (b) Tween 80. 53

Figura 5.5: Relação entre o teor de proteínas extraídas com solventes de diferentes polaridades e sua capacidade de RTSA. Rótulos de dados: 1: IsoC_3OH:água (70:30); 2: EtOH:água (70:30); 3: IsoC_3OH:água (35:65); 4: EtOH:água (35:65) 5: água. 55

Figura 5.6: Relação entre o teor de proteínas extraídas com solventes de diferentes polaridades e os valores de E_{24}. Rótulos de dados: 1: IsoC_3OH:água (70:30); 2: EtOH:água (70:30); 3: IsoC_3OH:água (35:65); 4: EtOH:água (35:65) 5: água. 56

Figura 5.7: Curvas de extração das raízes de *P. glomerata* utilizando IsoC_3OH:água (70:30) como solvente, 60°C e PEUP (Cinética I) e PEUI (Cinética II) como método de extração. 58

Figura 5.8: Curvas de extração das raízes de *P. glomerata* utilizando água como solvente, 60°C e PEUP (Cinética III) e PE (Cinética IV) como método de extração. 59

Figura 5. 9: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando IsoC_3OH:água (70:30), 60°C e PEUP como método de extração (Cinética I). ..60

Figura 5. 10: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando IsoC_3OH:água (70:30), 60°C e PEUI como método de extração (Cinética II)....61

Figura 5. 11: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando água, 60°C e PEUP como método de extração (Cinética III).....61

Figura 5. 12: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando água, 60°C e PE como método de extração (Cinética IV) 62

Figura 5. 13: Curvas de extração de β-ecdisona das raízes de *P. glomerata* em diferentes condições de operação. Cinética I: PEUP, 60°C, IsoC_3OH:água (70:30); Cinética II: PEUI, 60°C, IsoC_3OH:água (70:30); Cinética III: PEUP, 60°C, água e Cinética IV: PE, 60°C, água. 64

Figura 5.14: Emulsões obtidas na análise de E_{24} após 48h nas seguintes condições de extração: (a) IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUI e (b) água, 60ºC, PEUP.....65

Figura 9. 1: Exemplo de cromatograma do extrato das raízes de *P. glomerata.* Extrato obtido sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30); 60°C, PEUI coletado aos 2 min de extração. (a) Cromatograma obtido a 254nm; (b) Cromatograma obtido a 280nm e (c) Cromatograma obtido a 320nm. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Aplicações industriais das saponinas provenientes de diferentes fontes.....23

Tabela 4.1: Variáveis estudadas e suas respectivas condições experimentais 32

Tabela 4. 2: Matriz experimental das condições de extração estudadas. 33

Tabela 5. 1: Caracterização das raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) 41

Tabela 5.2: Rendimento global de extração (X_0), índice de emulsificação (E_{24}), redução da tensão superficial da água (RTSA) e teor de proteínas totais em função das condições de extração 42

Tabela 5.3: Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata*. 44

Tabela 5.4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos estudados sobre o índice de emulsificação (E_{24}) dos extratos obtidos das raízes de *P. glomerata.* 47

Tabela 5.5: Polaridade dos solventes estudados segundo Snyder *et al.*(1993).....49

Tabela 5.6: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos estudados sobre a capacidade de redução da tensão superficial da água dos extratos obtidos das raízes de *P. glomerata*..51

Tabela 5.7: Condições de extração empregadas nas cinéticas 57

Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos ajustados para as curvas de extração das raízes de ginseng brasileiro.....62

Tabela 9.1: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-a sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUP. 89

Tabela 9.2: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-b sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUP. 90

Tabela 9. 3: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-c sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUP. 91

Tabela 9. 4: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-a sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI. 92

Tabela 9. 5: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-b sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI. 93

Tabela 9. 6: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-c sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI. 94

Tabela 9. 7: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-a sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP. 95

Tabela 9. 8: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-b sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP. 96

Tabela 9. 9: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-c sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP. 96

Tabela 9. 10: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-a sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.....97

Tabela 9. 11: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-b sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.....97

Tabela 9. 12: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-c sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.....98

Tabela 9. 13: Teor de β-ecdisona dos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos em diferentes condições de operação nas cinéticas: I ($IsoC_3OH$:água [70:30] 60°C, PEUP); II ($IsoC_3OH$:água [70:30] 60°C, PEUI); III (água, 60°C, PEUP) e IV (água, 60°C, PE). 99

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 5
2.1 Objetivo geral 5
2.2 Objetivos específicos 5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3.1 Extração a partir de matrizes vegetais 7
3.1.1 Extração por percolação em leito fixo 9
3.2 Extração assistida por ultrassom 10
3.2.1 Aspectos gerais da extração assistida por ultrassom 11
3.3 Matéria-prima vegetal 16
3.3.1 Ginseng brasileiro 16
3.3.2. Saponinas 20
3.3.2.1 Estrutura química 20
3.3.2.2 Aplicação e propriedades das saponinas 22
3.3.2.3 Extração de saponinas de matrizes vegetais 25
4. MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1 Matéria-prima 28
4.1.1 Origem 28
4.1.2 Preparo 28
4.1.3 Caracterização 29
4.1.3.1 Diâmetro médio de partícula 29
4.1.3.2 Umidade 29
4.1.3.3 Densidade aparente, real e porosidade 30
4.2 Aparato de extração por percolação em leito fixo 31
4.3 Seleção das condições de extração 32
4.3.1 Planejamento experimental 32
4.3.1.1 Preparo do leito e procedimento de extração 34
4.3.1.2 Cálculo do rendimento global (X_0) 35
4.3.2 Experimentos cinéticos 36
4.4 Análises dos extratos 37
4.4.1 Determinação do teor de proteínas totais 37

4.4.2 Índice de emulsificação (E_{24}) 38
4.4.3 Redução da tensão superficial da água (RTSA) 38
4.4.4 Quantificação de β-ecdisona 39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1 Caracterização da matéria-prima 41
5.2 Influência dos parâmetros estudados no rendimento global de extração (X_0) 41
5.3 Influência dos parâmetros nas propriedades emulsificantes dos extratos 47
5.3.1 Índice de Emulsificação (E_{24}) 47
5.3.2 Redução da tensão superficial da água (RTSA) 50
5.3.3 Interação entre saponinas-proteínas nas propriedades emulsificantes dos extratos 54
5.4 Otimização do processo de extração por percolação em leito fixo das raízes de *P. glomerata* 56
5.4.1 Cinéticas de extração 56
5.4.1.1 Determinação dos parâmetros cinéticos 59
5.4.1.2 Quantificação de β-ecdisona 63
6. CONCLUSÕES 69
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 71
8. REFERÊNCIAS 73
9. ANEXOS 89
9.1 Resultados experimentais 89
9.1.1 Cinéticas de extração 89
9.1.5 Teor de β-ecdisona 99
9.2 Ajuste das curvas de extração 101
9.3 Atividades acadêmicas 102
9.3.1 Artigos aceitos para publicação 102
9.3.2 Capítulos de livro aceitos para publicação 102
9.3.3 Trabalhos completos em Congressos 103
9.3.4 Resumos publicados em Congressos 103

1. INTRODUÇÃO

As raízes de *Panax ginseng* C. A. Meyer (Araliacea), conhecidas como ginseng coreano, correspondem a uma das plantas mais utilizadas em todo mundo na medicina popular. Diversos estudos já foram reportados evidenciando sua composição química, toxicologia, farmacologia e propriedades terapêuticas, destacando seus efeitos positivos sobre aprendizagem, memória e capacidade física em animais e humanos, (VIGO *et al.*, 2004).

No Brasil, diversas espécies do gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, são comercializadas como ginseng brasileiro, as quais são consideradas substitutas do ginseng coreano (gênero *Panax*) devido a suas propriedades farmacológicas similares (NETO *et al.*, 2005). Dentre as espécies de *Pfaffia*, a *P. glomerata* apresenta grande importância medicinal e comercial, pois suas raízes apresentam efeitos adaptógenos, tônicos e afrodisíaco. Estes efeitos são atribuídos à presença de compostos bioativos como as saponinas, em especial ao composto β-ecdisona, nas raízes da planta (FLORES *et al.*, 2009). Além dos efeitos descritos acima, as saponinas encontram aplicação industrial como surfactante e emulsificante naturais em função das características hidrofílicas e hidrofóbicas da sua molécula (OLESZEK e HAMED, 2010).

Embora o ginseng brasileiro já venha sendo comercializado devido a seus efeitos sobre o aprendizado e a memória e esteja entre os maiores volumes de venda da indústria nacional de fitoterápicos, o potencial surfactante das saponinas presentes na sua composição ainda é pouco explorado. Comercialmente, o ginseng brasileiro é acessível sob a forma de cápsulas contendo raízes em pó, misturadas ou não com extratos

etanólicos desta planta obtidos por métodos convencionais – por exemplo, Soxhlet (MATSUZAKI *et al.*, 2003).

Métodos de extração sólido-líquido, como a percolação, são largamente aplicados para obtenção de extratos vegetais por serem de fácil operação e baixo custo de instalação. A extração por percolação ainda possibilita a seleção/controle da temperatura, não exerce grandes efeitos mecânicos sobre a matriz sólida, uma vez que não há mobilidade do leito e não necessita de uma etapa de filtração posterior (VEGGI, 2009). Porém, este método apresenta baixos rendimentos, o que pode ser contornado pelo uso de agentes que melhorem a eficiência de extração, como é o caso da aplicação de micro-ondas, ultrassom, entre outros.

Os efeitos das ondas de ultrassom em processos extrativos tornam seu uso atrativo para obtenção de extratos naturais com maiores rendimentos, pois promovem um aumento da taxa de transferência de massa através da ruptura da parede celular e consequente favorecimento da penetração do solvente na matriz vegetal e liberação do extrato (TOMA *et al.*, 2001). Esses efeitos são resultado da cavitação provocada pelos ciclos de expansão e contração da matéria causados durante a propagação da onda ultrassônica (VINATORU, 2001; TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Para países em desenvolvimento, como o Brasil, agregar valor à matéria-prima cultivada em território nacional processando-a com uma tecnologia ecologicamente correta representa a possibilidade de aumentar sua competitividade no mercado global de produtos naturais. O estudo de plantas nativas e adaptáveis ao cultivo brasileiro proporciona um conhecimento aplicável ao desenvolvimento auto-sustentável de comunidades locais, além da exploração da biodiversidade da flora nacional (MEIRELES, 2008).

Assim, tendo em vista as propriedades dos extratos de raízes de ginseng brasileiro, estes podem ser largamente usados como ingredientes na indústria de

alimentos, cosmética e farmacêutica. Neste contexto, o estudo de diferentes métodos de extração para obtenção de extratos com alta qualidade e que não gerem resíduos tóxicos é promissor, pois as informações acerca dos processos extrativos de ginseng brasileiro ainda são escassas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter extrato de raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) rico em saponinas empregando o processo de percolação em leito fixo assistida por ultrassom.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do método de extração, da temperatura e do tipo de solvente sobre o rendimento e as propriedades emulsificantes/surfactantes dos extratos das raízes de *P. glomerata*;
- Avaliar possíveis efeitos sinérgicos entre os constituintes dos extratos das raízes de *P. glomerata* sobre as suas propriedades emulsificantes/surfactantes*;*
- Realizar estudo cinético para obter parâmetros de processo otimizados em relação ao rendimento global de extração e propriedades emulsificantes/surfactantes dos extratos das raízes de *P. glomerata*.
- Avaliar o teor de β-ecdisona nos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos nas condições de extração estudadas nas cinéticas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Extração a partir de matrizes vegetais

Ao longo dos últimos anos, a população tem demonstrado maior preocupação em relação à qualidade e segurança de alimentos, regulamentos acerca dos níveis nutritivos e de toxicidade relacionados aos alimentos e, com isso, tem aumentado o interesse por produtos naturais. Ainda, outro fator associado, é a crença de que tudo que é "natural" é bom, o que promove o crescimento da indústria de produtos naturais, principalmente para aplicações na indústria farmacêutica, de alimentos e perfumaria (LEAL *et al.*, 2011).

Para o processo de recuperação dos compostos bioativos presentes em produtos naturais, a etapa de extração se destaca como uma das mais importantes. Existem, na literatura, várias metodologias de obtenção de extratos vegetais, utilizando vários solventes, empregando ou não altas pressões e temperaturas ou até mesmo associando metodologias no intuito de obter um ou mais extratos com perfil fitoquímico desejável, com alto rendimento e que não possua características indesejáveis como a presença de compostos co-extraídos e a presença residual de solventes (BRAGA, 2005).

Comumente, extratos vegetais ricos em compostos bioativos são obtidos por métodos convencionais de extração sólido-líquido, tais como Sohxlet, agitação, percolação em leito fixo, maceração, entre outros. Estas técnicas tradicionalmente utilizadas para extração de compostos a partir de vegetais são, em sua maioria, baseadas na escolha de um solvente apropriado e emprego de calor e/ou agitação para aumentar a solubilidade dos analitos e as taxas de transferência de massa (POIROT *et al.*, 2006; KIM, *et al.*, 2007).

O rendimento da extração de compostos a partir de plantas é influenciado pelas condições em que o processo é realizado. A escolha do processo mais adequado depende de parâmetros como temperatura, ação mecânica (agitação) e tipo do solvente empregado (TAKEUCHI *et al.*, 2009). Além destes parâmetros de processo, há os fatores ligados à matriz vegetal que também influenciam na extração. A matriz vegetal apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. Adicionalmente, o rendimento de extração também depende da estrutura molecular do soluto, tamanho, localização e a interação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição distintas de cada planta asseguram que cada sistema matriz vegetal-solvente apresentem comportamento peculiar, o qual não pode ser facilmente previsto (VEGGI, 2009). Portanto, o estudo do comportamento de cada sistema se faz relevante para a obtenção das substâncias de interesse a partir de matrizes vegetais.

A seleção do solvente de extração mais adequado ao processo que se pretende desenvolver deve considerar características como a seletividade e capacidade de dissolver o soluto, assim como a tensão interfacial, viscosidade, estabilidade, reatividade, toxicidade e custo. Em relação à toxicidade, a FDA (*Food and Drugs Administration*) classifica os solventes em 3 classes, onde os solventes da Classe 3 são aceitáveis em alimentos com percentagens residuais baixas e os solventes da Classe 1 são inaceitáveis em alimentos. Os solventes classificados como Classe 2, podem ser usados sob condições específicas e apresentam limitações para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos devido à toxicidade inerente (FDA, 2003)

3.1.1 Extração por percolação em leito fixo

Dentre os métodos convencionais de extração comumente empregados, o por percolação em leito fixo é um dos métodos mais utilizados para obtenção de compostos bioativos em extratos líquidos (HANDA, 2008). Neste processo a matriz vegetal, geralmente na forma de pó ou partículas finas, é empacotada no percolador e o solvente escoa pelo leito penetrando na matriz vegetal carreando o extrato para fora da partícula. A percolação também pode ser operada com recirculação do solvente através do leito para diminuir o consumo de solvente. (SINGH, 2008; TAKEUCHI *et al.*, 2009) (Figura 3.1).

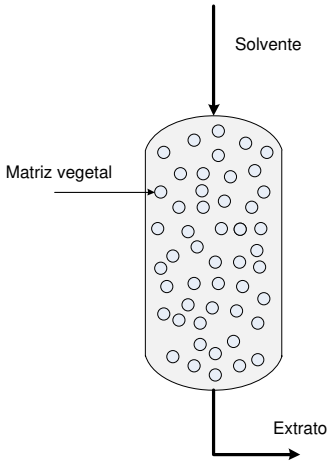


Figura 3.1: Esquema de um extrator por percolação em leito fixo

A extração por percolação pode operar em modo batelada ou semi-contínuo. Como a matriz sólida pode ser tratada como um pseudo-sistema binário contendo o soluto (uma mistura de substâncias) e o sólido inerte (uma mistura de celulose, lignina, amido, entre outros), o equilíbrio verdadeiro entre a matriz sólida e o solvente nunca é alcançado. Ao invés disso, uma solução diluída é obtida e um equilíbrio prático é definido. Para a

operação em batelada, o sólido permanece em contato com o líquido até que as concentrações de equilíbrio prático sejam atingidas (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

O processo de extração por percolação é simples, de fácil operação e possui como característica o reduzido tratamento mecânico do material sólido devido à ausência de mobilidade do leito (LEAL *et al.*, 2011). No entanto, a percolação, assim como os demais métodos aplicados tradicionalmente na indústria para obtenção de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais são pouco eficientes, uma vez que muitas toneladas de matéria-prima são necessárias para se obter alguns quilogramas dos compostos de interesse e utilizam grandes quantidades de solventes, limitando assim a compatibilidade ambiental da produção. Além disso, requerem um longo tempo de extração e, consequentemente, possuem um elevado custo econômico (POIROT *et al.*, 2006; KIM, *et al.*, 2007).

Embora a extração seja uma das etapas mais importantes na maioria dos processos de produção de extratos vegetais, houve um progresso relativamente lento nesta área nas últimas décadas e, basicamente, os processos utilizados atualmente pela indústria estão obsoletos, uma vez que não houve esforços sérios para o desenvolvimento racional de sistemas de extração avançados na última década. Entretanto, a perspectiva sobre estes processos está mudando devido ao desenvolvimento de tecnologias modernas, como a extração assistida por ultrassom ou micro-ondas e extração com fluidos pressurizados, entre outras. Neste trabalho daremos especial atenção aos processos de extração assistidos por ultrassom.

3.2 Extração assistida por ultrassom

Recentemente, as técnicas de extração assistidas por ultrassom vêm sendo aplicadas na indústria de alimentos para obtenção de diversos compostos bioativos como

antioxidantes (SANTOS *et al.*, 2010), óleo essencial (BENELLI *et al.*, 2010), ginsenosídeos (LUO *et al.*, 2007), entre outros (TOMA *et al.*, 2001).

3.2.1 Aspectos gerais da extração assistida por ultrassom

As ondas ultrassônicas são ondas mecânicas cuja frequência é acima da sensibilidade da audição humana, em torno de 20kHz (Figura 3.2). Como estas são ondas mecânicas, necessitam de um meio físico para se propagar como sólidos, líquidos e gases (MULET *et al.*, 2002). As ondas ultrassônicas são caracterizadas por alguns parâmetros, como frequência, comprimento de onda, velocidade de propagação e amplitude. A frequência (*f*) é definida como a quantidade de ciclos que ocorre em um segundo e é medida em Hertz (1Hz = $1s^{-1}$). O comprimento da onda (L_o) de ultrassom é dado como o comprimento do espaço pelo qual um ciclo ocorre e é expresso em milímetros (mm). A velocidade de propagação da onda (v) é definida como sendo a velocidade com que a onda se move através do meio e é dada pelo produto matemático entre a frequência e o comprimento da onda (Equação 3.1) (HALLIDAY *et al.*, 2012).

$$v\ (mm.\mu s^{-1}) = f(MHz) \times L_o(mm) \qquad \text{(Equação 3.1)}$$

A amplitude (A) mede a extensão do movimento vibratório medido a partir da posição central até uma das extremidades. Este parâmetro está diretamente associado à intensidade do ultrassom e é o parâmetro utilizado para classificar as aplicações em ultrassom de baixa intensidade (*LIU- Low-Intesity Ultrasound*) com menos de 1 $W.cm^{-2}$ e ultrassom de alta intensidade (*HIU- High-Intensity Ultrasound*) com 10-1000 $W.cm^{-2}$. Ultrassom de alta intensidade é aplicado em altas frequências para modificar processos

ou produtos através da ruptura de tecidos, enquanto que ultrassom de baixa intensidade é utilizado para monitoramento da qualidade de processos e produtos (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

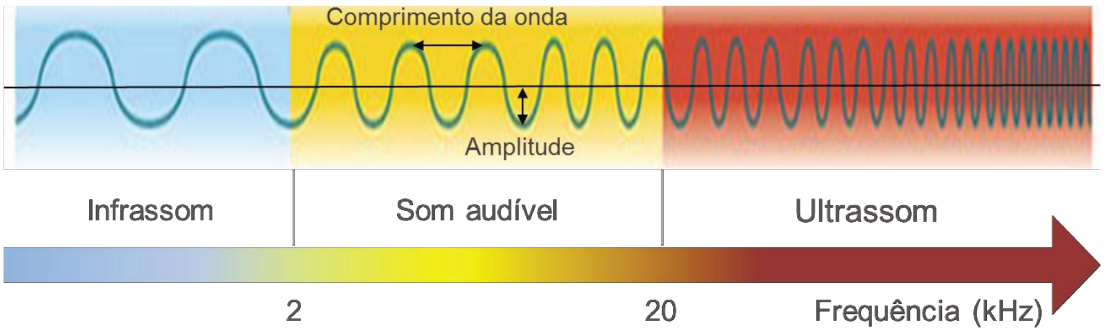


Figura 3. 2: Ondas ultrassônicas e suas propriedades

A melhoria da eficiência de extração de compostos orgânicos devido ao emprego de ultrassom é atribuída ao fenômeno de cavitação produzido no solvente pela passagem de ondas ultrassônicas (ROSTAGNO *et al.*, 2009). Os efeitos causados pelas ondas ultrassônicas na matéria são os ciclos de compressão e expansão durante a propagação da onda. A expansão leva à formação de bolhas de cavitação e o aumento da temperatura e pressão causado pela compressão leva ao colapso da bolha, resultando em uma "onda de choque" que passa através do solvente provocando um efeito mecânico de agitação (WANG e WELLER, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2009). Quando uma bolha colapsa perto de uma superfície sólida, formam-se jatos de solvente a alta velocidade assimetricamente, provocando danos à estrutura celular, aumentando a penetração do solvente de extração para dentro da célula e aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida. Este efeito associado à transferência de massa aumentada e ao rompimento das células aumenta a liberação dos compostos intracelulares para o meio (ROSTAGNO *et al.*, 2009). Outro efeito deste tipo de onda sobre a estrutura do material

sólido é que o ultrassom pode facilitar o inchamento e absorção de solvente, causando um aumento no tamanho dos poros da parede da célula. Este efeito auxilia o processo de difusão e também aumenta a transferência de massa (VINATORU, 2001).

Com a diminuição na pressão de vapor da mistura, há um aumento na intensidade de implosão, o que acarreta aumento da energia ultrassônica produzida pela cavitação. Embora as cavidades sejam formadas mais facilmente com um solvente que tenha alta pressão de vapor, baixa viscosidade e tensão superficial, a intensidade de cavitação aumenta para solventes com baixa pressão de vapor, alta viscosidade e tensão superficial (TAKEUCHI *et al.*, 2009). A frequência do ultrassom exerce influência significante sobre o rendimento e cinética de extração. Entretanto, esta influência é dependente da estrutura do material e do composto a ser extraído (WANG e WELLER, 2006; TAKEUCHI *et al.*, 2009).

A distribuição das ondas ultrassônicas dentro do extrator é também fator chave no projeto de um extrator ultrassônico. O poder de ultrassom máximo é observado na vizinhança da superfície geradora das ondas de ultrassom e a intensidade diminui abruptamente conforme a distância da superfície radiante aumenta (WANG e WELLER, 2006).

A intensidade do ultrassom também é aumentada na presença de partículas sólidas. A fim de evitar regiões sem sólidos na mistura para uma passagem preferencial das ondas de ultrassom, geralmente é empregado um dispositivo de agitação adicional (VINATORU *et al.*, 1997). Ainda, outro fator importante é o tempo de sonicação aplicado, uma vez que o excesso de sonicação pode diminuir a qualidade do extrato obtido (WANG e WELLER, 2006).

Os efeitos produzidos pelo ultrassom no processo de transferência de massa estão diretamente relacionados à intensidade aplicada. Altas intensidades de ultrassom

aumentam o processo de transferência de massa por afetar a resistência interna e externa da parede celular (TAKEUCHI *et al.,* 2009).

Como em outros processos de extração, a temperatura e polaridade do solvente influenciam no processo de extração usando ultrassom (TAKEUCHI *et al.*, 2009). As condições de operação do processo de extração podem ser alteradas quando se aplica ultrassom, sendo que temperatura e pressão podem ser diminuídas. Isso permite a extração de compostos termolábeis, os quais seriam degradados quando extraídos através de métodos convencionais, como Soxhlet. Entretanto, é preciso controlar a temperatura da extração assistida por ultrassom, pois a sonicação causa aquecimento no sistema (WANG e WELLER, 2006).

Toma et al. (2001), sumarizam a intensificação da transferência de massa, ruptura celular e aumento na capacidade de penetração do solvente nas células como principais benefícios da extração assistida por ultrassom. Do ponto de vista econômico, a aplicação de extrações assistidas por ultrassom apresenta vantagens por ter baixo custo e operação simples e requerer menor tempo de extração (WANG e WELLER, 2006; TAKEUCHI *et al.*, 2009).

Entre os sistemas de ultrassom usados, o mais comum é o banho ultrassônico, o qual surgiu inicialmente para fins de limpeza e é equipado com um transdutor submerso em um tanque convencional (Figura 3.3). Embora este seja um método simples e de fácil utilização, apresenta como desvantagem o aquecimento do fluido que circunda o recipiente contendo a mistura sólido-líquido. A falta de uniformidade na distribuição da energia ultrassônica e diminuição da potência com o tempo também são importantes desvantagens (TAKEUCHI *et al.*, 2009).

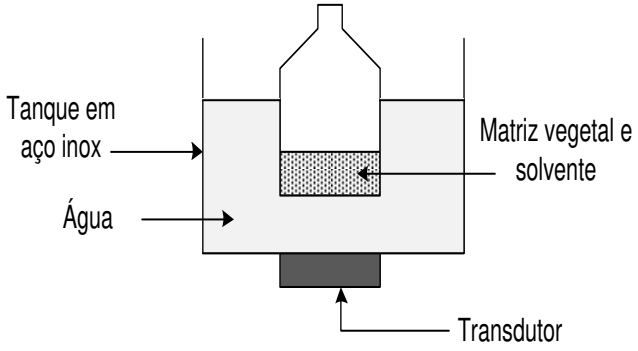


Figura 3. 3: Esquema de extração em banho ultrassônico

A produção de cavitação também pode ser realizada por sonicação direta, através da inserção de um dispositivo que gera as ondas ultrassônicas diretamente em contato com a mistura que está sendo processada (Figura 3.4). Sistemas com sonda são geralmente usados em laboratório, com capacidade de agir diretamente na mistura sólido-líquido. A vantagem das sondas em relação aos banhos de ultrassom é a energia localizada e uma melhor distribuição das ondas que promove uma cavitação mais eficiente no líquido (VINATORU, 2001; TAKEUCHI *et al*., 2009).

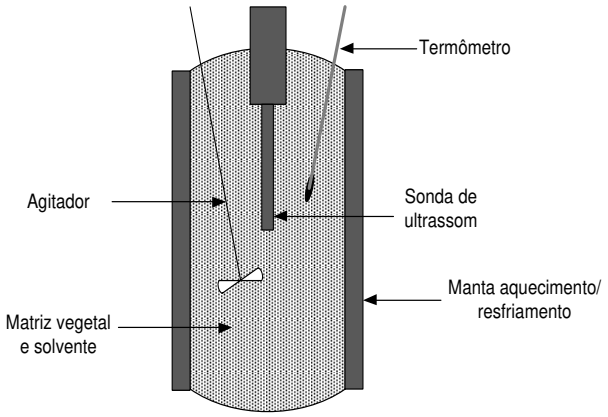


Figura 3. 4: Esquema de extrator com sonda ultrassônica

3.3 Matéria-prima vegetal

3.3.1 Ginseng brasileiro

Plantas medicinais têm sido usadas como alternativa no tratamento de diversas doenças há muitos anos, embora os mecanismos de ação não sejam bem compreendidos. Para que seus efeitos sejam elucidados, os extratos de várias plantas têm sido estudados a fim de avaliar as propriedades terapêuticas atribuídas pela medicina popular (SILVA, 2008).

Dentre as diversas espécies de plantas medicinais há o ginseng, o qual pertence ao gênero *Panax* e é usado há milhares de anos em países asiáticos como medicamento de cura e tônico (WU *et al.*, 2005). O *Panax ginseng* C. A. Meyer, (popularmente chamado de ginseng asiático, chinês ou coerano) e o *Panax quinquefolius* L. (também conhecido como ginseng americano) são as espécies de ginseng mais populares. Há ainda o *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, o *Panax japanicus* C.A. Meyer (ginseng japonês) e o *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. (ginseng vietnamita). Todas as espécies são muito parecidas, pertencentes à família Araliaceae, cujos rizomas e raízes são utilizados em preparações na medicina popular (RATES e GOSMANN, 2002; QI *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, são utilizadas as raízes do ginseng e encontram-se disponíveis na forma branca ou vermelha, onde a primeira é obtida por secagem com ar após a colheita e a outra é obtida por secagem à quente (QI *et al.*, 2011). Os princípios ativos mais importantes do ginseng são as saponinas, as quais exercem inúmeros efeitos sobre o sistema imunológico e estresse (LEAL *et al.*, 2010).

No Brasil, diversas espécies do gênero *Pfaffia*, pertencentes à família Amaranthaceae são comercializadas como substitutas para o ginseng (*Panax* ssp,

Araliaceae) devido à semelhança na morfologia das raízes destas espécies e de os efeitos adaptógenos atribuídos a elas, isto é, ambas contêm substâncias que aumentam a resistência inespecífica, permitindo ao organismo uma maior adaptação aos esforços físicos e mentais. Em função disso, as plantas do gênero *Pfaffia* são chamadas de ginseng brasileiro (MAGALHÃES, 2000; NETO *et al.*, 2005; ZIMMER *et al.*, 2006).

Dentre as espécies de ginseng brasileiro, as principais são *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze e *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Figura 3.5), encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Paraná e Goiás (FREITAS *et al.*, 2004). Os produtos são, geralmente, rotulados como *P. paniculata, P. glomerata* ou ginseng brasileiro e as indicações fornecidas pelos fabricantes são: "revigorante, regenerador celular, indicado para esgotamento físico e mental e falta de memória" ou "indicado como auxiliar no tratamento de irregularidades circulatórias, estresse, anemia, diabetes..."(RATES e GOSMANN, 2002). No entanto, muitas destas alegações carecem de comprovação científica.

Em função da sua importância na medicina popular, grande parte dos estudos que envolvem o ginseng brasileiro (*P. glomerata*) tem como objetivo elucidar os efeitos farmacológicos dos extratos desta planta. Grupos de pesquisa em todo o mundo têm demonstrado que os extratos possuem potencial para o tratamento de inflamações crônicas (NETO *et al.*, 2005); sobre o sistema gastrointestinal de ratos protegendo a mucosa gástrica, diminuindo o número de lesões, agindo no aumento do pH do duodeno e reduzindo as secreções gástricas (FREITAS *et al.*, 2004); atividade hipoglicemiante (SANCHES *et al.*, 2001); atividade antinociceptiva (FREITAS *et al.*, 2009), atividade anti-microbiana contra *Leishmania braziliensis* (NETO et al., 2004); atividade anti-oxidante (SOUZA *et al.*, 2005) e efeitos sobre melanogênese (NAKAMURA *et al.*, 2010).

(a) (b)

Figura 3.5: Gingeng brasileiro (*Pfaffia glomerata*): (a) partes aéreas (Fotografia tirada no campo experimental do CPQBA, Campinas, SP); (b) raízes

Os principais constituintes ativos das raízes de *P. glomerata* são as saponinas, as quais já foram identificadas por diferentes autores em diversos estudos. Segundo Shiobara *et al*. (1993), a ecdisterona, também chamada de β-ecdisona (CAS n° 8047-15-2) é caracterizada como a principal saponina presente nas raízes de *P. glomerata*. Mais recentemente, Nakamura et al. (2010) identificaram 6 novos constituintes e 8 já conhecidos, dentre os quais a β-ecdisona apareceu em maior quantidade (Figura 3.6).

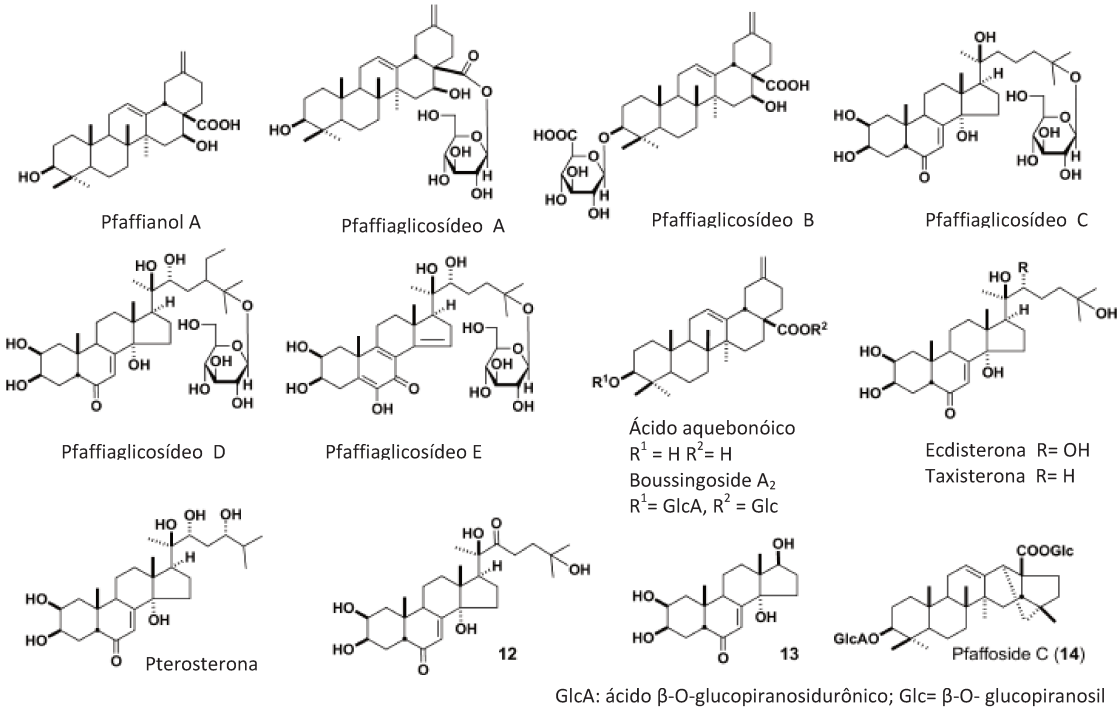


Figura 3.6: Compostos isolados e identificados a partir do extrato metanólico das raízes de ginseng brasileiro (*P. glomerata*). Fonte: NAKAMURA *et al.* (2010)

Devido aos resultados positivos obtidos em estudos acerca da *P. glomerata*, há uma crescente demanda de raízes desta planta para servir como material de estudo e de matéria-prima para medicamentos e complementos alimentares. Como a *P. glomerata* é uma espécie tropical perene, nativa brasileira, que não suporta baixas temperaturas, o Brasil tem sido fornecedor desta planta para diversos países (MONTANARI JÚNIOR, 2005).

São poucas as informações disponíveis sobre a quantidade produzida e comercializada anualmente de *P. glomerata* e estas devem ser vistas com reservas, pois a maioria da produção é conseguida por extrativismo, principalmente na região noroeste do estado do Paraná e vendida aos atacadistas de plantas medicinais que as revende para o mercado interno e externo. Corrêa Jr. *et al.* (2002) estimam que apenas da bacia do alto rio Paraná saiam 60 t/mês, atingindo 700 t anuais. Em 2005, o preço de raízes

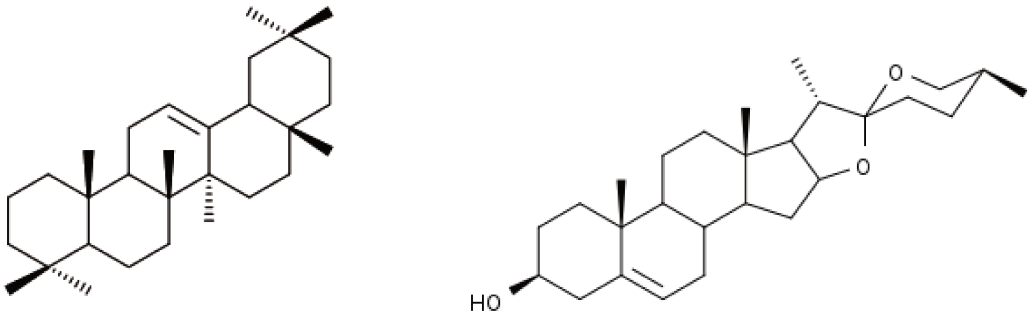
secas de ginseng brasileiro pago pelo mercado atacadista de São Paulo situou-se entre R$ 8,00 e 10,00 por quilograma (MONTANARI JÚNIOR, 2005).

3.3.2. Saponinas

As saponinas (do latim *sapon* = sabão) são compostos naturais encontrados em aproximadamente 100 famílias de plantas e em mais de 500 espécies de plantas e têm sido usadas há milhares de anos na cultura popular do Oriente como substitutas do sabão. A denominação das plantas ricas em saponinas foi derivado desta característica, sendo as principais: casca de sabão (*Quillaja saponaria*), erva de sabão (*Saponaria officinalis*), fruto de sabão (*Sapindus saponaria*), entre outras (OLESZEK e HAMED, 2010; NEGI *et al*., 2011).

3.3.2.1 Estrutura química

Quimicamente, as saponinas constituem um vasto grupo de glicosídeos contendo cadeias de açúcares ligados à aglicona, cuja massa molecular pode variar de 600 a 2000 Da. As agliconas, também chamadas sapogeninas, as quais são as partes apolares da molécula, podem ser classificadas em grupos esteroidal (C 27) ou triterpênica (C 30) (Figura 3.7), ligados a uma ou mais cadeias de açúcares (OLESZEK e HAMED, 2010).



(a) (b)

Figura 3.7: Estruturas das agliconas presentes em saponinas: (a) triterpênica; (b) esteroidal. Fonte: Adaptado de GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA (2007).

As saponinas esteroidais são encontradas principalmente em monocotiledôneas, enquanto as saponinas triterpênicas são encontradas em dicotiledôneas. Em função do número de grupos funcionais (-OH, - COOH, -CH_3) que podem estar presente nas agliconas, ocorre uma grande diversidade de saponinas, que pode ser ainda aumentado devido às diferentes composições, número, ramificações e tipo de substituição dos açúcares ligados às agliconas (OLESZEK, 2002; SPARG *et al.*, 2004; GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA, 2007).

Além da classificação em função de seu núcleo fundamental, as saponinas podem ser subdivididas em função do número de cadeias de açúcares ligados. Quando apresentam uma cadeia de açúcar ligado à aglicona, são denominadas monodesmosídicas (do Grego *desmos* = cadeia). As agliconas que possuem duas ou três cadeias de açúcares ligados são denominadas bidesmosídicas ou tridesmosídicas, respectivamente (GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA, 2007).

A β-ecdisona, ([2β,3β,5β,22R] -2,3,14,20,22,25-hexahidroxi-colest-7-en-6-ona) (Figura 3.8), a qual é a principal saponina encontrada nas raízes de *P. glomerata,* possui estrutura esteroidal e pertence ao grupo dos fitoecdisteróides. Uma vez que a β-ecdisona está presente apenas nesta planta, é considerada um marcador químico da qualidade desta espécie (ZIMMER *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2008; FLORES *et al.*, 2009).

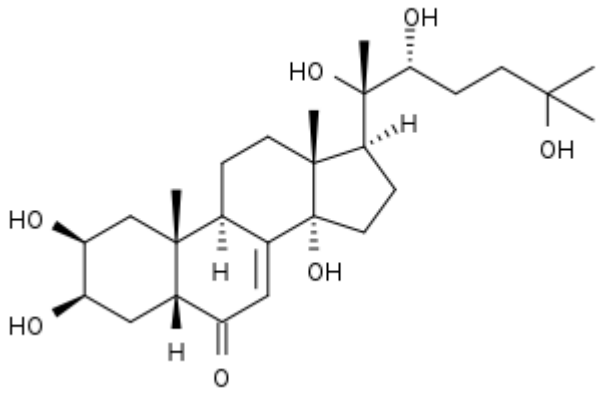


Figura 3.8: Estrutura química da β-ecdisona. Fonte: adaptado de Zimmer *et al.* (2006).

3.3.2.2 Aplicação e propriedades das saponinas

A molécula das saponinas apresenta uma parte com características hidrofóbicas, atribuídas às sapogeninas, e a outra parte com características hidrofílicas, atribuídas às cadeias laterais de açúcar, o que caracteriza as saponinas como surfactantes não-iônicos. Devido a seu caráter anfifílico, as saponinas são conhecidas como agentes superficiais (ou tensoativos) naturais e esta propriedade é a base para as diversas aplicações tradicionalmente empregadas nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética (OLESZEK e HAMED, 2010; STANIMIROVA *et al.*, 2011).

Na Tabela 3.1 estão apresentadas algumas das principais aplicações industriais das saponinas provenientes de diferentes fontes que já se encontram patenteadas em diversos países. No entanto, recentemente pesquisas têm sido realizadas acerca de

novas aplicações para saponinas, tais como: bio-remediação de solos contaminados (MILLIOLI, 2009; GHAGI *et al.*, 2011); agente hemolítico (NOUDEH *et al.*, 2011), antioxidante (DINI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2011; BI *et al.*, 2012; RYU *et al.*, 2012) e hipoglicemiante (BI *et al.*, 2012); agente plastificante em filmes alimentícios (ANDREUCCETTI *et al.*, 2011); absorção de lipídios no trato intestinal (XIONG *et al.*, 2008), solubilização de colesterol em soluções aquosas (MITRA e DUNGAN, 2001); inibição de melanogênese (NAKAMURA *et al.*, 2010), entre outras.

Tabela 3. 1: Aplicações industriais das saponinas provenientes de diferentes fontes

Aplicação	Fonte	Referências
Formulações surfactantes/ solubilizantes/emulsificantes em alimentos e cosméticos	*Quillaja saponaria*	(RLESS *et al.*, 2010; SCHRADER *et al.*, 2010)
	Saponaria officinalis e/ou *Glycyrhiza glabra*	(KVASENKOV, 2005)
	Camellia oleifera, Sapindus ssp., *Yucca* ssp., *Quillaja* ssp.	(WU *et al.*, 2007)
	Quillaja saponaria Molina	(WIERSMA, 1998)
	Glycine Max e *Panax ginseng*	(KIM e HA, 1993; HAMAJIMA *et al.*, 2011)
	Não informado	(CLAUDE, 2009)
Estabilizante da espuma de bebidas	*Quillaja saponaria* Molina	(CAMACHO e LOBO, 2010)
Formulações altamente adoçantes para refrigerantes	*Glycine Max*	(PRAKASH e DUBOIS, 2007)
Ingrediente funcional em alimentos enriquecidos e suplementos	*Panax* ssp.	(INOUE, 1993)
Remoção de colesterol de alimentos processados e não-processados	*Quillaja* ssp.	(SUNDFELD *et al.*, 1994)
Ingrediente bioativo (melhoria da função imune) em formulações para alimentação animal	*Camellia L.* ssp	(ZHAN, 1999)
Composto bioativo (auxiliar na promoção de crescimento capilar)	*Panax* ssp.	(MEYBECK *et al.*, 1997)

Tabela 3.1: Continuação

Aplicação	Fonte	Referências
Composto bioativo (ação adstringente e tonificante)	*Hedera helix* e *Hedera colchica*	(BARTASSON, 2011)
	Quillaja saponaria	(FRANCISCO e MARTINEZ, 2004)
Agente espumante em creme dental orgânico	*Quillaja* ssp. e *Yucca* ssp.	(OLMSTEAD, 2002)
Ingrediente bioativo de formulações para a prevenção e tratamento de gastrite e úlcera	*Momordicae sêmen*	(KIM, B. C. *et al.*, 2007)
Ingrediente de formulações para prevenção e tratamento de câncer	*Saponaria vaccaria*	(HICKIE *et al.*, 2009)
	Panax ssp.	(DONG HUANG e DONG FENG QI, 2005)
Adjuvantes para vacinas	*Quillaja saponária*	(KENSIL e MARCIANI, 1991; KENSIL, 2003)
	Chenopodium quinoa	(ESTRADA *et al.*, 1997)
Agente com atividade molucicida	*Camellia* ssp., *Yucca sidigera, Quillaja saponaria*, *Glycine max* e *Chenopodium quinoa*	(DEN BRABER e MOSKAL, 2008)
Surfactante para formulações pesticidas	*Quillaja saponaria* e/ou *Yucca schidigera*	(MCFADDEN e SOBECK, 2006)

Em soluções aquosas, as saponinas formam micelas quando acima de uma determinada concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC) (GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA, 2007). A CMC é geralmente determinada como o ponto de intersecção entre dois segmentos de um gráfico (Figura 3.9), que mostra a tensão superficial em função da concentração da solução aquosa de surfactante. Um comportamento típico para este tipo de função é o decréscimo abrupto da tensão superficial em soluções de saponinas diluídas até uma certa concentração, a CMC. Em seguida o decréscimo da tensão superficial é suavizado assintoticamente até que a curva fique completamente paralela à abcissa (MIRONENKO *et al.*, 2010).

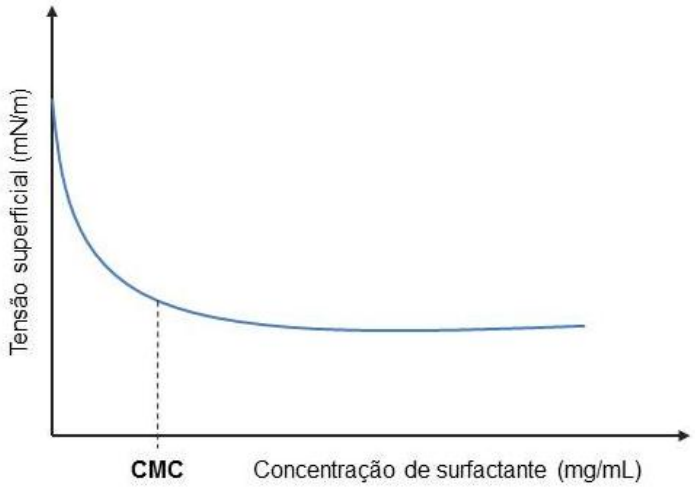


Figura 3.9: Representação gráfica da relação entre a tensão superficial e concentração de surfactante em meio aquoso.

As características das micelas de saponinas são afetadas por parâmetros da fase aquosa (temperatura, pH e concentração de eletrólitos), planta de origem das saponinas, entre outros (MITRA e DUNGAN, 1997; 2001; GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA, 2007; CANTO *et al*., 2010).

3.3.2.3 Extração de saponinas de matrizes vegetais

O reconhecimento da importância comercial das saponinas aliado a expansão crescente de novas aplicações e o aumento da evidência de seus benefícios à saúde têm impulsionado as pesquisas sobre o desenvolvimento de processos para produção de saponinas em escala comercial a partir de fontes naturais. Devido à abundância de saponinas na natureza, uma grande variedade de plantas pode ser utilizada como matéria-prima para sua produção industrial (GUÇLU-USTUNDAG e MAZZA, 2007). Atualmente, as principais fontes naturais de saponinas são a *Quillaja saponaria* e a *Yucca sidighera* (OLESZEK e HAMED, 2010).

As saponinas têm sido extraídas das matrizes vegetais com diferentes métodos e solventes. Enquanto métodos convencionais como refluxo (IVANOVA *et al.*, 2010; NAKAMURA *et al.*, 2010), Soxhlet (WOOD *et al.*, 2006) e agitação (LIGOR *et al.*, 2005) são usados para obtenção de saponinas, novas tecnologias que aumentem a eficiência de extração e reduzam o tempo e consumo de solvente estão sendo desenvolvidas. Dentre estes novos métodos encontram-se extração com líquido pressurizado (PLE = *Pressurized Liquid Extraction*) (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ *et al.*, 2007; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ e MAZZA, 2008), extração assistida por micro-ondas (KWON *et al.*, 2003; KWON *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2007), extração assistida por ultrassom (LI *et al.*, 1994; LEI *et al.*, 2008; IVANOVA *et al.*, 2010; RATTANASOMBAT e SANGWICHIEN, 2011; SANTOS *et al.*, 2011) e extração com fluidos supercríticos (SFE = *Supercritical Fluid Extraction*) (WOOD *et al.*, 2006).

Os solventes comumente empregados para extração de saponinas são água, álcoois de cadeia curta (metanol e etanol) e soluções hidro-alcoólicas (PETIT *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2001; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ *et al.*, 2007; RUBIO-MORAGA *et al.*, 2011; TABOPDA *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012).

Conforme citado anteriormente, as saponinas são os principais compostos bioativos presentes nas raízes de *P. glomerata* conhecidos até o momento. Embora as raízes de *P. glomerata* sejam uma fonte atrativa de saponinas em função de sua concentração considerável nesta planta (VIGO *et al.*, 2003), poucos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de explorar os aspectos acerca da extração de saponinas a partir das raízes de *P. glomerata*. Sendo assim, esta é uma área de estudos com muito potencial, principalmente para países em desenvolvimento como o Brasil, onde agregar valor à matéria-prima cultivada em território nacional processando-a com tecnologias menos agressivas ao meio ambiente representa a possibilidade de aumentar sua competitividade no mercado global de produtos naturais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor compreensão das atividades desenvolvidas neste trabalho, a sequência de atividades experimentais está apresentada na Figura 4.1:

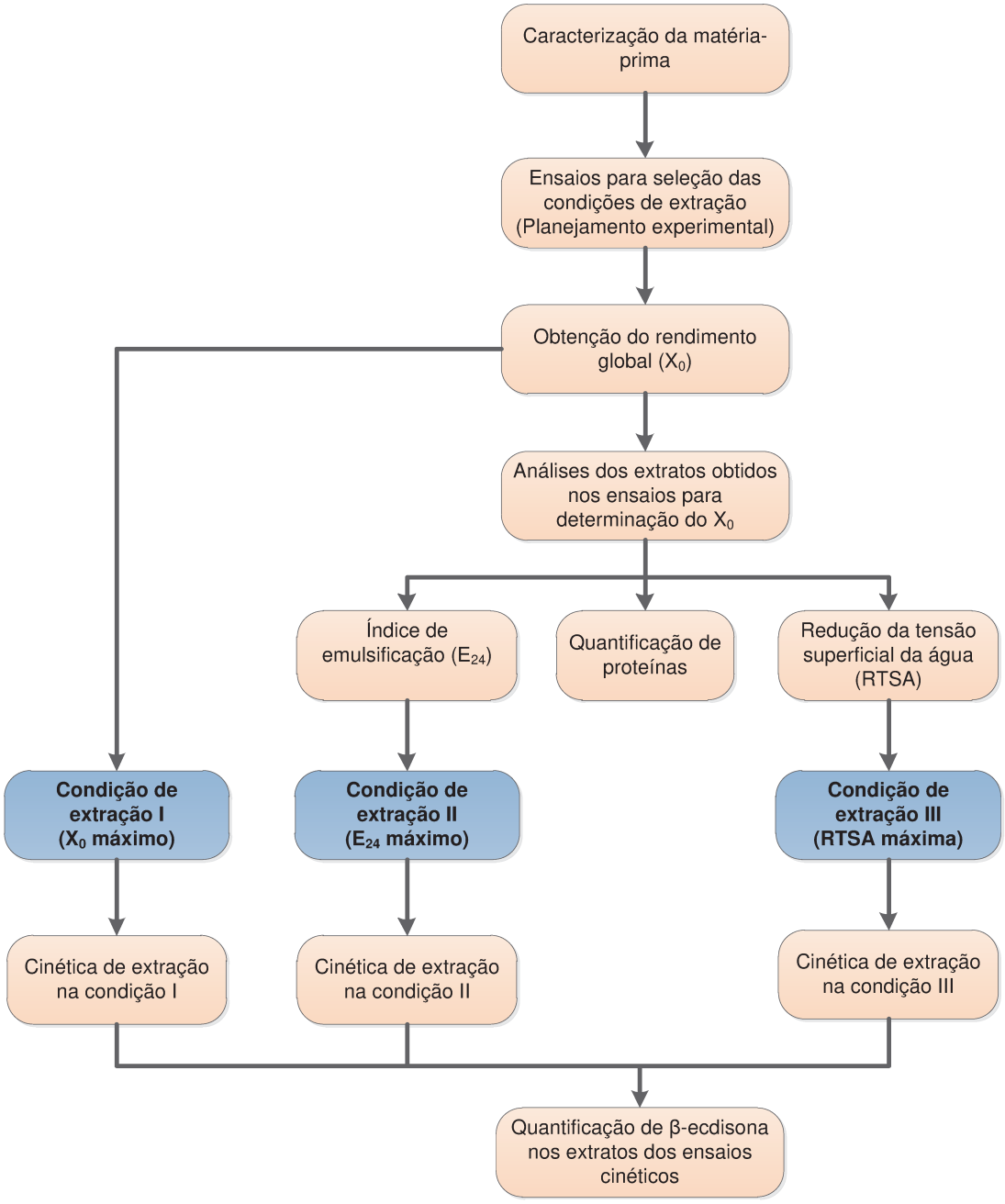


Figura 4.1: Diagrama de fluxo das atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho.

4.1 Matéria-prima

4.1.1 Origem

As raízes do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) foram cultivadas no campo experimental do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas), UNICAMP, Campinas, SP, de onde foram colhidas em 17 de novembro de 2008, após sete anos de cultivo. Elas foram lavadas e secas em uma estufa com circulação forçada de ar a 40 °C durante 5 dias (MONTANARI JÚNIOR, 2005).

4.1.2 Preparo

As raízes secas, vindas do CPQBA cortadas em pedaços com cerca de 10 a 15 cm de comprimento foram moídas em um moinho de facas (Marconi, modelo M340, Piracicaba, SP, Brasil) no laboratório. O material moído foi classificado de acordo com o tamanho de partículas com o auxílio de um sistema vibratório (Bertel, modelo 1868, Caieiras, SP, Brasil) com peneiras de aberturas de 8 a 80 mesh (2,38 a 0,177 mm (série Tyler, Wheeling, MO, EUA). As massas retidas nas peneiras foram pesadas em balança semi-analítica (Data Weighting, modelo Sartorios A200S, ± 0,0001 g, Elk Grove, CA, EUA) e armazenadas em sacos plásticos devidamente vedados a -18°C em freezer doméstico (Metalfrio, modelo DA420, São Paulo, SP, Brasil).

4.1.3 Caracterização

4.1.3.1 Diâmetro médio de partícula

O diâmetro médio geométrico (d_{mg}) das partículas foi determinado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standarts (ASAE, 1998), através da Equação 4.1.

$$d_{mg} = exp\left\{\frac{\sum_{i=1}^{n}[w_i log(d_i \times d_{i+1})^{0,5}]}{\sum_{i=1}^{n} w_i}\right\} \quad \text{(Equação 4.1)}$$

Onde: d_i é a abertura nominal da i-ésima peneira (mm); d_{i+1} é a abertura nominal da peneira (i+1) (mm) e w_i é a massa de material retido na i-ésima peneira.

4.1.3.2 Umidade

A umidade das raízes de *P. glomerata* foi determinada pelo método de secagem direta em estufa a 105°C adotada pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) de acordo com a equação 4.2:

$$U = \left(\frac{M}{m_{amostra}}\right) \times 100 \quad \text{(Equação 4.2)}$$

Onde, M é a massa perdida durante a secagem (g) e $m_{amostra}$ é a massa inicial de amostra.

4.1.3.3 Densidade aparente, real e porosidade

A densidade aparente do leito foi determinada conforme a Equação 4.3.

$$\rho_a = \frac{m_{amostra}}{V} \qquad \text{(Equação 4.3)}$$

Onde ρ_a é a densidade aparente do leito (kg.m^{-3}), $m_{amostra}$ é a massa de matéria-prima seca (kg) e V é o volume do extrator ocupado pela matéria prima (m^3).

A densidade real das partículas (ρ_r) foi determinada por picnometria com gás hélio na Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, utilizando densímetro (Micrometrics, modelo Multivolume Pycnometer 1305, Norcross, EUA).

A porosidade total do leito e das partículas (ε) foi determinada de acordo com a Equação 4.4.

$$\varepsilon = 1 - \left(\frac{\rho_a}{\rho_r}\right) \qquad \text{(Equação 4.4)}$$

4.2 Aparato de extração por percolação em leito fixo

O aparato de extração por percolação em leito fixo utilizado está apresentado na Figura 4.2 e consiste de um recipiente para armazenamento do solvente e um para coleta da mistura extrato + solvente; uma bomba peristáltica (Cole-Parmer Instrument Co, número catálogo 7554-30, Chicago, IL, EUA); um banho ultrassônico (frequência 40 kHz, potência 135 W) (Unique, modelo Max Clean 1400, Indaiatuba, SP, Brasil) e um banho termostático (Marconi, modelo MA 127/BO, Piracicaba, SP, Brasil) para manter a temperatura da água do banho ultrassônico constante. O percolador consiste em uma coluna de vidro (16,3 mm de diâmetro interno e 14,6 cm de comprimento) e, para vedação, foram utilizadas rolhas de silicone. Todos os experimentos foram realizados com o percolador acondicionado dentro do banho ultrassônico, mesmo aqueles que não foram assistidos ultrassom, a fim de manter as mesmas condições de operação.

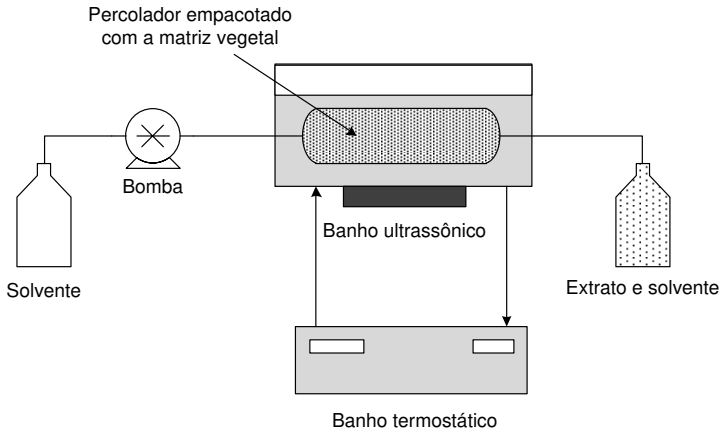


Figura 4.2:Esquema do aparato de percolação assistida por ultrassom

4.3 Seleção das condições de extração

4.3.1 Planejamento experimental

Os parâmetros estudados foram: tipo de solvente, temperatura e método de extração (Tabela 4.1). A influência destes parâmetros foi avaliada sobre as seguintes variáveis resposta: rendimento global, índice de emulsificação e capacidade de redução da tensão superficial da água. O estudo foi realizado através de planejamento experimental fatorial completo (5×2×4) totalmente aleatorizado sem repetição. A Tabela 4.2 mostra a matriz experimental. A análise da influência dos parâmetros foi realizada através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *Software* Minitab® 16, onde os parâmetros foram considerados estatisticamente significativos quando o *p*-valor foi menor ou igual a 0,05 (95% de confiança).

Tabela 4.1: Variáveis estudadas e suas respectivas condições experimentais

Variável	Condição experimental	
Solvente	água pura	
	EtOH:água (70:30, v/v)	
	EtOH:água (35:65, v/v)	
	$IsoC_3OH$:água (70:30, v/v)	
	$IsoC_3OH$:água (35:65, v/v)	
Temperatura (°C)	40	
	60	
Método de extração	Percolação	
	Percolação assistida por ultrassom	durante toda extração
		durante o início da extração por 5 min
		com pulsos a cada 2 min

EtOH: etanol; $IsoC_3OH$: isopropanol.

Tabela 4. 2: Matriz experimental das condições de extração estudadas.

Experimento	Temperatura (°C)	Método de extração
Solvente: água pura		
1	40	PE
2	60	PE
3	40	PEU
4	60	PEU
5	40	PEUI
6	60	PEUI
7	40	PEUP
8	60	PEUP
Solvente: EtOH:água (70:30, v/v)		
9	40	PE
10	60	PE
11	40	PEU
12	60	PEU
13	40	PEUI
14	60	PEUI
15	40	PEUP
16	60	PEUP
Solvente: EtOH:água (35:65, v/v)		
17	40	PE
18	60	PE
19	40	PEU
20	60	PEU
21	40	PEUI
22	60	PEUI
23	40	PEUP
24	60	PEUP
Solvente: IsoC_3OH:água (70:30, v/v)		
25	40	PE
26	60	PE
27	40	PEU
28	60	PEU
29	40	PEUI
30	60	PEUI
31	40	PEUP
32	60	PEUP

Tabela 4.2: Continuação

Experimento	Temperatura (°C)	Método de extração
Solvente: IsoC_3OH:água (35:65, v/v)		
33	40	PE
34	60	PE
35	40	PEU
36	60	PEU
37	40	PEUI
38	60	PEUI
39	40	PEUP
40	60	PEUP

PE: percolação; PEU: percolação assistida por ultrassom durante toda extração; PEUI: percolação assistida por ultrassom durante o início da extração; PEUP: percolação assistida por ultrassom com pulsos a cada 2 minutos.

4.3.1.1 Preparo do leito e procedimento de extração

Para cada extração, o percolador foi empacotado com 4,5 g de matriz vegetal (raízes de *P. glomerata*) e o espaço restante foi preenchido com material inerte (pérolas de vidro). Para evitar entupimento da linha de solvente, antes das rolhas de silicone foi colocada uma camada de lã de vidro (Figura 4.3).

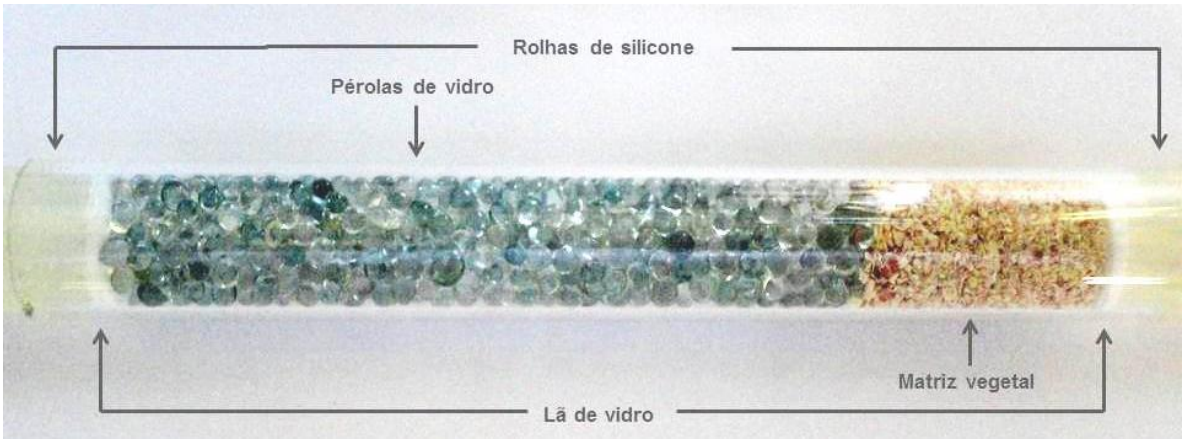


Figura 4.3: Preparo do leito de extração contendo a matéria-prima e o material inerte.

A temperatura da água do banho ultrassônico foi previamente estabilizada através de recirculação no banho termostático e o percolador foi então acondicionado dentro do banho ultrassônico. A vazão de solvente foi mantida fixa em 4,5 $cm^3.min^{-1}$. Para os experimentos que foram assistidos por ultrassom, o banho ultrassônico foi ligado quando a matriz vegetal começou a ser encharcada pelo solvente. Para todos os experimentos, a relação de massa de matéria-prima: volume de solvente foi de 1:10 (m:v).

Para os métodos, PEUI e PEUP, os tempos foram determinados em função do tempo total de extração que foi aproximadamente 10 minutos, para que no primeiro a extração fosse assistida até a metade do tempo total de extração, e no segundo para que houvessem 6 pulsos durante a extração, sendo que cada pulso teve duração de 2 segundos.

Para quantificação do rendimento, os extratos obtidos com misturas hidro-alcoólicas foram submetidos à evaporação em evaporador rotativo (Heidolph, model Laborata 4001 WB, Viertrieb, Alemanha) para eliminação do solvente alcoólico e a água restante foi eliminada em liofilizador (Liobrás, modelo L 101, São Carlos, SP, Brasil). Os extratos obtidos com água pura foram submetidos à liofilização diretamente.

4.3.1.2 Cálculo do rendimento global (X_0)

Ao final de cada extração, o rendimento global foi calculado de acordo com a Equação 4.5, como a relação entre a massa total de extrato ($M_{extrato}$) e a massa inicial de amostra em base seca ($M_{amostra}$).

$$X_0 = \frac{M_{extrato}}{M_{amostra}} \times 100 \qquad \text{(Equação 4. 5)}$$

4.3.2 Experimentos cinéticos

Uma vez selecionadas as condições ótimas de extração segundo os critérios pré-estabelecidos (X_0 máximo, E_{24} máximo, RTSA máxima), os experimentos cinéticos foram realizados em triplicata. Durante o processo de extração, os frascos de coleta de extrato foram substituídos por outros limpos e previamente tarados em intervalos de tempo pré-determinados (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22, 26, 30, 36, 42, 48 min). A vazão empregada foi a mesma utilizada para a determinação do X_0 (4,5cm^3.min^{-1}). Ao final do processo de extração, as curvas globais de extração (*OECs* - *Overall Extraction Curves*) foram construídas com a finalidade de determinar a quantidade de material solúvel extraído e parâmetros de processo em função do tempo.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos, t_{CER} (duração do período de taxa constante de extração, [min.]); M_{CER} (taxa de transferência de massa do período CER (*Constant Extraction Rate* – taxa de extração constante), [kg/s]); Y_{CER} (razão mássica de extrato na saída do leito, [g extrato/mL de solvente]); e R_{CER} (rendimento do período da taxa constante de extração, [%]), foi adotada metodologia de Rodrigues *et al*., (2002) que utiliza os procedimentos PROC REG e PROC NLIN do *software* SAS 6.12. Este procedimento ajusta um “spline” linear de duas retas à curva de cinética de extração (Anexo 9.2).

4.4 Análises dos extratos

4.4.1 Determinação do teor de proteínas totais

A determinação de proteínas foi realizada nas raízes de ginseng brasileiro e nos extratos obtidos pelo método micro-Kjeldahl, sendo que o teor de proteínas foi calculado de acordo com a Equação 4.6 (AOAC, 1995).

$$Proteínas\ no\ extrato\ (\%) = \left(\frac{V_{HCl} \times\ C_{HCl} \times Fc_{HCl} \times\ 0{,}014}{m_{amostra}}\right) \times 100 \times\ Fc_{proteínas}$$

(Equação 4.6)

Onde: V_{HCl} é o volume de solução de ácido clorídrico gasto na titulação; C_{HCl} é a concentração da solução utilizada na titulação; Fc_{HCl} é o fator de correção da concentração da solução de HCl utilizada na titulação; $m_{amostra}$ é a massa de extrato ou de matéria-prima utilizada na análise, $Fc_{proteínas}$, é o fator de correção para conversão do teor de nitrogênio total presente na amostra para proteínas e neste caso corresponde a 6,25.

O percentual de proteínas extraídas do total de proteínas presentes na raíz foi calculado de acordo com a Equação 4.7.

$$Proteínas\ extraídas\ (\%) = \left(\frac{\%\ proteínas\ no\ extrato}{\%\ proteínas\ na\ MP}\right) \times\ 100 \qquad \text{(Equação 4. 7)}$$

4.4.2 Índice de emulsificação (E_{24})

O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Cooper et al. (1987) com algumas modificações. Adicionou-se a um tubo de ensaio 2,0 cm^3 de óleo de soja e a mesma quantidade de cada extrato em solução aquosa com concentração de 50 $mg.cm^{-3}$. Cada tubo foi agitado sob *vortex* em agitador de tubos (Phoenix, modelo AP 56, Araraquara, SP, Brasil) durante 2 minutos e deixado em repouso durante 24 horas. O E_{24} foi calculado de acordo com a Equação 4.8. As medidas de E_{24} foram realizadas em duplicata.

$$E_{24} = \frac{camada\ emulsionada\ (mm)}{altura\ total\ da\ coluna\ líquida\ (mm)} \times 100 \qquad \text{(Equação 4. 8)}$$

4.4.3 Redução da tensão superficial da água (RTSA)

A tensão superficial foi mensurada em tensiômetro (Kruss, modelo K12, Hamburgo, Alemanha), pelo método da placa de platina a temperatura ambiente. Antes de realizar a análise dos extratos, foi realizada a medida da tensão superficial da água para verificar o desempenho do equipamento e para calcular o valor de RTSA dos extratos. Entre as leituras de cada amostra, a placa de platina foi lavada com água destilada e flambada. Para a análise de redução da tensão superficial da água, os extratos foram diluídos em água destilada a uma concentração de 1,0 $mg.cm^{-3}$. A RTSA foi calculada de acordo com a Equação 4.9:

$$RTSA_i = \left(\frac{TS_{H2O} - TS_{extrato\ i}}{TS_{H2O}}\right) \times 100 \qquad \text{(Equação 4. 9)}$$

Onde $RTSA_i$ = Redução da tensão superficial da água do extrato i ; TS_{H2O}= Tensão superficial da água (mN/m); $TS_{extrato\ i}$ = Tensão superficial da solução aquosa do extrato i.

4.4.4 Quantificação de β-ecdisona

A quantificação de β-ecdisona foi realizada nos extratos provenientes do estudo cinético, segundo metodologia descrita por Leal et al. (2010), com algumas modificações. As análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1260) composto por um sistema de bombeamento quaternário (modelo G1311A), detector espectrofotométrico por arranjo de diodos (modelo G4214B), forno para coluna (modelo G1311A) e injetor automático (modelo G1329B). A coluna utilizada foi a Zorbax Eclipse Plus (C18, 5µm, 150 x 4,6 mm, Agilent) operando a 50 °C. Os eluentes utilizados foram água com 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido acético (B). A vazão foi de 1,2 $cm^3.min^{-1}$ com gradiente de B de 0 a 100% em 15 minutos, seguido de gradiente de B de 100 a 0 % em 10 minutos e mantendo 100 % de A por mais 5 minutos. As amostras, extratos diluídos em água destilada com concentração de 10 $mg.cm^{-3}$ e filtrados em membrana de 0,45 µm, foram injetadas em duplicata. O volume injetado das amostras foi de 10 µL e do padrão (20-hydroxyecdysone, ≥93%, Sigma Aldrich) variou de 1 a 35 µL. As áreas dos picos foram obtidas em 254, 280 e 320 nm e a quantificação foi realizada em 254 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

Os dados relacionados à caracterização da matéria-prima são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5. 1: Caracterização das raízes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*)

Umidade (%)	8,9 ± 0,2
Diâmetro médio de partícula (m)	$(8,00\pm 0,01)x10^{-4}$
Densidade aparente ($kg.m^{-3}$)	274,85
Densidade real ($kg.m^{-3}$)	1750,0 ± 0,01
Porosidade	0,8429

5.2 Influência dos parâmetros estudados no rendimento global de extração (X_0)

A Tabela 5.2 apresenta os resultados experimentais obtidos para as variáveis resposta estudadas onde pode-se observar que o rendimento global de extração (X_0) das raízes de *P. glomerata* variou entre 27,0 e 64,0% (base.seca - b.s.) e foi realizada a análise da influência dos parâmetros estudados sobre o X_0 das raízes de *P. glomerata* (Tabela 5.3 e Figura 5.1).

Tabela 5.2: Rendimento global de extração (X_0), índice de emulsificação (E_{24}), redução da tensão superficial da água (RTSA) e teor de proteínas totais em função das condições de extração.

Condições de extração		Rendimento (%,b.s)	E_{24} (%)	RTSA (%)	Proteínas em relação à MP (%, b.s.)	Proteínas em relação ao extrato (%, b.s.)
Temperatura (°C)	Método de extração					
Solvente: água pura						
40	PE	60,7	50,6	19,1	3,1	5,1
60	PE	64,0	41,5	16,2	3,3	5,2
40	PEU	58,4	45,6	14,5	3,1	5,4
60	PEU	63,7	37,9	14,3	3,2	5,1
40	PEUI	62,9	45,9	16,2	3,5	5,5
60	PEUI	63,8	46,6	18,7	3,4	5,3
40	PEUP	62,9	51,4	22,1	3,5	5,5
60	PEUP	62,8	48,7	20,9	3,2	5,1
Solvente: EtOH:água (70:30, v/v)						
40	PE	34,8	43,0	22,5	1,7	5,0
60	PE	36,6	53,0	24,4	1,8	4,9
40	PEU	37,4	52,2	25,5	1,5	3,9
60	PEU	37,9	39,7	22,6	1,6	4,1
40	PEUI	32,3	42,6	20,9	1,6	5,0
60	PEUI	44,9	45,3	26,5	2,1	4,7
40	PEUP	32,4	46,5	22,7	1,6	4,9
60	PEUP	36,1	47,0	26,2	1,7	4,7

Tabela 5.2: Continuação

Condições de extração						
Temperatura (°C)	Método de extração	Rendimento (%,b.s)	E_{24} (%)	RTSA (%)	Proteínas em relação à MP (%, b.s.)	Proteínas em relação ao extrato (%, b.s.)
Solvente: EtOH:água (35:65, v/v)						
40	PE	46,0	43,4	20,5	2,3	5,1
60	PE	57,1	45,3	24,2	2,1	3,7
40	PEU	51,2	44,2	21,2	2,4	4,7
60	PEU	60,1	39,9	26,9	2,3	3,8
40	PEUI	51,4	41,5	19,8	2,5	5,0
60	PEUI	58,6	43,6	28,8	2,3	4,0
40	PEUP	46,3	48,3	17,6	2,2	4,7
60	PEUP	57,8	47,8	24,8	2,2	3,8
Solvente: IsoC_3OH:água (70:30, v/v)						
40	PE	54,4	52,7	28,9	2,8	5,1
60	PE	27,0	52,2	30,8	1,4	5,3
40	PEU	27,6	50,3	31,4	1,5	5,3
60	PEU	31,0	48,7	28,7	1,7	5,4
40	PEUI	28,1	58,0	24,9	1,4	5,1
60	PEUI	34,1	47,7	36,3	1,7	5,1
40	PEUP	28,1	53,4	23,8	1,5	5,3
60	PEUP	54,4	52,1	26,2	2,9	5,4
Solvente: IsoC_3OH:água (35:65, v/v)						
40	PE	39,5	43,9	20,3	2,0	5,1
60	PE	49,1	44,0	21,7	2,1	4,3
40	PEU	48,7	43,8	20,3	2,3	4,7
60	PEU	62,0	40,5	24,4	2,5	4,1
40	PEUI	50,3	46,6	19,9	2,2	4,5
60	PEUI	56,5	46,8	25,6	2,3	4,1
40	PEUP	54,7	45,8	28,5	2,4	4,4
60	PEUP	59,2	48,3	26,0	2,3	3,9

Tabela 5.3: Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros estudados sobre o rendimento global de extração (X_0) das raízes de *P. glomerata*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	*p*-valor
Método extração	27,61	3	9,20	0,19	0,900
Temperatura	245,88	1	245,88	5,11	0,043
Solvente	3607,50	4	901,88	18,75	0,000
Método*Temperatura	101,94	3	33,98	0,71	0,566
Método*Solvente	371,06	12	30,92	0,64	0,772
Temperatura*Solvente	79,53	4	19,88	0,41	0,796
Erro	577,13	12	48,09		
Total	5010,66	39			

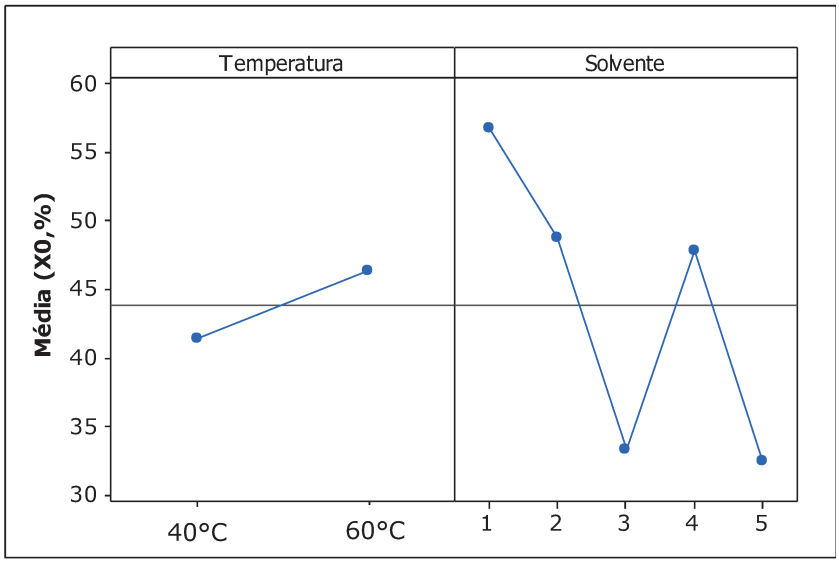


Figura 5.1: Análise gráfica dos efeitos principais dos parâmetros estatisticamente significativos (solvente e temperatura) sobre o rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata*. Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) $IsoC_3OH$:água (35:65); (5) $IsoC_3OH$:água (70:30).

Conforme apresentado na Tabela 5.3, observa-se que para o X_0, apenas a temperatura e o solvente apresentaram influência significativa. A partir disto, foram construídas as figuras das médias, a fim de verificar quais os níveis que maximizaram o X_0.

Na Figura 5.1, observa-se que a temperatura com melhor desempenho de extração foi 60°C. Segundo Takeuchi *et al.* (2009), temperaturas mais elevadas proporcionam um aumento da difusividade do solvente na matéria-prima e também um aumento da solubilidade do soluto contido na matéria-prima no solvente. O efeito combinado entre estes fatores proporciona uma maior capacidade do solvente de carrear os compostos para fora das células, resultando assim em maiores valores de X_0. O solvente que proporcionou maiores valores de X_0 foi a água seguida pelas misturas hidro-alcoólicas de EtOH:água (35:65) e IsoC_3OH:água (35:65), os quais possuem polaridade igual a 9,0, 7,67 e 7,35, respectivamente.

Nas extrações das raízes de *P. glomerata* utilizando metanol, etanol e hexano realizadas por Leal *et al.* (2010), os valores de X_0 variaram entre 0,1 e 5,8%, sendo que os melhores resultados foram obtidos com metanol, o qual é o mais polar dentre os solventes testados (polaridade = 6,6). Quando a mistura de metanol:água (4:1, v/v) (polaridade = 7,1) foi utilizada como solvente de extração por Soxhlet, um X_0 de 22,0% (b.s.) foi obtido (SANCHES *et al.*, 2001) e com acetato de etila (polaridade = 4,3), pelo mesmo método, obteve-se um X_0 máximo de 1,8% (b.s.) (ZIMMER *et al.*, 2006). Esses dados corroboram com aqueles observados neste estudo, já que solventes com maior polaridade, independente da matéria-prima, geralmente, são capazes de extrair metabólitos primários, como proteínas e carboidratos, independentemente dos compostos bioativos (metabólitos secundários).

Freitas *et al.* (2004) realizaram uma extração das raízes e rizomas de *P. glomerata* (10%, m/v) com água quente a 73°C durante 30 minutos e obtiveram um rendimento igual a 39% (b.s.). Neste trabalho, os rendimentos obtidos também utilizando água como solvente foram em torno de 62% (b.s.). Esse aumento no rendimento pode ser atribuído às variações na composição da matéria-prima e também ao método empregado

neste trabalho, pois como a percolação utiliza solvente puro continuamente, isto proporciona uma maior taxa de dissolução dos solutos no solvente do que quando o processo de extração é realizado em batelada.

Em outro estudo, Freitas *et al.* (2009) empregaram etanol:água (70:30, v/v) como solvente de extração a frio por maceração durante 3 dias e obtiveram 64,1% (b.s.) de rendimento. Neto et al. (2005) empregaram o mesmo solvente e método de extração, só que desta vez durante 3 semanas e obtiveram 19% (b.s.) de rendimento. Essas variações de rendimento podem ser atribuídas à diferenças nos lotes de matéria-prima e variações nos procedimentos de extração empregados.

Quando CO_2 supercrítico foi utilizando como solvente de extração de *P. glomerata*, os X_0 obtidos variaram entre 0,02 e 0,18% (b.s.) dentro das faixas de temperatura e pressão estudadas, 30-50°C e 100-300 bar, respectivamente, onde foi possível observar um forte efeito da pressão sobre o X_0, uma vez que o aumento da pressão levou aos maiores rendimentos, da quantidade mínima obtida (0,02%) a 100 bar ao máximo de 0,17% a 300 bar, o que pode ser atribuído à variações na densidade do solvente em função da pressão aplicada. Quando empregou-se etanol como cossolvente (90%CO_2 + 10 % EtOH), o rendimento aumentou para 0,56% sugerindo que a mistura entre CO_2 supercrítico e etanol apresenta maior capacidade de solvatação dos componentes presentes na *P. glomerata* do que destes solventes puros (LEAL *et al.*, 2010).

5.3 Influência dos parâmetros nas propriedades emulsificantes dos extratos

5.3.1 Índice de Emulsificação (E_{24})

O E_{24} foi utilizado para avaliar indiretamente a variação na quantidade de saponinas através das propriedades emulsificantes dos extratos obtidos das raízes de *P. glomerata* em diferentes condições de extração. Sendo que todos os ensaios foram realizados com a mesma concentração de extrato, a variação nos valores de E_{24} pode ser atribuída às diferentes concentrações de saponinas presentes nos extratos, uma vez que estas são os principais compostos presentes nos extratos das raízes de *P. glomerata* responsáveis pela sua atividade emulsificante (GHAGI *et al.*, 2011).

Os resultados de E_{24} dos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos estão apresentados na Tabela 5.2. Na Tabela 5.4 é possível observar que apenas o fator solvente de extração foi estatisticamente significativo para o E_{24} dos extratos.

Tabela 5.4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos estudados sobre o índice de emulsificação (E_{24}) dos extratos obtidos das raízes de *P. glomerata.*

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	*p*-valor
Método extração	111,98	3	37,33	2,84	0,083
Temperatura	33,25	1	33,25	2,53	0,138
Solvente	280,95	4	70,24	5,34	0,010
Método*Temperatura	56,20	3	18,73	1,42	0,284
Método*Solvente	70,85	12	5,90	0,45	0,910
Temperatura*Solvente	36,65	4	9,16	0,70	0,609
Erro	157,78	12	13,15		
Total	747,66	39			

Na Figura 5.2 observa-se claramente que o solvente $IsoC_3OH$: água (70:30, v/v) foi o que apresentou extratos com maior E_{24} (51,9%). Os extratos aquosos de outras plantas medicinais (*Tribulus terrestris,Trigonella foenumgraecum e Echium amoenum*) apresentaram valores de E_{24} entre 12,0 e 23,0% na mesma concentração de extrato utilizada neste trabalho (50 $mg.cm^{-3}$) utilizando parafina como fase hidrofóbica (NOUDEH *et al.*, 2011). Já os extratos aquosos obtidos de *Sapindus mukorossi* apresentaram valores de E_{24} igual a 67%, quando a fase hidrofóbica testada foi querosene. Estes resultados são comparáveis aos obtidos utilizando o surfactante comercial SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate)* e óleo de soja como fase hidrofóbica, o qual apresentou E_{24} igual a 67% (GHAGI *et al.*, 2011).

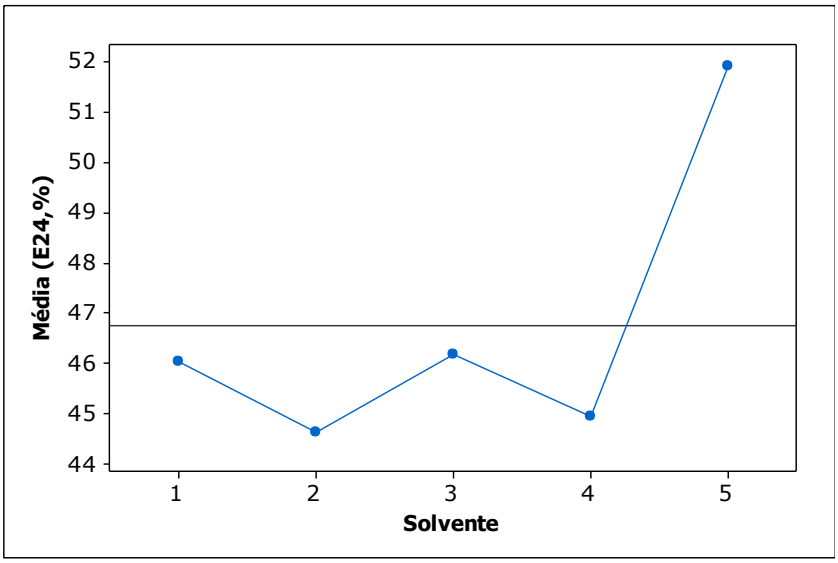


Figura 5.2: Análise gráfica dos efeitos principais do parâmetro estatisticamente significativo (solvente) sobre o índice de emulsificação (E_{24}) dos extratos das raízes de *P. glomerata.* Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) $IsoC_3OH$:água (35:65); (5) $IsoC_3OH$:água (70:30).

Segundo Noudeh *et al.* (2011), as variações no E_{24} obtidos para cada planta podem ser atribuídas à quantidade e qualidade das saponinas presentes em cada planta.

No entanto, outro fator que pode influenciar no E_{24} é o tipo de fase hidrofóbica utilizada para esta determinação, uma vez que o surfactante pode interagir de maneira diferente com cada tipo de fase hidrofóbica, como foi verificado por Pietro *et al.* (2008). Em seu estudo estes autores observaram que os valores de E_{24} obtidos para o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes fases hidrofóbicas (*n*-hexano, óleo de soja, óleo de peixe, óleo diesel, gasolina, benzeno, tolueno e xileno (BTXs), ciclo-hexano e clorobenzeno) variaram entre 39 ± 2 (*n*-hexano) e 59 ± 2 % (óleo de soja).

Uma vez que os valores de E_{24} dos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos com diferentes solventes variaram entre 44 ± 3 (EtOH:água [35:65]) e 52 ± 3% ($IsoC_3OH$:água [70:30, v/v]) (Figura 5.2) utilizando óleo de soja como fase hidrofóbica, estes apresentam potencial para aplicação na substituição de surfactantes sintéticos.

Os solventes empregados neste estudo possuem polaridade variando de 5,7 a 9,0 (Tabela 5.5). Os solventes EtOH e $IsoC_3OH$ foram selecionados para este estudo por serem reconhecidos como GRAS (General Recognized as Safe), pela FDA e comumente utilizados na indústria de alimentos. O solvente $IsoC_3OH$:água (70:30), o qual apresenta a menor polaridade (5,7) apresentou os extratos com maiores valores de E_{24} (Tabela 5.4).

Tabela 5.5: Polaridade dos solventes estudados segundo Snyder *et al.*(1993).

Solvente	Polaridade
Água	9,0
EtOH:água (35:65, v/v)	7,7
$IsoC_3OH$:água (35:65,v/v)	7,4
EtOH:água (70:30, v/v)	6,3
$IsoC_3OH$:água (70:30,v/v)	5,7

Na extração de saponinas a partir de raízes de diferentes espécies de ginseng, o solvente *n*-butanol saturado com água apresentou os melhores rendimentos em todos os

casos (WU *et al.*, 2001). Já Engelberth *et al.* (2010) mostraram que para extração de saponinas a partir de ginseng americano (*Panax quinquefolium*) o melhor solvente foi água saturada com *n*-butanol e água pura, tanto para extração com água quente pressurizada como para extração assistida por ultrassom.

Esses dados indicam que as saponinas presentes em cada matriz vegetal são distintas entre si e, consequentemente, serão melhor extraídas em diferentes faixas de polaridade dos solventes. Os solventes comumente citados na literatura para extração de saponinas das raízes de *P. glomerata* são água, metanol, etanol e misturas hidro-alcoólicas destes solventes (ALVIM *et al.*, 1999; DE-PARIS *et al.*, 2000; GOSMANN *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004; NETO *et al.*, 2005; FLORES *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2009). No entanto, não há estudos que investiguem os efeitos dos diferentes solventes na extração de saponinas das raízes de *P. glomerata*. Assim, estudos acerca do conhecimento das saponinas presentes nos extratos das raízes de *P. glomerata* são importantes para afirmar com mais propriedade que tipo de interação se estabelece entre as saponinas e os solventes de extração.

5.3.2 Redução da tensão superficial da água (RTSA)

A análise de RTSA é uma determinação da capacidade que os extratos das raízes de *P. glomerata,* quando em solução aquosa, possuem de reduzir a tensão superficial da água, ou seja, quanto maior for a RTSA, maior a atividade surfactante do extrato. Na Tabela 5.6 é possível observar que, neste caso, apenas o método de extração não foi estatisticamente significativo. A partir destes dados, foram construídas as figuras para análise dos efeitos de interação entre os parâmetros estatisticamente significativos (Figura 5.3). As figuras de efeitos principais não são mostradas pois, como as interações

entre estes parâmetros foram estatisticamente significativos, os parâmetros não precisam ser analisados isoladamente.

Tabela 5.6: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos estudados sobre a capacidade de redução da tensão superficial da água dos extratos obtidos das raízes de *P. glomerata*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	*p*-valor
Método extração	8,436	3	2,812	0,72	0,560
Temperatura	71,566	1	71,566	18,29	0,001
Solvente	499,082	4	124,770	31,89	0,000
Método*Temperatura	58,800	3	19,600	5,01	0,018
Método*Solvente	141,909	12	11,826	3,02	0,033
Temperatura*Solvente	49,299	4	12,325	3,15	0,055
Erro	46,957	12	3,913		
Total	876,049	39			

Na Figura 5.3 estão apresentados os efeitos de interação entre os parâmetros estudados, onde fica evidente que a combinação dos parâmetros que fornece o maior valor de RTSA é: Método de extração: PEUI; Solvente: ($IsoC_3OH$:água [70:30]) e Temperatura: 60°C, cujo valor de RTSA foi igual a 36,6%.

Uma vez que o efeito “método de extração” não foi significativo estatisticamente, as interações entre Método*Temperatura e Método*Solvente somente apresentaram efeitos significativos em função do *p*-valor muito baixo dos efeitos principais de temperatura e solvente, que quando multiplicados tornam estas interações significativas. Já as condições de temperatura e solvente que apresentaram os maiores valores de RTSA corroboram com aquelas obtidas para o E_{24}, o que é um dado esperado, pois ambas medidas indicam variação nas concentrações de saponinas nos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos em diferentes condições.

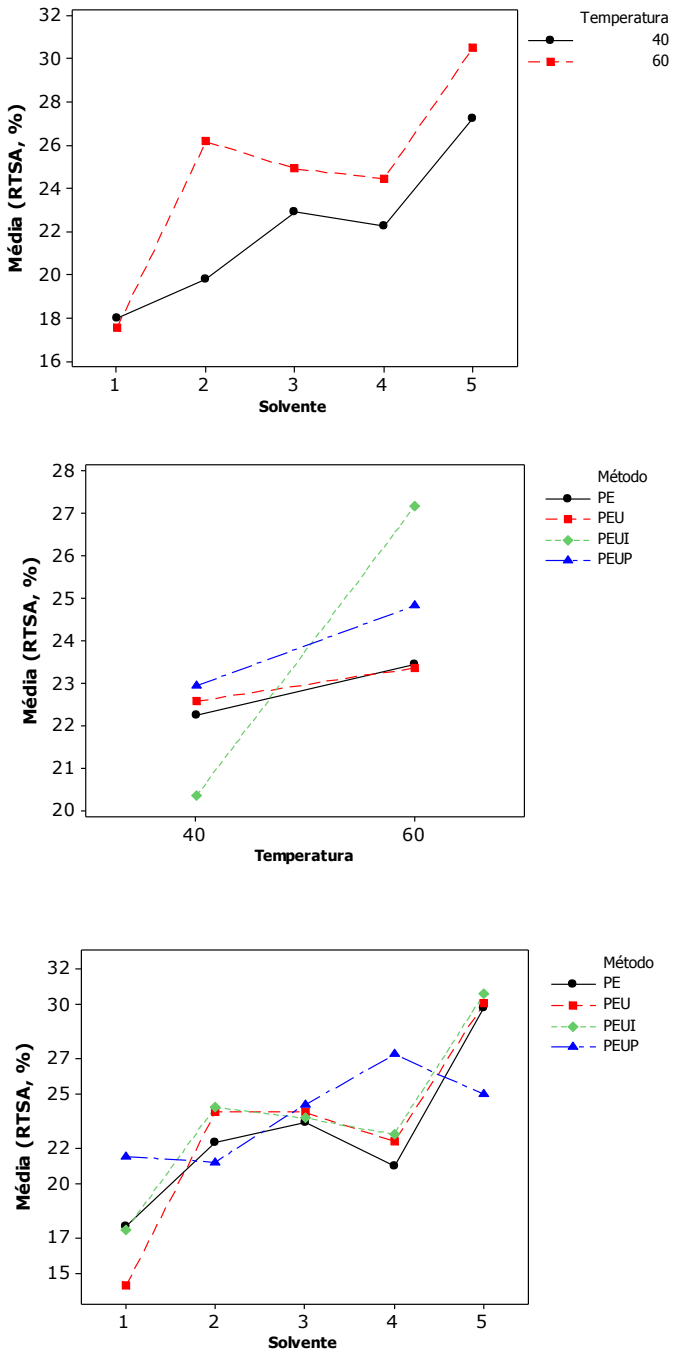


Figura 5.3: Análise gráfica dos efeitos de interação dos parâmetros estatisticamente significativos sobre a RTSA dos extratos das raízes de ginseng brasileiro. Solventes: (1) água; (2) EtOH:água (35:65); (3) EtOH:água (70:30); (4) IsoC_3OH:água (35:65); (5) IsoC_3OH:água (70:30). Métodos: (PE) Percolação; (PEU): Percolação assistida por ultrassom; (PEUI) Percolação assistida por ultrassom durante o início da extração; (PEUP) Percolação assistida por ultrassom com pulsos.

As saponinas são descritas como surfactantes não-iônicos (SKURTYS e AGUILERA, 2009), e, portanto, apresentam comportamento similar aos surfactantes comerciais não-iônicos, como os da família dos Tweens, por exemplo (Figura 5.4) (STANIMIROVA *et al.*, 2011).

Segundo Mainkar e Jolly (2000), surfactantes que proporcionam uma RTSA entre 48,0 e 55,0% são considerados bons para aplicação industrial em xampus. Os valores de RTSA dos extratos das raízes de *P. glomerata* variaram entre 14,3 e 36,3% em concentração igual 1,0 mg.cm^{-3}, sendo que o primeiro foi obtido sob as seguintes condições: Método de extração PEU; Solvente: água e Temperatura: 60°C.

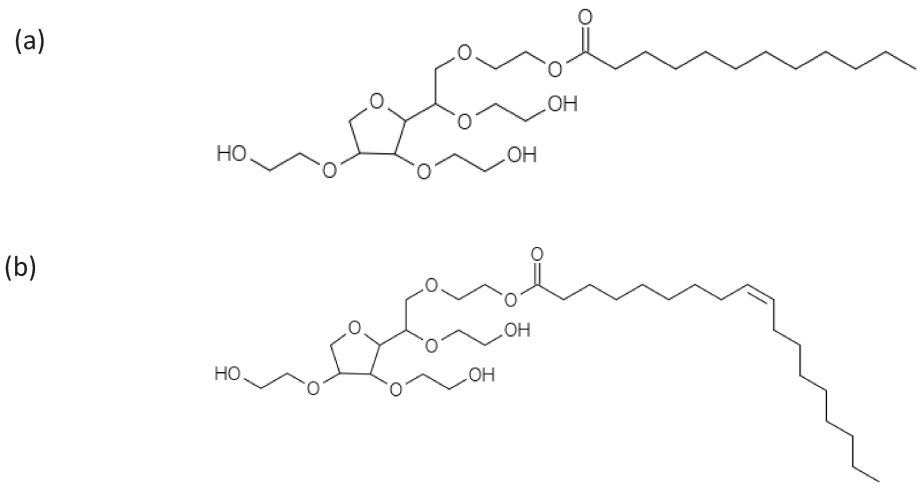


Figura 5. 4: Estrutura química dos surfactantes da família dos Tweens: (a) Tween 20; (b) Tween 80.

Soluções aquosas das raízes de *Panax notoginseng* contendo saponinas apresentaram uma RTSA de 44,4% em sua concentração micelar crítica (CMC= 0,339 mg.cm^{-3}) (XIONG *et al.*, 2008). Já o extrato de *Camellia oleifera* apresentou uma RTSA igual a 30,6% enquanto que o Tween 80 apresentou uma RTSA igual a 42,1%, ambos com concentração de 5,0 mg.cm^{-3} (CHEN *et al.*, 2010). Segundo a

literatura, a CMC do Tween 80 está compreendida entre 0,015 e 0,036 $mg.cm^{-3}$ (DECROOS *et al*., 2007).

Para um melhor entendimento das propriedades surfactantes dos extratos das raízes de *P. glomerata*, a caracterização química de seus constituintes é fundamental para compreender a forma com que estes extratos atuam, uma vez que pode haver efeito sinérgico ou antagônico entre os constituintes dos extratos. Sendo assim, o teor de proteínas dos extratos das raízes de *P. glomerata* foi determinado a fim de verificar se há efeitos de interação entre as proteínas e saponinas presentes nestes extratos através de suas propriedades surfactantes (Tabela 5.2). Os extratos das raízes de *P. glomerata* apresentaram teores de proteínas variando entre 3,7 e 5,5% (b.s.).

5.3.3 Interação entre saponinas-proteínas nas propriedades emulsificantes dos extratos

Misturas de proteínas e surfactantes de baixa massa molecular são comumente usadas para estabilização de espumas e emulsões em diversos ramos da indústria, tais como alimentos, cosméticos e fármacos (KOSTMAR *et al*., 2008). Enquanto os surfactantes reduzem a tensão superficial de emulsões, as proteínas as estabilizam predominantemente pela formação de finas camadas interfaciais. Entretanto, frequentemente, efeitos sinérgicos ou antagônicos são observados nas misturas entre proteínas e surfactantes devido às interações mútuas entre seus constituintes (WOJCIECHOWSKI *et al*., 2011).

Neste trabalho foi verificado que a polaridade dos solventes estudados não influenciou o teor de proteínas dos extratos obtidos, enquanto que a atividade surfactante dos extratos diminuiu, como é possível observar na Figura 5.5 e na Figura 5.6. Portanto,

as proteínas presentes nos extratos das raízes de *P. glomerata* não exerceram efeito sobre sua a atividade surfactante.

Para que haja efeito sinérgico entre proteínas e saponinas, estas precisam estar complexadas e, sendo assim, uma interação eletrostática entre estes compostos deverá existir (KRAGEL *et al.*, 2003). A interação entre proteína e surfactante depende das concentrações com que estes compostos estão presentes na solução e das condições do meio, como temperatura, força iônica e pH (MILLER *et al.*, 2000). Com base nestes aspectos, é provável que não tenha ocorrido efeito entre as proteínas e as saponinas presentes nos extratos das raízes de *P. glomerata* em função das condições desfavoráveis do meio para isso.

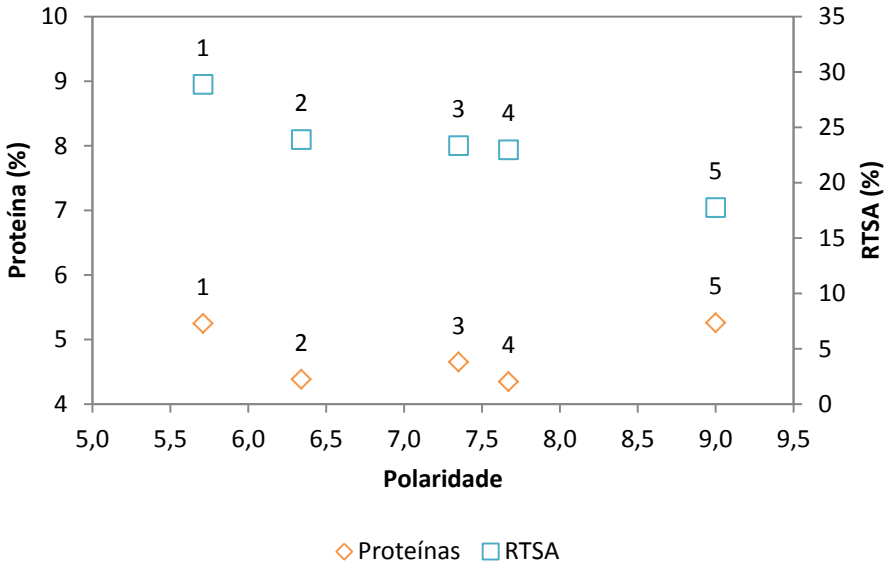


Figura 5.5: Relação entre o teor de proteínas extraídas com solventes de diferentes polaridades e sua capacidade de RTSA. Rótulos de dados: 1: IsoC_3OH:água (70:30); 2: EtOH:água (70:30); 3: IsoC_3OH:água (35:65); 4: EtOH:água (35:65) 5: água.

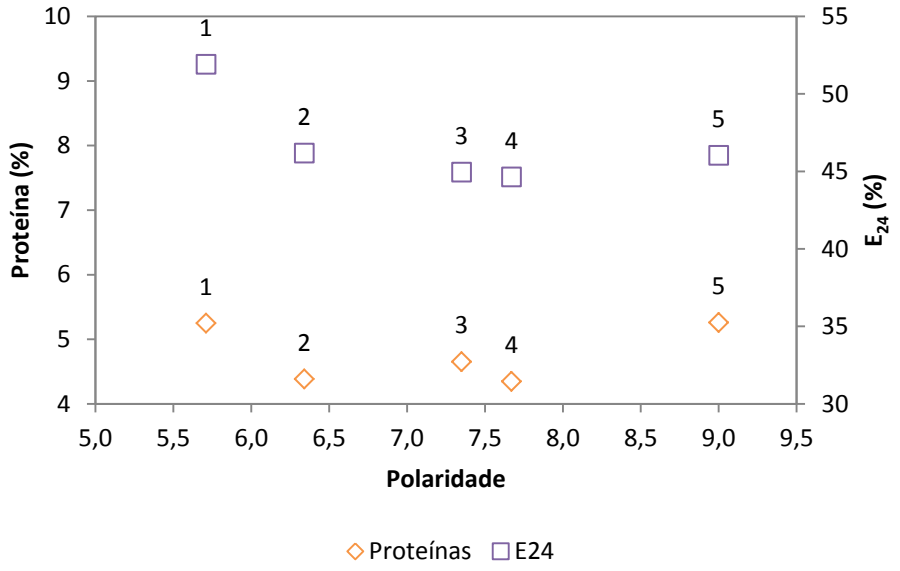


Figura 5.6: Relação entre o teor de proteínas extraídas com solventes de diferentes polaridades e os valores de E_{24}. Rótulos de dados: 1: IsoC_3OH:água (70:30); 2: EtOH:água (70:30); 3: IsoC_3OH:água (35:65); 4: EtOH:água (35:65) 5: água.

5.4 Otimização do processo de extração por percolação em leito fixo das raízes de *P. glomerata*

5.4.1 Cinéticas de extração

A partir dos resultados obtidos previamente em relação a X_0, E_{24} e RTSA, três condições foram selecionadas para realização do estudo cinético e estão apresentadas na Tabela 5.7. Para definir as condições de extração, foram escolhidos os níveis que maximizaram cada um dos parâmetros avaliados. Ainda, foi realizado mais uma cinética (Cinética IV), desta vez sem ultrassom para fins de comparação, a qual empregou água como solvente por este ter proporcionado os maiores rendimentos de extração, possuir

menor custo e ser reconhecido como solvente universal sem apresentar restrições para aplicação industrial.

O estudo cinético fornece informações sobre o tempo de ciclos de extração de um processo industrial. Tempos diferentes de ciclo podem ser empregados para o mesmo rendimento final, dependendo do comportamento cinético da extração conforme as condições de processo. Uma vez que a relação de solvente: massa de matéria-prima utilizada nos experimentos de rendimento global foi pré-determinado, diferenças no comportamento cinético podem surgir ao se analisar as curvas de extração (PRADO, 2010).

Tabela 5.7: Condições de extração empregadas nas cinéticas

	Solvente (Polaridade)	Temperatura (°C)	Método de extração
Cinética I	IsoC_3OH:água (70:30) (5,7)	60	PEUP
Cinética II	IsoC_3OH:água (70:30) (5,7)	60	PEUI
Cinética III	Água (9,0)	60	PEUP
Cinética IV	Água (9,0)	60	PE

PE: percolação; PEU: percolação assistida por ultrassom durante toda extração; PEUI: percolação assistida por ultrassom durante o início da extração; PEUP: percolação assistida por ultrassom com pulsos a cada 2 minutos

Na Figura 5.7 estão apresentadas as OECs para as condições de extração selecionadas para as Cinéticas I e II. Estas foram plotadas na mesma figura para fins de comparação, já que ambas foram realizadas com mesmo solvente e temperatura e diferiram apenas no método de extração. Pode-se observar que ambas apresentaram o mesmo comportamento de extração e não houve diferença significativa entre os rendimentos obtidos com os diferentes métodos empregados.

Quando a relação de volume de solvente por massa de matéria-prima (S/F) atingiu 10, a qual foi empregada para determinação do X_0 nos experimentos do planejamento, em torno de 50% do total de extrato obtido em 48 minutos de processo foi recuperado, em ambos os casos, para as Cinéticas I e II. Logo, os experimentos

realizados com S/F=10 não foram suficientes para exaurir a matéria-prima. A extração exaustiva foi obtida apenas quando o S/F atingiu 36, onde aproximadamente 95 e 89% do total de extrato obtido no processo foram recuperados para a Cinética I e para a Cinética II, respectivamente.

Para a extração de macela (*Achyrocline satureioides*), por percolação em leito fixo, utilizando etanol como solvente, S/F = 20 foi suficiente para exaurir a matéria-prima (TAKEUCHI, 2009). Já para extração de *Curcuma longa* também por percolação em leito fixo, utilizando EtOH: IsoC_3OH (1:1), o processo foi interrompido com S/F= 10, no entanto, este não foi suficiente para esgotar a matriz vegetal (BRAGA, 2005). Esses dados demonstram que cada matriz vegetal, dependendo do solvente empregado e das condições de operação, requer uma quantidade de solvente específica para ser exaurida.

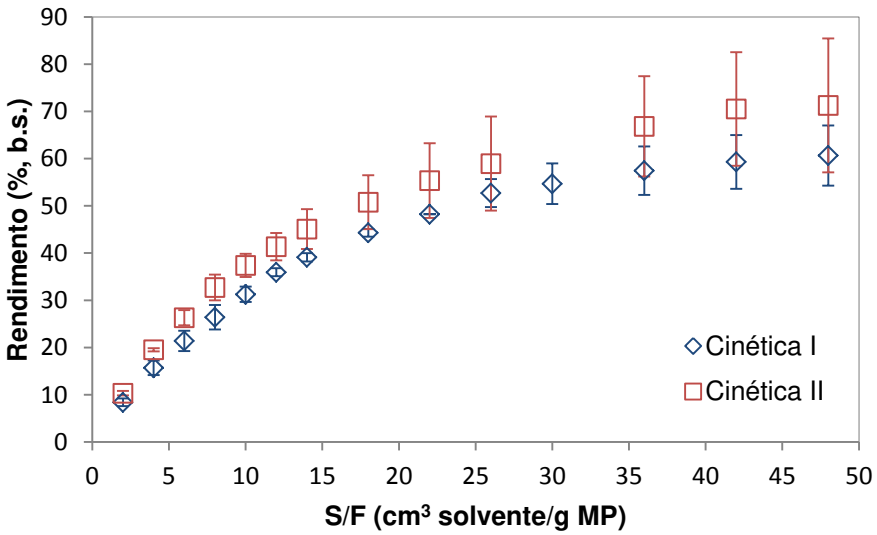


Figura 5.7: Curvas de extração das raízes de *P. glomerata* utilizando IsoC_3OH:água (70:30) como solvente, 60°C e PEUP (Cinética I) e PEUI (Cinética II) como método de extração.

A Figura 5.8 apresenta as OECs das condições de extração das Cinéticas III e IV. Estas também foram plotadas na mesma figura para fins de comparação porque foi

empregado o mesmo solvente de extração. Observa-se que ambas as condições de extração empregadas apresentaram comportamento cinético semelhante.

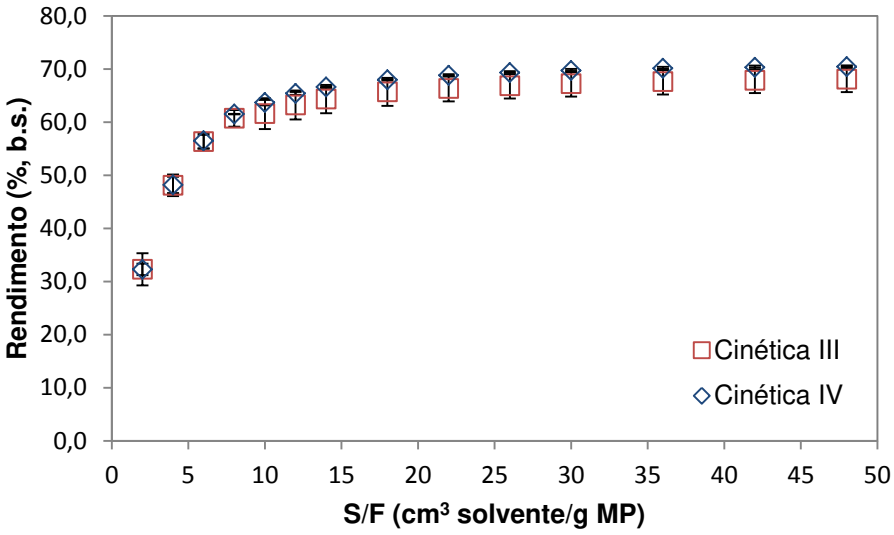


Figura 5.8: Curvas de extração das raízes de *P. glomerata* utilizando água como solvente, 60°C e PEUP (Cinética III) e PE (Cinética IV) como método de extração.

Observa-se também que, quando o S/F=8, em torno de 90% do total de extrato foi recuperado em ambos os casos. Logo, neste caso, os experimentos de X_0 realizados nestas condições utilizando S/F=10 foram capazes de exaurir a matéria-prima. Este fato pode ser atribuído ao solvente utilizando, uma vez que a água possui maior facilidade de solubilização dos compostos presentes na matéria-prima em relação à mistura de $IsoC_3OH$:água (70:30, v/v).

5.4.1.1 Determinação dos parâmetros cinéticos

Além de descrever o comportamento cinético da extração, a construção de OECs fornece informações necessárias para o cálculo de parâmetros cinéticos, os quais por sua

vez são utilizados na modelagem matemática do processo e para o cálculo do custo de manufatura (PRADO, 2010).

Nas Figuras 5.9-5.12 estão apresentadas as OECs das quatro condições de operação estudadas nas cinéticas e seus modelos ajustados. As OECs foram ajustadas usando um *spline* de duas retas. A primeira reta representa o período de taxa de extração constante (*CER – Constant Extraction Rate*). A inclinação da primeira reta representa a taxa de transferência de massa da etapa CER (M_{CER}) e o tempo correspondente à intersecção entre as duas retas é o t_{CER}, que representa a duração da etapa CER, podendo ser considerado o tempo mínimo de um processo de extração. A concentração de extrato na saída do leito (Y_{CER}) é calculada como a razão entre M_{CER} e a vazão de solvente. R_{CER} é o rendimento obtido durante a etapa CER. A Tabela 5.8 apresenta os parâmetros cinéticos ajustados para as OECs.

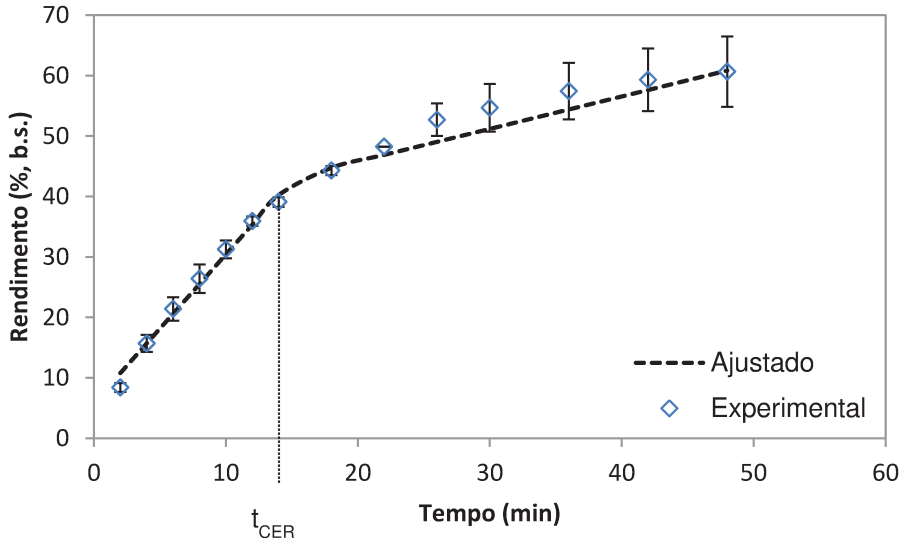


Figura 5. 9: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando $IsoC_3OH$:água (70:30), 60°C e PEUP como método de extração (Cinética I).

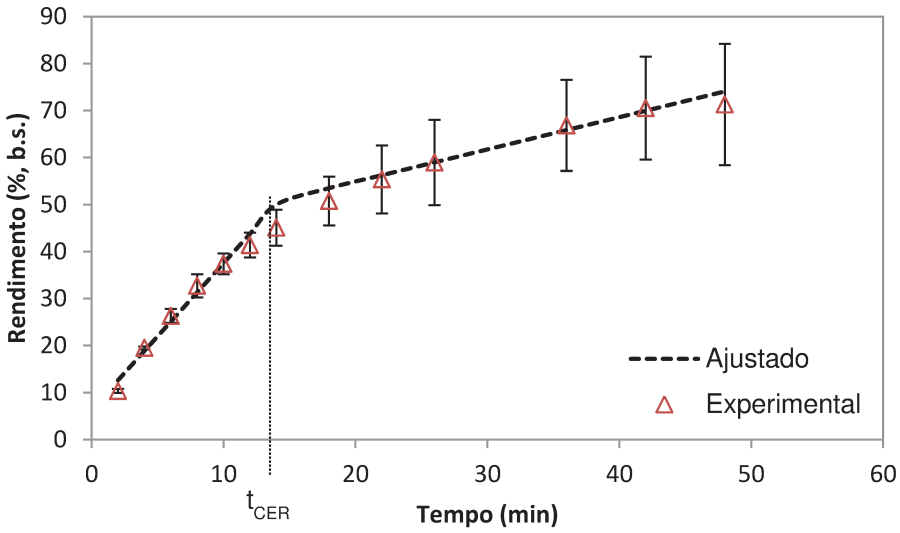


Figura 5. 10: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando $IsoC_3OH$:água (70:30), 60°C e PEUI como método de extração (Cinética II).

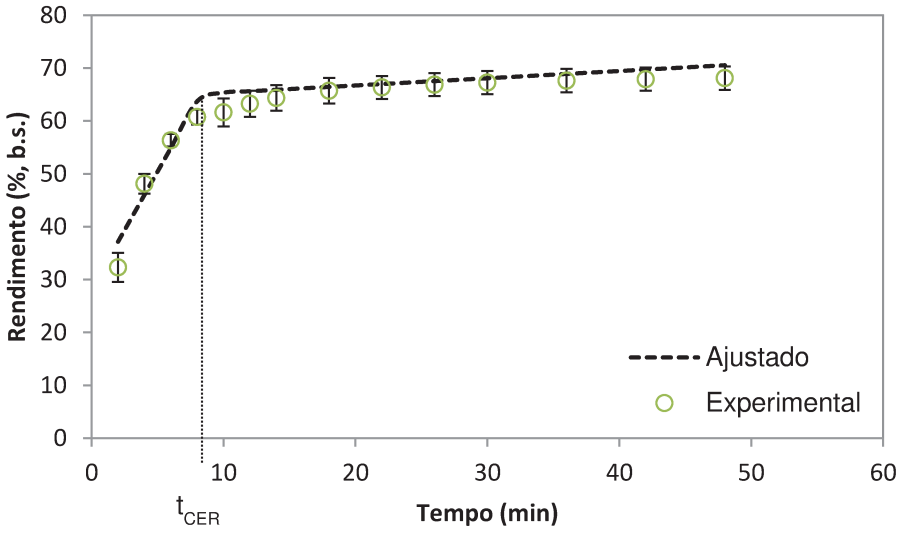


Figura 5. 11: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando água, 60°C e PEUP como método de extração (Cinética III)

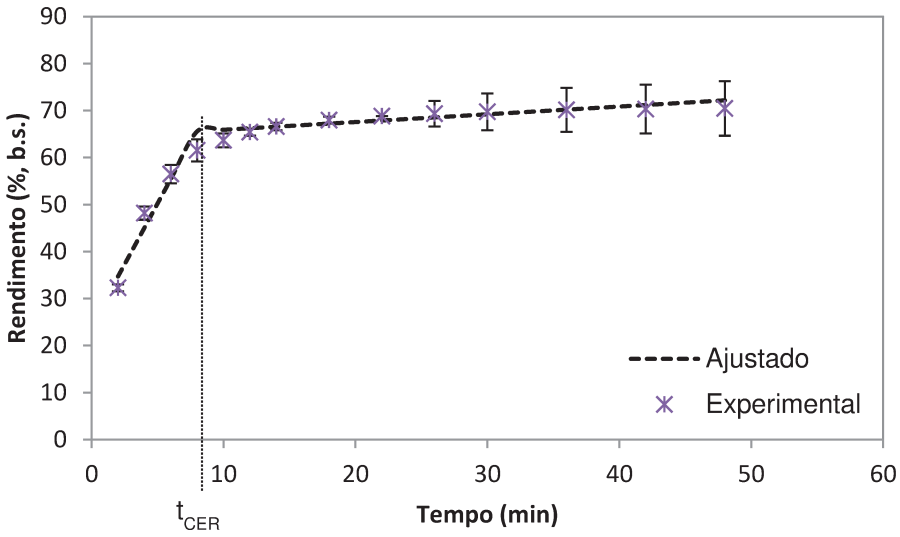


Figura 5. 12: Ajuste das retas à curva de extração das raízes de *P. glomerata* obtida utilizando água, 60°C e PE como método de extração (Cinética IV)

Tabela 5.8: Parâmetros cinéticos ajustados para as curvas de extração das raízes de *P. glomerata*.

Parâmetros de processo	Condições de operação			
	Cinética I	Cinética II	Cinética III	Cinética IV
t_{CER} (min)	15 ± 7	14 ± 4	8,3 ± 0,1	8,0 ± 0,9
M_{CER} (g.min^{-1})	6 ± 1	6 ± 2	28,3 ± 0,5	24 ± 3
Y_{CER} (g extrato.cm^{-3} solvente)	1,3±0,2	1,4 ± 0,5	6,3 ± 0,3	5,4 ± 0,7
R_{CER} (%, b.s.)	42±11	50±11	65±1	65,1±0,5

Analisando os valores de t_{CER} ajustados para as Cinéticas I e II, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. Sendo assim, para a escolha do método mais vantajoso deve- se optar por aquele que possuir o menor gasto energético: aplicação de ultrassom no início da extração ou aplicação de ultrassom com pulsos. Portanto, é necessário realizar um balanço de energia do processo. O mesmo foi observado para as Cinéticas III e IV, ou seja, neste caso pode-se dizer que o emprego do ultrassom não influenciou nos parâmetros cinéticos quando água foi empregada como solvente de extração.

5.4.1.2 Quantificação de β-ecdisona

Ao comparar os rendimentos obtidos nas Cinéticas I e II, com aqueles obtidos nas Cinéticas III e IV e seus respectivos comportamentos cinéticos, parece evidente que a água como solvente apresenta vantagens sobre o IsoC_3OH:água (70:30). No entanto, o rendimento não pode ser considerado como parâmetro comparativo isoladamente, pois um maior rendimento não reflete, necessariamente, em vantagem, uma vez que outros compostos além dos de interesse podem ser co-extraídos, levando à diluição dos compostos alvo. Portanto, é necessário analisar rendimento e composição química do extrato obtido, a fim de determinar as condições de processo que melhor satisfazem a obtenção dos compostos de interesse (MEIRELES, 2008).

Assim, a quantificação da β-ecdisona foi realizada nos extratos obtidos nas Cinéticas I a IV. A β-ecdisona é a saponina mais representativa das raízes de *P. glomerata*, pois aparece em maior quantidade e é também considerada marcador de qualidade da planta (ZIMMER *et al.*, 2006).

As OECs obtidas estão apresentadas na Figura 5.13, onde observa-se que quando o solvente empregado foi IsoC_3OH:água (70:30), nas Cinéticas I e II, os rendimentos de β-ecdisona foram melhores, até 27% maiores do que nas Cinética III e IV, onde empregou-se água como solvente. Esses dados confirmam a seletividade do IsoC_3OH:água (70:30) para extração das saponinas das raízes de *P. glomerata* já que os resultados obtidos para E_{24} e RTSA também foram maiores quando este solvente foi usado para extração sob o emprego do ultrassom durante o processo.

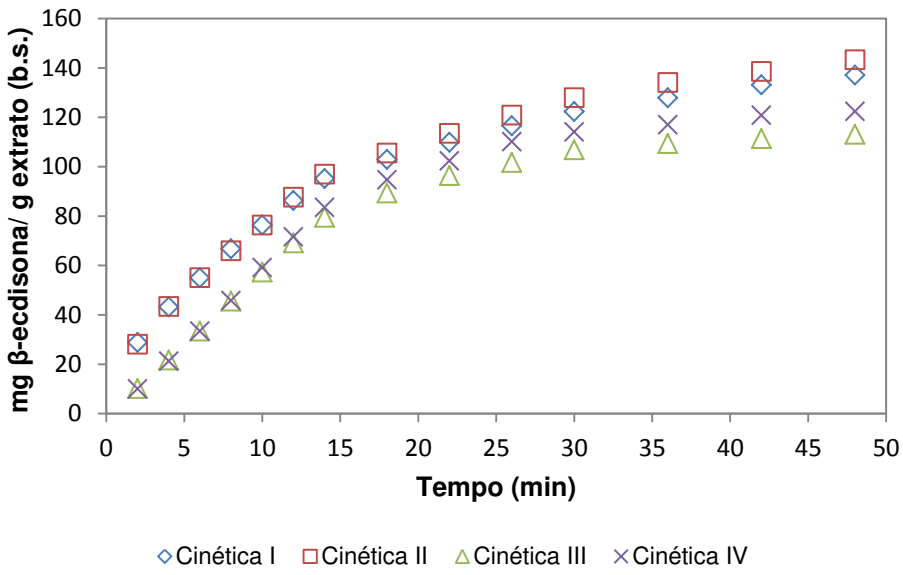


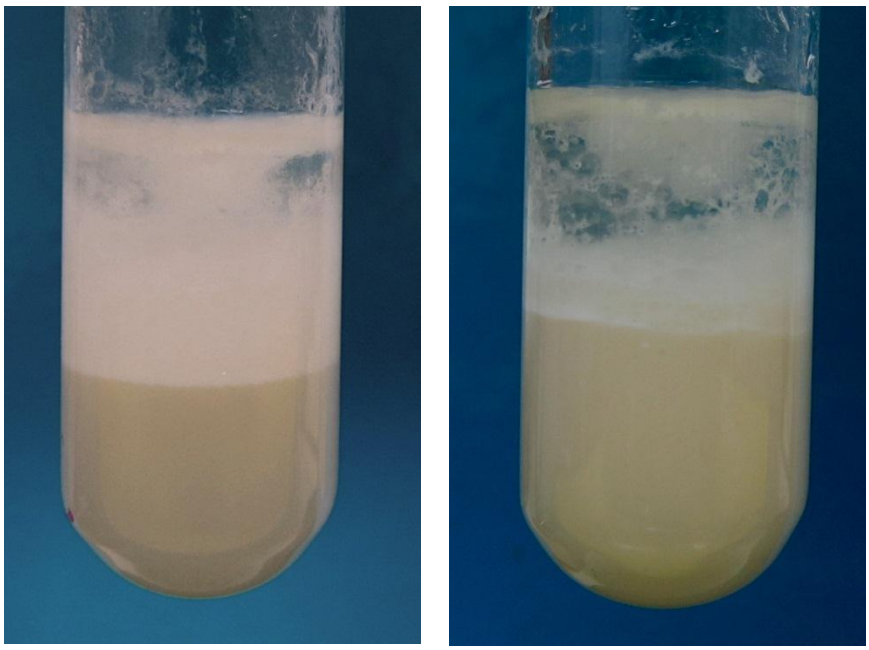
Figura 5. 13: Curvas de extração de β-ecdisona das raízes de *P. glomerata* em diferentes condições de operação. Cinética I: PEUP, 60°C, IsoC_3OH:água (70:30); Cinética II: PEUI, 60°C, IsoC_3OH:água (70:30); Cinética III: PEUP, 60°C, água e Cinética IV: PE, 60°C, água.

Sendo assim, pode-se estabelecer que as extrações realizadas com IsoC_3OH:água (70:30, v/v), 60°C e PEUI representam a condição de extração otimizada para obtenção de extratos das raízes de *P. glomerata* com resultados expressivos para RTSA e E_{24}, o que pode ser atribuído à maior quantidade de saponinas presentes nos extratos obtidos sob estas condições, já que estes apresentaram o maior teor de β-ecdisona. Ainda, podemos estabelecer que, em termos de rendimento, a condição ótima de extração corresponde a água, 60°C e PE, pois como não houve diferença significativa entre os parâmetros obtidos para as Cinéticas III e IV, a melhor condição é aquela que possui menor consumo energético, ou seja, sem o emprego do ultrassom.

A Figura 5.14 mostra as emulsões obtidas na análise do E_{24} após 48 horas, em ambas as condições otimizadas: (a) IsoC_3OH:água (70:30, v/v), 60°C, PEUI e (b) água, 60ºC, PE, onde a fase superior representa a camada emulsionada. Pode-se observar que

a emulsão obtida na condição (a) apresenta uma maior camada emulsionada e com melhor aspecto do que a emulsão obtida na condição (b).

Desta forma, fica evidente que as propriedades surfactantes dos extratos das raízes de *P. glomerata* estão diretamente relacionadas ao teor de saponinas (β-ecdisona) presente, já que os extratos que apresentaram os melhores resultados de E_{24} e RTSA foram aqueles que apresentaram os maiores teores de β-ecdisona. Este fato corrobora os resultados esperados, uma vez que as saponinas são compostos anfifílicos e, consequentemente, quanto mais saponinas presentes no extrato, maior será a sua atividade surfactante.



(a) (b)

Figura 5.14: Emulsões obtidas na análise de E_{24} após 48h nas seguintes condições de extração: (a) IsoC_3OH:água (70:30, v/v), 60°C, PEUI e (b) água, 60ºC, PE.

Enquanto os extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos neste trabalho apresentaram teores de β-ecdisona variando entre ~ 11 e 14% (b.s.), Leal *et al. (*2010)

obtiveram extratos da mesma planta com 4,6% (b.s.) de β- ecdisona utilizando extração supercrítica com CO_2 +etanol como solvente de extração. Extratos das raízes de *P. glomerata* contendo 20,5% (b.s.) de β-ecdisona foram obtidos por Sohxlet utilizando acetato de etila como solvente (ZIMMER *et al.*, 2006).

Os rendimentos de β-ecdisona em termos da massa de matéria-prima em base seca obtidos por outros autores variaram entre 0,35 e 0,43% b.s. (FREITAS *et al.*, 2004; ZIMMER *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2009). As variações no teor de β-ecdisona podem ser decorrentes das variações associadas à matéria-prima, tais como modo de cultivo da planta e de armazenamento e também das técnicas de extração empregadas (FLORES *et al.*, 2009; GUERREIRO *et al.*, 2009).

O rendimento de β-ecdisona em termos da massa de matéria-prima em base seca obtido utilizando CO_2 supercrítico (90%) e etanol (10%) (30°C/200 bar) como solvente de extração das raízes de *P. glomerata* foi de 0,013% (LEAL *et al.*, 2010) sendo 28 vezes maior do que o rendimento apresentado na Patente US6224872 (SHIBUYA *et al.*, 2001), porém 18 vezes menor do que o rendimento obtido neste trabalho, na condição da Cinética II que apresentou o melhor resultado (0,23%).

A matéria-prima utilizada no estudo desenvolvido por Leal *et al.* (2010) pertence ao mesmo lote utilizado neste trabalho e, portanto, o incremento de 18 vezes no rendimento de β-ecdisona obtido neste trabalho pode ser atribuído ao método de extração empregado ($IsoC_3OH$:água [70:30], 60º, PEUI), comprovando a maior eficiência do mesmo em relação ao empregado por Leal *et al.* (2010) que utilizou CO_2 supercrítico e etanol (90:10) a 30ºC e 200 bar.

Comercialmente, extratos de *Yucca schidigera* e *Quillaja saponaria* estão entre as principais fontes de saponinas. A empresa Desert King (Viña del Mar, Chile) comercializa extratos aquosos de *Quillaja saponaria* com diferentes graus de purificação,

sendo que o produto com menor pureza, chamado de QL 1000 é comercializado na forma líquida e possui 9% de saponinas em base úmida (b.u.). O produto intermediário (QL Ultra) é comercializado também sob a forma líquida contendo 13% (b.u.) de saponinas e é obtido após ser submetido à ultrafiltração. Ambos, QL 1000 e QL Ultra, são comercializados como agentes surfactantes e formadores de espuma para aplicação em alimentos e bebidas. Já o produto com maior pureza (Supersap) é um pó contendo 91% (b.u) de saponinas sendo que o restante, ~ 8% (b.u.) é umidade e é destinado para aplicação na indústria farmacêutica. Ainda, cápsulas contendo extrato de *P. glomerata* padronizado contendo 0,96% (b.s.) de β-ecdisona são comercializadas pela empresa Herbarium (Colombo, PR, Brasil) sob indicação de auxiliar para a memória.

Com base nestes aspectos, os dados obtidos neste trabalho são promissores, uma vez que os extratos das raízes de *P. glomerata* apresentaram teores expressivos de saponinas, equivalentes aos encontrados em produtos comercializados atualmente, podendo ser empregados tanto na indústria de alimentos como na indústria de fármacos e cosméticos.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter condições de extração das raízes de *P. glomerata* otimizadas em termos das propriedades surfactantes dos extratos ($IsoC_3OH$:água [70:30, v/v], 60°C e percolação assistida por ultrassom no início da extração [PEUI]) e em termos de rendimento de extração (água, 60°C e percolação).

Nas condições de extração estudadas, não foi observado interação entre as proteínas e saponinas presentes nos extratos das raízes de *P. glomerata.* Portanto, inferiu-se que o meio não propiciou condições favoráveis para que houvesse interação entre estes constituintes, ou ainda, que o tipo de proteínas presentes nestes extratos não possuem capacidade de interação com as saponinas.

Os parâmetros cinéticos ajustados para as condições de extração empregadas nas cinéticas mostram que a água extrai a maior quantidade de extrato e é capaz de reduzir praticamente pela metade o tempo de extração necessário em relação ao $IsoC_3OH$:água (70:30). No entanto, ao passo que se obtêm ganhos em termos de recuperação de extrato, perde-se propriedades surfactantes uma vez que os extratos obtidos com água apresentaram os menores valores de Índice de Emulsificação (E_{24}) e Redução da Tensão Superficial da Água (RTSA).

A avaliação do teor de β-ecdisona nos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos nas condições de extração das cinéticas, comprovou a seletividade do solvente $IsoC_3OH$:água (70:30) em relação a extração de β-ecdisona, uma vez que os extratos obtidos com este solvente apresentaram maiores teores deste composto e também, os maiores valores de E_{24} e RTSA e, ainda, que o emprego do ultrassom favorece a recuperação de saponinas.

Quando utilizou-se a condição de extração otimizada obtida neste trabalho ($IsoC_3OH$:água [70:30], 60º, PEUI), extratos das raízes de *P. glomerata* contendo ~14% (b.s.) de β-ecdisona foram obtidos, o que demonstra a potencialidade deste método de extração na recuperação de saponinas, uma vez que produtos comerciais apresentam entre 9 e 13% (b.u.) de saponinas para aplicação industrial como surfactantes e cápsulas contendo extrato de *P. glomerata* padronizado contendo 0,96% de β-ecdisona são comercializadas como fármacos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a concentração micelar crítica (CMC) dos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos nas condições otimizadas indicadas neste trabalho, para comparar com os surfactantes comerciais disponíveis;
- Determinar a composição dos extratos das raízes de *P. glomerata* em termos de açúcares, para acrescentar às determinações realizadas neste trabalho e avaliar possíveis efeitos de interação entre os constituintes dos extratos sobre as propriedades emulsificantes/surfactantes;
- Avaliar os efeitos da composição do meio, como pH e presença de sais por exemplo, sobre as propriedades emulsificantes/surfactantes dos extratos das raízes de *P. glomerata*;
- Realizar estudo cinético empregado IsoC_3OH:água (70:30) como solvente, 60°C e PE como método de extração para poder comparar com as cinéticas utilizando este solvente realizadas neste trabalho e avaliar o efeito do ultrassom acerca da melhoria na eficiência de extração (1) empregado ultrassom no início da extração e (2) empregando ultrassom com pulsos durante toda extração;
- Comparar os resultados obtidos neste trabalho com outros estudos empregando diferentes métodos de extração, como Extração com Líquidos Pressurizados (PLE com água).

8. REFERÊNCIAS

ALVIM, N. R.; CUNHA, K. C. T.; CORTEZ, L. E. R.; BAZOTTE, R. B.; MARQUES, L. C.; CORTEZ, D. A. G. Efeitos biológicos de *P.glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *P. paniculata* (Martiuz) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 349-352, 1999.

ANDREUCCETTI, C.; CARVALHO, R. A.; GALICIA-GARCÍA, T.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F.; GROSSO, C. R. F. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible films. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 129-136, 2011.

ASAE. **Standards Methods of Determination and Spressing Fineness of Feed Materials by Sieving.** ASAE, 1998, S319.3, 547.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.** 16 ed. Washington, 1995.

BARTASSON, M. C. **Desenvolvimento de um creme cosmético contendo saponinas extraídas da hera como ativos e a aplicação de nanotecnologia**. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Brasil. BRPI0905267-4 A2**:** 6 p. 2011.

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMANIA, A.; SMANIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (Citrus sinensis L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-141, Nov 2010.

BI, L.; TIAN, X.; DOU, F.; HONG, L.; TANG, H.; WANG, S. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of Aralia taibaiensis. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 234-240, 2012.

BRAGA, M. E. M. **Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. E *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração,**

composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. 2005. 200 (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CAMACHO, G. A.; LOBO, J. I. S. **Saponinas de Quillaja saponaria molina como estabilizante da espuma de cerveja**. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Brasil: Universidad Mayor. BRPI0903559-1 A2**:** 23 p. 2010.

CANTO, G. S.; TRETER, J.; YANG, S.; BORRÉ, G. L.; PEIXOTO, M. P. G.; ORTEGA, G. G. Evaluation of foam properties of saponin from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) fruits. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 237-243, 2010.

CHEN, Y.-F.; YANG, C.-H.; CHANG, M.-S.; CIOU, Y.-P.; HUANG, Y.-C. Foam properties and detergent abilities of the saponins from Camellia oleifera. **International Journal Molecular Science**, v. 11, p. 4417-4425, 2010.

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.

CLAUDE, E. J. **Procede de fabrication d'une emulsion aqueuse d'une substance active huileuse pour application cosmetique, alimentaire ou pharcaceutique**. Institut National de la Propriété Industrielle. France: Cabinet Bloch & Bonnetat FR2945936**:** 10 p. 2009.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface- active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-299, 1987.

DE-PARIS, F.; NEVES, G.; SALGUEIRO, J. B.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; RATES, S. M. K. Psychopharmacological screening of Pfaffia glomerata Spreng. (Amarathanceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 261-269, 2000.

DECROOS, K.; VINCKEN, J.-P.; VAN KONINGSVELD, G. A.; GRUPPEN, H.; VERSTRAETE, W. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. **Food Chemistry**, v. 101, p. 324-333, 2007.

DEN BRABER, A. A.; MOSKAL, J. R. **Tea seed residues and natural tea saponin products**. European Patent Application. Holanda: Fenka International Holding B.V. EP2002721 A2**:** 12 p. 2008.

DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, chacarterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 113, p. 9, 2009.

DONG HUANG, S.; DONG FENG QI, S. **Aglycon dammarane sapogenins, their use as anti-cancer agents, and a process for producing same**. United States Patent. Canadá: Panagin Pharmaceuticals, Inc. US 6949523 B2**:** 15 p. 2005.

ENGELBERTH, A. S.; CLAUSEN, E. C.; CARRIER, D. J. Comparing extraction methods to recover ginseng saponins from American ginseng (*Panax quinquefolium*), followed by purification using fast centrifugal partition chromatography with HPLC verification. **Separation and Purification Technology**, v. 72, p. 1-6, 2010.

ESTRADA, A.; REDMOND, M. J.; LAARVELD, B. **Quinoa saponin compositions and methods of use**. United States Patent. Canada: University of Saskatchewan. US 5597807**:** 15 p. 1997.

FLORES, R.; CEZAROTTO, V.; BRONDANI, D.; GIACOMELLI, S. R.; NICOLOSO, F. T. Analysis of β-ecdysone from in vivo and in vitro cultured plants of Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen using Thin-Layer Chromatography. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 368-371, 2009.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; BRONDANI, D.; MALDANER, J.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S. R. Extraction of ecdysterone from roots of Brazilian ginseng. **Ciencia Rural**, v. 39, n. 4, 2009.

FRANCISCO, C.; MARTINEZ, G. **Utilisation par voie topique ou par inhalation d'une compostion comprenant des oligosaccharides et une saponine or un acide aminé basique**. European Patent Office. França: Laboratoires G Pharm. EP 1464330 A1**:** 12 p. 2004.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; RIECK, L.; DE MORAES SANTOS, C. A.; JÚNIOR, C. C.; MING, L. C.; GARCIA CORTEZ, D. A.; MARQUES, M. C. A. Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. **Life Sciences**, v. 74, n. 9, p. 1167-1179, 2004.

FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; TWARDOWSCHY, A.; SANTOS, A. C. D.; MAYER, B.; LUIZ, A. P.; SANTOS, C. A. M. D.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. D. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of Pfaffia glomerata in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 468-472, 2009.

GHAGI, R.; SATPUTE, S. K.; CHOPADE, B. A.; BANPURKAR, A. G. Study of functional properties of *Sapindus mukorossi* as a potential bio-surfactant. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 5, p. 530-533, 2011.

GOSMANN, G.; GATTUSO, S.; FENNER, R.; PACHECO, E. F.; FERRAZ, A.; SAVI, L. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.; GNERRE, C.; TESTA, B.; RATES, S. M. K. Botanical (morphological, micrographic) and pharmacological characteristics of *Pfaffia* species (Amaranthaceae) native to South Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 141-147
2003.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; BALSEVICH, J.; MAZZA, G. Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 2, p. 619-630, 2007.

GUÇLU-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 231-258, 2007.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAĞ, Ö.; MAZZA, G. Extraction of saponins and cyclopeptides from cow cockle seed with pressurized low polarity water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1600-1606, 2008.

GUERREIRO, C. P. V.; MARQUES, M. O. M.; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N.; MING, L. C. Produção de beta-ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em função da adubação orgânica em 6 épocas de crescimento. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 392-398, 2009.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física, volume 2: gravitação, ondas e termodinâmica**. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: LTC, 2012. 296

HAMAJIMA, T.; AOYAGI, M.; YAHARA, S.; SONOBE, K.; KAMOI, A. **Saponin with suppressed bitter taste**. United States Patent Application Puplication. Japan: House Foods Corporation. US2011/0262614 A1**:** 7 p. 2011.

HANDA, S. S. An overview of extraction techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA, S. S.;KHANUJA, S. P. S.*, et al* (Ed.). **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste, Itália: ICS-UNIDO, 2008. p.266.

HICKIE, R.; BALSEVICH, J.; RAMIREZ-EROSA, I.; DUNLOP, D.; BISHOP, G.; DEIBERT, L.; ARNISON, P. **Saponin Extract from saponaria ssp. and uses thereof**. World Intellectual Property Organization. Canadá: Nacional Research Counsil of Canadá University Saskatchewan. WO 2009/117828 A1**:** 88 p. 2009.

INOUE, M. **Enriched nutritious food product comprising powder of ginseng and method for producting powder of ginseng**. United State Patents. Japan: Iwatani Sangyo Kabushiki Kaisha. US 5230 889**:** 6 p. 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v.1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3 ed.* São Paulo: IMESP, 1985, p.21-22.

IVANOVA, A.; LAZAROVA, I.; MECHKAROVA, P.; TCHORBANOV, B. HPLC method for screening of steroidal saponins and rutin as biologically active compunds in *Tribulus terrestris* L. **Biotechnol. & Biotechnol.**, p. 129-133, 2010.

KENSIL, C. A. **Saponin compositions and uses thereof**. United States Patents. USA: Antigenics Inc. US 6524584 B2**:** 21 p. 2003.

KENSIL, C. A.; MARCIANI, D. J. **Saponin Adjuvant**. USA: Cambridge Biotech Corporation. US 5057 540**:** 40 p. 1991.

KIM, B. C.; KIM, J. H.; YUN, S. J.; NOH, E. J.; JANG, G. U.; HAN, C.-K.; CHO, Y.-B.; KWAK, W.-J. **Anti-gastritis and anti-ulcer agent containing momordicae semen extract and momordica saponin i isolated from de same**. World Intellectual Property Organization. Korea: SK CHEMICALS CO, LTD. WO 2007/073096 A1**:** 29 p. 2007.

KIM, S.-J.; MURTHY, H. N.; HAHN, E.-J.; LEE, H. L.; PAEK, K.-Y. Parameters affecting the extraction of ginsenosides from the adventitious roots of ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer). **Separation and Purification Technology**, v. 56, n. 3, p. 401-406, 2007.

KIM, Y. D.; HA, B. J. **Quaternary ammonium-substituted saponin ethers**. United State Patents. Korea: Pacific Chemical Co. Ltd. US 5182373**:** 15 p. 1993.

KOSTMAR, C.; GRIGORIEV, D. O.; XU, F.; AKSENENKO, E. V.; FAINERMAN, V. B.; LESER, M. E.; MILLER, R. Equilibrium of adsorption of mixed milk protein/surfactant solutions at water/air interface. **Langmuir**, v. 24, p. 13977-13984, 2008.

KRAGEL, J.; O'NEILL, M.; MAKIEVSKI, A. V.; MICHEL, M.; LESER, M. E.; MILLER, R. Dynamics of mixed protein-surfactant layers adsorbed at the water/air and water/oil interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, p. 107-114, 2003.

KVASENKOV, O. I. **Method for production of food emulsifier**. Federal Service for Intellectual Property, Patents and Trademarks. Russian. RU 2253 290 C1**:** 4 p. 2005.

KWON, J.-H.; BÉLANGER, J. M. R.; PARÉ, J. R. J.; YAYLAYAN, V. A. Application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. **Food Research International**, v. 36, n. 5, p. 491-498, 2003.

KWON, J. H.; LEE, G. D.; BÉLANGER, J. M. R.; PARÉ, J. R. J. Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAP). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 615-622, 2003.

LEAL, P. F.; ALMEIDA, T. S.; PRADO, G. H. C.; PRADO, J. M.; MEIRELES, M. A. A. Extraction Kinetics and Anethole Content of Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Anise Seed (*Pimpinella anisum*) Extracts Obtained by Soxhlet, Ultrasound, Percolation, Centrifugation, and Steam Destillation. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 1848-1856, 2011.

LEAL, P. F.; KFOURI, M. B.; ALEXANDRE, F. C.; FAGUNDES, F. H. R.; PRADO, J. M.; TOYAMA, M. H.; MEIRELES, M. A. A. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 38-45, Jul 2010.

LEE, J. H.; JEON, J. K.; KIM, S. G.; KIM, S. H.; CHUN, T.; IMM, J. Y. Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 12, p. 2513-2519, Dec 2011.

LEI, L.; QUANCHENG, Z.; GUIHUA, S. **Optimization of ultrasound-assisted extraction of saponins in the flower of *Platycodon grandiflorum* by response surface methodology**. CIGR International Conference of Agricultural Engineering. Brazil 2008.

LI, H.; OHDAIRA, E.; IDE, M. Effects of ultrasound on extraction of saponin from ginseng. **Jpn, J. Appl. Phys.**, v. 33, p. 3085-3087, 1994.

LIGOR, T.; LUDWICZUK, A.; WOLSKI, T.; BUSZEWSKI, B. Isolation and determination of ginsenosides in *American ginseng* leaves and roots extracts by LC-MC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 1098-1105, 2005.

LUO, D. L.; QIU, T. Q.; LU, Q. Ultrasound-assisted extraction of ginsenosides in supercritical CO(2) reverse microemulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 3, p. 431-436, Feb 2007.

MAGALHÃES, P. M. D. Agrotecnologia para el cultivo de fafia: o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J. V. E. A. (Ed.). **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andres Bello/ CYTED, 2000. p.323-332.

MAINKAR, A. R.; JOLLY, C. I. Evaluation of commercial herbal shampoos. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p. 385-391, 2000.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S. C. S.; GÓRNIAK, S.; DAGLI, M. L. Z. Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrich tumor in its ascitic form. **Life Sciences**, v. 74, p. 473-579, 2003.

MCFADDEN, D.; SOBECK, R. **Environmentally friendly pesticide and method of use** United States Patent Application Publication. Canada. US 2006/0121126 A1**:** 12 p. 2006.

MEIRELES, M. A. A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American Plants. In: MARTINEZ, J. (Ed.). **Supercritical Fluid Extraction of nutraceuticals and bioactive compunds** Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2008. p.243-274.

MEYBECK, A.; BONTE, F.; DUMAS, M. **Cosmetic or dermatological composition containing at least one saponin of the ginsenoside type and its applications, especially for treating de hair**. United States Patents. France: LVMH Recherche. US 5663160**:** 8 p. 1997.

MILLER, R.; FAINERMAN, V. B.; MAKIEVSKI, A. V.; KRAGEL, J.; GRIGORIEV, D. O.; KAZAKOV, V. N.; SINYACHENKO, O. V. Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsoption layers at the water/fluid interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 86, p. 39-82, 2000.

MILLIOLI, V. S. **Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo**. 2009. 200 (Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ/EQ, Rio de Janeiro, RJ.

MIRONENKO, N. V.; BREZHNVA, T. A.; POYARKOVA, T. N.; SELEMENEV, V. F. Determination of some surface-active characteristics of solutions of triterpene saponin derivatives of acid oleanoic. **Pharmaceutical chemistry journal**, v. 44, n. 3, p. 157-160, 2010.

MITRA, S.; DUNGAN, S. R. Micellar Properties of Quillaja saponin. 1. Effect of temperature, salt and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1587-1595, 1997.

MITRA, S.; DUNGAN, S. R. Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of Quillaja saponin, bile salts or nonionic surfactantes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 384-394, 2001.

MONTANARI JÚNIOR, I. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando seu cultivo comercial**. 2005. 65 (Mestrado). Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agronômico, Campinas, SP.

MULET, A.; CÁRCEL, J. A.; BENETIDO, J.; SANJUAN, N. Application of Low-Intensity Ultrasonics in Dairy Industry. In: (Ed.). **Engineering and Food for the 21st century**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2002. cap. 46, p.e-book.

NAKAMURA, S.; CHEN, G.; NAKASHIMA, S.; MATSUDA, H.; PEI, Y.; YOSHIKAWA, M. Brazilian natural medicines. IV. New Noroleanane-type triterpene and ecdysterone-type sterol glycosides and melanogenesis inhibitors from the roots of *Pfaffia glomerata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 58, n. 5, p. 690-695, 2010.

NEGI, J. S.; SINGH, P.; PANT, G. N.; RAWAT, M. M. High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010. **Pharmacognosy Review**, v. 5, p. 155-158, 2011.

NETO, A. G.; COSTA, J. M. L. C.; BELATI, C. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; E SILVA, M. L. A. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 87-91, 2005.

NETO, A. G.; DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, J. M. L. C.; VINHOLIS, A. H. C.; SOUZA, G. H. B.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. E.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J. K. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of Pfaffia glomerata (Amarathanceae) roots. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7-8, p. 662-665, 2004.

NOUDEH, G. D.; SHARIFIFAR, F.; BEHRAVAN, E.; MOHAJERI, E.; ALINIA, V. Medical plants as surface activity modifiers. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 22, p. 5378-5383, 2011.

OLESZEK, W.; HAMED, A. Saponin-Based Surfactant. In: KJELLIN, M. e JOHANSSON, I. (Ed.). **Surfactants from Renewable Resources**. Chennai, India: Wiley, 2010.

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

OLMSTEAD, M. J. **Organic toothpaste containing saponin**. United States Patents. USA. US 6485711 B1**:** 3 p. 2002.

PETIT, P. R.; SAUVAIRE, Y. D.; HILLAIRE-BUYS, D. M.; LECONTE, O. M.; BAISSAC, Y. G.; PONSIN, G. R.; RIBES, G. R. Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. **Steroids**, v. 60, n. 10, p. 674-680, 1995.

PIETRO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, G.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Optimization of batch to continuous transposition: solid-liquid extraction from plants in an industrial contactor. **Chemical & Engineering Technology**, v. 29, n. 1, p. 46-51, 2006.

PRADO, J. M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leito fixo**. 2010. 283 (Doutorado). Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

PRAKASH, I.; DUBOIS, G. E. **High potency sweetener composition with saponin and compositions sweetened therewith**. World Intellectual Property Organization. USA: The Coca-Cola Company. WO 2007/061872 A2**:** 156 p. 2007.

QI, L.-W.; WANG, C.-Z.; YUAN, C.-S. Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 467-495, 2011.

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-93, 2002.

RATTANASOMBAT, S.; SANGWICHIEN, C. **Saponin extraction from *Gymnema inodorum* Decne. using ultrasound extraction technique**. TIChe International Conference. Thailand 2011.

RLESS, T.; SABATER-LUNTZEL, C.; HOMNER, C.; SCHRADER, D. **Solubilization agent for solubilizing polyphenois, flavonoids and/or diterpenoid glucosides**. European Patent Application. Germany: Symrise AG. EP 359 702 A1**:** 22 p. 2010.

RODRIGUES, V. M.; SOUSA, E.M.B.D.; MONTEIRO, A.R.; CHIAVONE-FILHO, O.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO2: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+solute+solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, v22, p.21-36, 2002.

ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; MARTÍNEZ, J. A. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2-29, 2009.

RUBIO-MORAGA, Á.; GERWIG, G. J.; CASTRO-DÍAZ, N.; JIMENO, M. L.; ESCRIBANO, J.; FERNÁNDEZ, J.-A.; KAMERLING, J. P. Triterpenoid saponins from corms of Crocus sativus: Localization, extraction and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1401-1409, 2011.

RYU, C. S.; KIM, C. H.; LEE, S. Y.; LEE, K. S.; CHOUNG, K. J.; SONG, G. Y.; KIM, B. H.; RYU, S. Y.; LEE, H. S.; KIM, S. K. Evaluation of the total oxidant scavenging capacity of saponins isolated from Platycodon grandiflorum. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 333-337, 2012.

SANCHES, N. R.; GALLETTO, R.; OLIVEIRA, C. E.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 613-617, 2001.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from Jabuticaba (Myrciaria cauliflora) skins: Yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 1, p. 23-31, Nov 2010.

SANTOS, F. M.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SCHRADER, D.; SABATER-LUNTZEL, C.; HOMNER, C. **Compositions with a surfactant system comprisin saponins, and lecithin**. European Patent Application. Germany: Symrise AG. EP 359 598 A1**:** 17 p. 2010.

SHIBUYA, T.; ARIO, T.; FUKUDA, S. **Composition**. United States Patent. Japão: Hayashibara, K. K.
Kenkyujo, S. K. US6224872**:** 13 p. 2001.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from Pfaffia glomerata. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.

SILVA, D. C. M. N. **Extração supercrítica de plantas aromáticas e medicinais (Lavanda brasileira (*Aloysia gratissima*), Quebra-pedra (*Phylanthus amarus*) e Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*)): Dados experimentais, composição e avaliação da atividade biológica** 2008. 241 (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SING, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In: Handa, S.S. (Ed.). **Extraction Techologies for medicinal and aromatic plants.** Italy: ISS UNIDO 2008, 266 p.

SKURTYS, O.; AGUILERA, J. M. Formation of O/W macroemulsions with a circular microfluid device using saponin and potato starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1810-1817, 2009.

SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**, v. 656, p. 537-547, 1993.

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

STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; STOYANOV, S.; PELAN, E. Surface rheology of saponin adsorption layers. **Langmuir**, v. 27, p. 12486-12498, 2011.

SUNDFELD, E.; KROCHTA, J. M.; RICHARDSON, T. **Aqueous process to remove cholesterol from food products**. United State Patents. USA: The Regents of the University of California. US 5370 890**:** 27 p. 1994.

TABOPDA, T. K.; MITAINE-OFFER, A. C.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, C.; MIRJOLET, J. F.; DUCHAMP, O.; NGADJUI, B. T.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Triterpenoid saponins from Hydrocotyle bonariensis Lam. **Phytochemistry**, v. 73, p. 142-147, 2012.

TAKEUCHI, T. M.; PEREIRA, C. G.; BRAGA, M. E. M.; MARÓSTICA, J., M. R.; LEAL, P. F.; MEIRELES, M. A. A. Low pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: MEIRELES, M. A. A. (Ed.). **Extracting Bioactive Compounds for Food Products**. Boca Ratun, USA: CRC Press/ Taylor & Francis Group, 2009. p.137-218

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T. J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2001.

U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, 2003. http://www.fda.gov/cder/guidance (acesso em 30/10/2012).

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: Estudo experimental e simulação de processos**. 2009. 165 (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomeratal* (Spreng.) Pedersen-Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 46-49, 2003.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERE, M. A.; MARQUES, L. C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius- Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.

VINATOTU, M; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P.I; LAZURCA, D.; MASON, T.J. The use of ultrasound for the extraction of bioactiv principles from plant materials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.4, n.2, p. 135-139, 1997.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WIERSMA, J. G. **Method and composition for food flavoring**. United States Patent. USA: Nouveau Technologies, Inc. US 5804239**:** 4 p. 1998.

WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T. R. Short- and mid-term adsorption behaviour of Quillaja Bark saponin and its mixtures with lysozyme. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 687-693, 2011.

WOOD, J. A.; BERNARDS, M. A.; WAN, W.-K.; CHARPENTIER, P. A. Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 1, p. 40-47, 2006.

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.

WU, J. Y.; WONG, K.; HO, K. O.; ZHOU, L. G. Enhacement of saponin production in Panax ginseng cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 133-138, 2005.

WU, W.-T.; CHEN, J.-W.; HSIEH, K.-J. **Method of emulsifying phytosterol by natural saponin, emulsion prepared thereby and water dispersible phytosterol powder product**. United States Patent Application Publication. Taiwan: Weckteck Biotechnology Company Limited. US 2007/ 0014819 A1**:** 4 p. 2007.

XIONG, J.; GUO, J.; HUANG, L.; MENG, B.; PING, Q. Self-micelle formation and the incorporation of lipid in the formulation affect the intestinal absorption of *Panax notoginseng*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 191-196, 2008.

ZHAN, Y. **Animal feed compositions and uses of triterpenoid saponin obtained from Camellia L. Plants**. United States Patents. China: Zhejian Agricultural University. US6007822**:** 5 p. 1999.

ZHAO, B.; ZHAO, W.; YUAN, Z. Optimization of extraction method for total saponins from *Codonopsis lanceolata*. **Traditional Medicines**, v. 7, n. 1, p. 14-17, 2012.

ZHENG, Y.; LIU, B.; CHEN, M.; CHEN, T. Supercritical fluid extraction of ecdysterone from the roots of *Achyranthes bidentata* BL. **Journal Separation Science**, v. 31, p. 1393-1398, 2008.

ZIMMER, A. R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V. L.; GOSMANN, G. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from Pfaffia glomerata. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 2, p. 450-453, 2006.

9. ANEXOS

9.1 Resultados experimentais

9.1.1 Cinéticas de extração

Tabela 9.1: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-a sob as seguintes condições: $IsoC_3OH$:água (70:30), 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,3697	8,2156	9,0171
4	4,00	0,3063	15,0222	16,4878
6	6,00	0,2296	20,1244	22,0878
8	8,00	0,2083	24,7533	27,1683
10	10,00	0,1603	28,3156	31,0780
14	14,00	0,2431	33,7178	37,0073
18	18,00	0,1862	37,8556	41,5488
22	22,00	0,1411	40,9911	44,9902
26	26,00	0,1072	43,3733	47,6049
30	30,00	0,0866	45,2978	49,7171

Tabela 9.2: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-b sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,306	6,8000	7,4634
4	4,00	0,2646	12,6800	13,9171
6	6,00	0,2075	17,2911	18,9780
8	8,00	0,1856	21,4156	23,5049
10	10,00	0,2555	27,0933	29,7366
12	12,00	0,2296	32,1956	35,3366
14	14,00	0,129	35,0622	38,4829
18	18,00	0,2145	39,8289	43,7146
22	22,00	0,1861	43,9644	48,2537
26	26,00	0,2686	49,9333	54,8049
30	30,00	0,1196	52,5911	57,7220
36	36,00	0,1373	55,6422	61,0707
42	42,00	0,093	57,7089	63,3390
48	48,00	0,0749	59,3733	65,1659

Tabela 9. 3: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética I-c sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30), 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,356	7,9111	8,6829
4	4,00	0,3274	15,1867	16,6683
6	6,00	0,2636	21,0444	23,0976
8	8,00	0,2225	25,9889	28,5244
10	10,00	0,1826	30,0467	32,9780
12	12,00	0,1461	33,2933	36,5415
14	14,00	0,1304	36,1911	39,7219
18	18,00	0,2111	40,8822	44,8707
22	22,00	0,1376	43,9400	48,2268
26	26,00	0,0972	46,1000	50,5976
30	30,00	0,0425	47,0444	51,6341
36	36,00	0,0891	49,0244	53,8073
42	42,00	0,0605	50,3689	55,2829
48	48,00	0,0357	51,1622	56,1537

Tabela 9. 4: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-a sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,4343	9,6511	10,5927
4	4,00	0,3772	18,0333	19,7927
6	6,00	0,2283	23,1067	25,3610
8	8,00	0,2786	29,2978	32,15610
10	10,00	0,2315	34,4422	37,8024
12	12,00	0,2228	39,3933	43,2366
14	14,00	0,2397	44,7200	49,0829
18	18,00	0,2921	51,2111	56,2073
22	22,00	0,3085	58,0667	63,7317
26	26,00	0,2522	63,6711	69,8829
36	36,00	0,2471	69,1622	75,9098
42	42,00	0,2	73,6067	80,7878
48	48,00	0,212	78,3178	85,9585

Tabela 9. 5: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-b sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,4008	8,9067	9,7756
4	4,00	0,4031	17,8644	19,6073
6	6,00	0,3515	25,6756	28,1805
8	8,00	0,3082	32,5244	35,6976
10	10,00	0,1606	36,0933	39,6146
12	12,00	0,1315	39,0156	42,8220
14	14,00	0,109	41,4378	45,4805
18	18,00	0,2379	46,7244	51,2829
22	22,00	0,1247	49,4956	54,3244
26	26,00	0,0926	51,5533	56,5829
30	30,00	0,1699	55,3289	60,7268
36	36,00	0,1767	59,2556	65,0366
42	42,00	0,1562	62,7267	68,8463
48	48,00	0,0563	63,9778	70,2195

Tabela 9. 6: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética II-c sob as seguintes condições: Iso-OH:água (70:30), 60°C, PEUI.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	0,4345	9,6556	10,5976
4	4,00	0,3505	17,4444	19,1463
6	6,00	0,2564	23,1422	25,4000
8	8,00	0,202	27,6311	30,3268
10	10,00	0,182	31,6756	34,7659
12	12,00	0,1339	34,6511	38,0317
14	14,00	0,1085	37,0622	40,6780
18	18,00	0,1699	40,8378	44,8220
22	22,00	0,1302	43,7311	47,9976
26	26,00	0,0976	45,9000	50,3780
30	30,00	0,0804	47,6867	52,3390
36	36,00	0,0954	49,8067	54,6659
42	42,00	0,0855	51,7067	56,7512
48	48,00	0,0375	52,5400	57,6659

Tabela 9. 7: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-a sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,4072	31,2711	34,3220
4	4,00	0,659	45,9156	50,3951
6	6,00	0,3047	52,6867	57,8268
8	8,00	0,1647	56,3467	61,8439
10	10,00	0,0966	58,4933	64,2000
12	12,00	0,0581	59,7844	65,6171
14	14,00	0,041	60,6956	66,6171
18	18,00	0,0505	61,8178	67,8488
22	22,00	0,0051	61,9311	67,9732
26	26,00	0,0205	62,3867	68,4732
30	30,00	0,0144	62,7067	68,8244
36	36,00	0,0153	63,0467	69,1976
42	42,00	0,0102	63,2733	69,4463
48	48,00	0,0074	63,4378	69,6268

Tabela 9. 8: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-b sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,1813	26,2511	28,8122
4	4,00	0,723	42,3178	46,4463
6	6,00	0,3783	50,7244	55,6732
10	10,00	0,1145	53,2689	58,4659
12	12,00	0,0737	54,9067	60,2634
14	14,00	0,0473	55,9578	61,4171
18	18,00	0,0554	57,1889	62,7683
22	22,00	0,0328	57,9178	63,5683
26	26,00	0,022	58,4067	64,1049
30	30,00	0,0149	58,7378	64,4683
36	36,00	0,0151	59,0733	64,8366
42	42,00	0,0108	59,3133	65,1000
48	48,00	0,0076	59,4822	65,2854

Tabela 9. 9: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética III-c sob as seguintes condições: água, 60°C, PEUP.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,3832	30,7378	33,7366
4	4,00	0,5653	43,3000	47,5244
6	6,00	0,3275	50,5778	55,5122
8	8,00	0,1686	54,3244	59,6244
10	10,00	0,1051	56,6600	62,1878
12	12,00	0,0685	58,1822	63,8585
14	14,00	0,0478	59,2444	65,0244
18	18,00	0,0618	60,6178	66,5317
22	22,00	0,0373	61,4467	67,4415
26	26,00	0,0236	61,9711	68,0171
30	30,00	0,0167	62,3422	68,4244
36	36,00	0,017	62,7200	68,8390
42	42,00	0,0114	62,9733	69,1171
48	48,00	0,0089	63,1711	69,3341

Tabela 9. 10: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-a sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,3337	29,6378	32,5293
4	4,00	0,6524	44,1356	48,4415
6	6,00	0,3593	52,1200	57,2049
8	8,00	0,1786	56,0889	61,5610
10	10,00	0,0995	58,3000	63,9878
12	12,00	0,0674	59,7978	65,6317
14	14,00	0,0444	60,7844	66,7146
18	18,00	0,0562	62,0333	68,0854
22	22,00	0,0335	62,7778	68,9024
26	26,00	0,0209	63,2422	69,4122
30	30,00	0,0149	63,5733	69,7756
36	36,00	0,0162	63,9333	70,1707
48	48,00	0,0084	64,1200	70,3756

Tabela 9. 11: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-b sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,2747	28,3267	31,0902
4	4,00	0,6334	42,4022	46,5390
6	6,00	0,3392	49,9400	54,8122
8	8,00	0,2079	54,5600	59,8829
10	10,00	0,1307	57,4644	63,0707
12	12,00	0,0834	59,3178	65,1049
14	14,00	0,0539	60,5156	66,4195
18	18,00	0,0654	61,9689	68,0146
22	22,00	0,0388	62,8311	68,9610
26	26,00	0,0249	63,3844	69,5683
30	30,00	0,0173	63,7689	69,9902
36	36,00	0,0172	64,1511	70,4098
42	42,00	0,0124	64,4267	70,7122

Tabela 9. 12: Dados experimentais de rendimento global de extração das raízes de *P. glomerata* obtidos na Cinética IV-c sob as seguintes condições: água, 60°C, PE.

Tempo (min)	S/F	Massa extrato (g)	Rendimento acumulado (%, b.u)	Rendimento acumulado (%)(b.s.)
2	2,00	1,3622	30,2711	33,2244
4	4,00	0,6706	45,1733	49,5805
6	6,00	0,3244	52,3822	57,4927
8	8,00	0,1641	56,0289	61,4951
10	10,00	0,1015	58,2844	63,9707
12	12,00	0,0629	59,6822	65,5049
14	14,00	0,0473	60,7333	66,6585
18	18,00	0,0472	61,7822	67,8098
22	22,00	0,0302	62,4533	68,5463
26	26,00	0,0191	62,8778	69,0122
30	30,00	0,015	63,2111	69,3780
36	36,00	0,0172	63,5933	69,7976
42	42,00	0,0114	63,8467	70,0756
48	48,00	0,007	64,0022	70,2463

9.1.5 Teor de β-ecdisona

Tabela 9. 13: Teor de β-ecdisona dos extratos das raízes de *P. glomerata* obtidos em diferentes condições de operação nas cinéticas: I ($IsoC_3OH$:água [70:30] 60°C, PEUP); II ($IsoC_3OH$:água [70:30] 60°C, PEUI); III (água, 60°C, PEUP) e IV (água, 60°C, PE).

	Cinética I		Cinética II		Cinética III		Cinética IV	
Tempo (min)	Rend. acum. no extrato (%,b.s.)	Rend. acum. na MP (%,b.s.)	Rend. acum. no extrato (%,b.s.)	Rend. acum. na MP (%,b.s.)	Rend. acum. no extrato (%,b.s.)	Rend. acum. na MP (%,b.s.)	Rend. acum. no extrato (%,b.s.)	Rend. acum na MP (%,b.s.)
	2,8806	0,0316	2,8096	0,0623	1,01784	0,0228	1,0040	0,0224
4	4,3198	0,0634	4,3419	0,0964	2,1674	0,0484	2,1228	0,0475
6	5,4968	0,0894	5,5066	0,1224	3,3437	0,0745	3,3391	0,0611
8	6,67471	0,1155	6,5923	0,1466	4,5555	0,1016	4,5801	0,0750
10	7,6357	0,1262	7,6375	0,1581	5,7326	0,1149	5,9171	0,0900
12	8,6267	0,1371	8,7681	0,1705	6,9096	0,1281	7,1596	0,1039
14	9,5198	0,1470	9,6991	0,1807	7,9465	0,1340	8,34777	0,1092
18	10,2926	0,1641	10,5563	0,1902	8,9317	0,1450	9,47424	0,1144
22	10,9886	0,1719	11,3526	0,1990	9,6401	0,1600	10,2334	0,1177
26	11,6559	0,1867	12,0909	0,2073	10,1690	0,1621	11,0157	0,1211
30	12,2342	0,1931	12,7957	0,2151	10,6809	0,1632	11,4117	0,1220
36	12,7878	0,1992	13,4125	0,2220	10,9334	0,1638	11,7017	0,1227
42	13,3119	0,2050	13,8610	0,2270	11,1379	0,1641	12,0840	0,1235
48	13,71148	0,2094	14,3285	0,2322	11,3119	0,1644	12,2359	0,1238

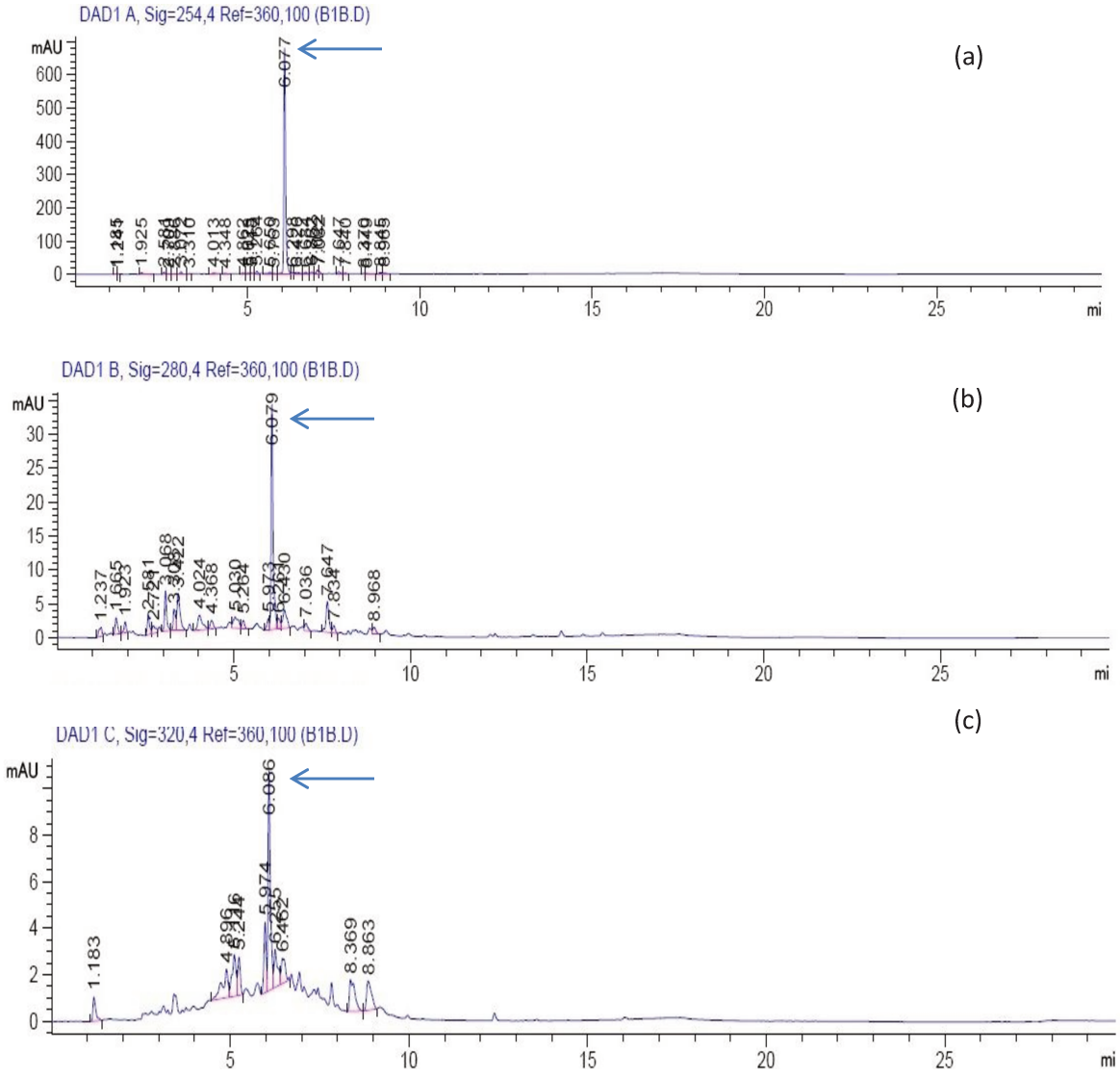


Figura 9. 1: Exemplo de cromatograma do extrato das raízes de *P. glomerata.* Extrato obtido sob as seguintes condições: IsoC_3OH:água (70:30); 60°C, PEUI coletado aos 2 min de extração. (a) Cromatograma obtido a 254nm; (b) Cromatograma obtido a 280nm e (c) Cromatograma obtido a 320nm.

9.2 Ajuste das curvas de extração

Exemplo (Cinética III) de rotina de programação utilizada no *software* SAS 6.12 para ajuste de duas retas.

```
DATA CINETICA RENDIMENTO;
TITLE'RENDIMENTO';
INPUT TMIN REND;
knot1=8;
AL1=MAX(TMIN-knot1,0);
CARDS;
2       32.2902
4       48.1220
6       56.3374
8       60.7341
10      61.6179
12      63.2463
14      64.3528
18      65.7163
22      66.3276
26      66.8650
30      67.2390
36      67.6244
42      67.8878
48      68.0821
;
PROC PRINT;RUN;
PROC NLIN;
TITLE'RENDIMENTO NLIN';
PARMS b0 = 25.984
              b1= 4.6774
              b2 = 0.1478
              knot1=8;
              AL1=MAX(TMIN-knot1,0);

MODEL REND=b0+b1*TMIN+b2*AL1;
RUN;
QUIT;
```

9.3 Atividades acadêmicas

As atividades experimentais desenvolvidas neste projeto de pesquisa se iniciaram, após treinamento, em julho de 2011. Durante o desenvolvimento deste projeto de pesquisa, foram desenvolvidos trabalhos em parceria juntamente com o Dr. Diego Tresinari dos Santos, em estudos de extração das raízes de *P. glomerata* empregando solventes pressurizados, avaliação de nanoemulsões empregando extrato aquoso das raízes de *P. glomerata* como surfactante, entre outras atividades que resultaram nas seguintes publicações:

9.3.1 Artigos aceitos para publicação

Santos, D. T.; Barbosa, D. F.; Brocollo, K.; Gomes, M. T. M. S.; **Vardanega, R.**; Meireles, M. A. A. Pressurized organic solvent extraction with on-line particle formation by supercritical anti solvent process. **Food and Public Health**, v.2, n. 6, 2012.

9.3.2 Capítulos de livro aceitos para publicação

Santos, D.T.; **Vardanega, R.**; Albarelli, J.Q.; Rabelo, R.B.; Beppu, M.M.; Meireles, M.A.A. Effects of ultrasound assisted extraction of water soluble constituents on Brazilian ginseng roots. In: **Ginseng: Chemical Constituents, Traditional uses and Health Benefits, Nova Publishers**, 2012.

Santos, S. T.; Gomes, M.T.M.S.; **Vardanega,** R.; Rostagno, M.A.; Meireles, M.A.A. Trends in integration of pressurized fluids with different technologies for natural products processing. **Natural products extraction: principles and applications, RSC Publishing**, 2012.

9.3.3 Trabalhos completos em Congressos

Santos, D. T.; Barbosa, D. F.; Broccolo, K.; **Vardanega, R.**; Meireles, M. A. A. Avaliação de nanoemulsões a base de óleo essencial de cravo empregando extrato aquoso de raízes de ginseng brasileiro como surfactante. In: **Agrobioenvases**, 2012, Florianópolis-SC.

9.3.4 Resumos publicados em Congressos

Vardanega, R. Santos, D. T.; Meireles, M. A. A. Dynamic ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from Brazilian ginseng roots (*Pfaffia glomerata*). In: **16th World Congress of Food Science and Technology- IUFoST**, 2012, Foz do Iguaçu-PR.

Vardanega, R.; Santos, D. T.; Debien, I. C. N.; Meireles, M. A. A. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from Brazilian ginseng roots (*Pfaffia glomerata*). In: **16th World Congress of Food Science and Technology- IUFoST**, 2012, Foz do Iguaçu-PR.

Santos, D. T.; **Vardanega, R.**; Debien, I. C. N.; Meireles, M. A. A. Extração de compostos bioativos de raízes de ginseng brasileiro em percolador de leito fixo assistido por

ultrassom: validação do processo. In: **9° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos- SLACA**, 2011, Campinas-SP.