

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ERVA MATE (*Ilex
paraguariensis*): APLICAÇÃO DE DIFERENTES
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E INFLUÊNCIA DAS
CONDIÇÕES DE PLANTIO SOBRE A COMPOSIÇÃO
QUÍMICA**

ROSÂNGELA ASSIS JACQUES

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE

OUTUBRO 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ERVA MATE (*Ilex
paraguariensis*): APLICAÇÃO DE DIFERENTES
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E INFLUÊNCIA DAS
CONDIÇÕES DE PLANTIO SOBRE A COMPOSIÇÃO
QUÍMICA**

ROSÂNGELA ASSIS JACQUES

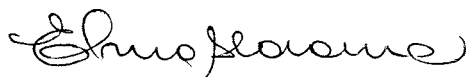
*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFRGS como
parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.*

**PORTO ALEGRE
OUTUBRO 2005**

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Este trabalho foi realizado pela autora, orientado pela Prof^a Dra. Elina Bastos Caramão e co-orientado pelo Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira. Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa E-202 e Central Analítica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e nos Laboratórios de Termodinâmica Aplicada e Central Analítica do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões-Campus de Erechim.

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final, pela orientadora e pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

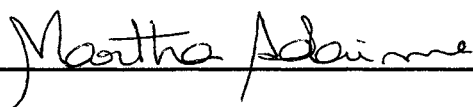


Orientadora: Profa. Dra. Eline Bastos Caramão

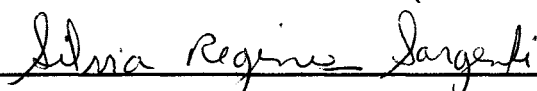


Co-orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

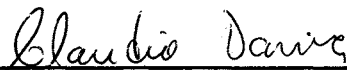
Banca Examinadora:



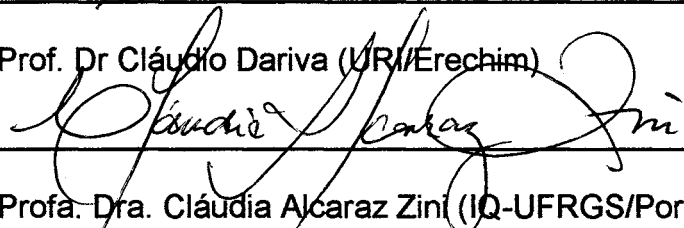
Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime (UFSM/Santa Maria)



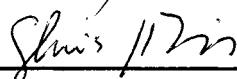
Profa. Dra. Sílvia Sargenti (UFSM/Santa Maria)



Prof. Dr. Cláudio Dariva (UR/Erechim)



Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini (IQ-UFRGS/Porto Alegre)



Prof. Dr. Sílvio Luiz Pereira Dias (IQ-UFRGS/Porto Alegre)

Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química

CHIMARRÃO

*Amargo doce que sorvo
num beijo em lábios de prata.
Tens o perfume da mata,
molhada pelo sereno.
E a cuia, seio moreno,
que passa de mão em mão,
traduz o meu chimarrão
na sua simplicidade
a velha hospitalidade,
da gente do meu rincão.
(Glauco Saraiva)*

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Terezinha e Manoel, pela infinita paciência e suporte a todo este trabalho e, simplesmente, por serem super pais.

Ao Edilson De Toni, pelo infinito amor, dedicação e, principalmente pela paciência e companheirismo diário.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Elina Bastos Caramão pela amizade, orientação, dedicação e incentivo especialmente nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos professores Dr. José Vladimir de Oliveira e Dr. Cláudio Dariva, supervisores do trabalho desenvolvido na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Campus de Erechim, pela amizade, incentivo, dedicação e valiosas contribuições.

Aos colegas e amigos do Curso, em especial a Inês, Valéria, Cecília e Fernanda pelo companheirismo e pelas sugestões e observações valiosas.

À Anelise Schmidt e Flávio Pavan pela amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica Ana Paula, Rafael, Jonathan, Bruna e Camila que realizaram um trabalho sério e responsável, pela amizade e companheirismo.

Aos demais alunos do Laboratório E-202 pela colaboração e amizade.

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Química da UFRGS, pelo apoio técnico.

Ao Dr. Sérgio do Amaral professor da URI-campus de Erechim, pela contribuição na discussão das variáveis agronômicas da erva-mate.

À Eunice Valduga pela prestatividade, amizade e profissionalismo.

À Rositânia, funcionária da URI-campus de Erechim, pela amizade, incentivo, e apoio técnico.

À toda a família da prof. Elina que me acolheu carinhosa e cuidadosamente, com verdadeira amizade, durante a execução da parte escrita deste trabalho.

À Ervateira Barão pelo plantio da erva-mate e cuidados com a colheita das plantas utilizadas neste estudo.

Aos amigos do Instituto de Química da UFRGS e a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Índice Geral.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA.....	6
1.0 ERVA-MATE.....	7
1.1 Classificação taxonômica.....	7
1.2 Biologia reprodutiva.....	8
1.3 Habitat e distribuição geográfica.....	8
1.4 Importância da erva-mate.....	9
1.5 Composição química da erva-mate.....	11
2.0 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO APLICÁVEIS A PLANTAS.....	15
2.1 Extração por maceração.....	16
2.2 Extração com ultra-som.....	16
2.3 Extração com líquido pressurizado (PLE).....	20
2.3.1 Vantagens e desvantagens da extração com líquido pressurizado.....	23
2.4 Extração com fluido supercrítico.....	25
2.4.1 Dióxido de carbono como solvente.....	26
2.4.2 Técnica de extração supercrítica.....	27
2.4.3 Equipamento típico da extração supercrítica.....	28
2.5 Comparação das técnicas de extração.....	29
3.0 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTOS.....	30
4.0 ANÁLISE INSTRUMENTAL.....	32
4.1 Cromatografia gasosa (GC).....	32
4.2 Espectroscopia de absorção atômica (FAAS).....	34
CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO DOS MINERAIS DAS FOLHAS DE ERVA-MATE SOB DIFERENTES CONDIÇÕES AGRONÔMICAS.....	35
1.0 EXPERIMENTAL.....	36
1.1 Detalhamento experimental de campo.....	36
1.2 Amostras.....	37
1.2.1 Digestão das amostras.....	38
1.3 Procedimento para determinação dos minerais.....	38
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
2.1 Influência das condições agronômicas sobre o teor de minerais nas folhas de erva-mate.....	40
3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	48
CAPÍTULO 4: APLICAÇÃO DO CO ₂ A ALTAS PRESSÕES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DA ERVA-MATE.....	49
1.0 EXPERIMENTAL.....	50
1.1 Reagentes e solventes.....	50
1.2 Extração com CO ₂ supercrítico.....	51
1.3 Variáveis de extração.....	51

1.4 Cromatografia líquida preparativa em sílica gel.....	53
1.5 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS)	53
1.5.1 Derivatização.....	55
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
2.1 Efeito das variáveis de extração (P x T).....	56
2.2 Fracionamento dos extratos.....	58
2.2.1 Análise cromatográfica (GC/MS) dos extratos obtidos no fracionamento cromatográfico em sílica gel.....	59
2.3 Efeito das variáveis agrônômicas sobre o rendimento da SFE.....	65
2.3.1 Efeito da adubação e sombreamento.....	65
2.3.2 Efeito da idade de poda.....	66
2.4 Análise quantitativa dos compostos da erva-mate.....	67
3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	71
CAPÍTULO 5: APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DA ERVA-MATE.....	73
1.0 EXPERIMENTAL.....	74
1.1 Extração por ultra-som.....	74
1.2 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS).....	75
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
2.1 Variáveis de extração.....	77
2.2 Caracterização química dos extratos.....	80
3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	83
CAPÍTULO 6: APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO NA ANÁLISE DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS DE ERVA-MATE.....	85
1.0 EXPERIMENTAL.....	86
1.1 Amostras, reagentes e solventes.....	86
1.2 Extração com líquido pressurizado (PLE) ou extração acelerada com solventes ASE).....	86
1.3 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS).....	88
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
2.1 Variáveis de extração.....	89
2.2 Caracterização química dos extratos.....	92
3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	95
CAPÍTULO 7: COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DA ERVA-MATE USANDO SOLVENTES ORGÂNICOS.....	97
1.0 EXPERIMENTAL.....	98
1.1 Amostras, reagentes e solventes.....	98
1.2 Técnicas de extração utilizadas.....	98
1.2.1 Procedimento para a extração por maceração.....	99
1.2.2 Procedimento para a extração por ultra-som.....	99
1.2.3 Procedimento para a extração com líquido pressurizado.....	100
1.3 Análise cromatográfica dos extratos (GC/MS).....	100
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
2.1 Análise do rendimento dos extratos de erva-mate.....	101
2.2 Análise dos extratos de erva-mate por GC/MS.....	102
2.2.1 Extração por maceração.....	102
2.2.2 Extração por ultra-som.....	105

2.2.3 Extração com líquido pressurizado.....	108
2.2.4. Análise quantitativa comparativa dos extratos de erva-mate.....	111
3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	114
CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES.....	115
CAPÍTULO 9: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
CAPÍTULO 10: SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	132
CAPÍTULO 11: PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA.....	134
CAPÍTULO 12: ANEXOS.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Foto ilustrativa da planta de erva-mate.....	7
Figura 2:	Distribuição da erva-mate plantada no Brasil [3].....	9
Figura 3:	Esquema geral de sistemas de aplicação de ondas ultra-sonoras no campo da química: (a) banho indireto, (b) banho direto e (c) sonda.....	18
Figura 4:	(A) Esquema geral do equipamento e (B) Etapas da extração com líquido pressurizado no sistema ASE.....	22
Figura 5:	Esquema representativo de um processo de extração supercrítica.....	29
Figura 6:	Foto ilustrativa do experimento de campo: (a) área a pleno sol e (b) área sombreada.....	37
Figura 7:	Foto das folhas da erva mate com idade de 18 meses, sem adubação e cultivada sob sol (a) e sombra (b).....	40
Figura 8:	Esquema representativo de um sistema de extração a altas pressões.....	51
Figura 9:	Fotografia com vista parcial da unidade de extração com dióxido de carbono pressurizado.....	52
Figura 10:	Esquema do fracionamento aplicado à mistura dos extratos obtidos por SFE.....	54
Figura 11:	Curvas de extração obtidas para erva-mate usando CO ₂ a altas pressões.....	57
Figura 12:	Cromatograma do íon total da mistura dos extratos de erva-mate obtido via extração supercrítica com CO ₂	60
Figura 13:	Cromatograma do íon total das frações do extrato fracionado dos extratos de erva-mate obtido por CO ₂ a altas pressões.....	62
Figura 14:	Cinética da extração da erva-mate de 12 meses de poda, sob diferentes intensidades de luz e adubação.....	65
Figura 15:	Cinética da extração da erva-mate sob diferentes idades de poda, plantadas a pleno sol e adubadas com nitrogênio.....	66
Figura 16:	Equipamento utilizado para extração com ultra-som das folhas de erva-mate.....	75
Figura 17:	Correlação entre os rendimentos obtidos experimentalmente e aqueles calculados pelo modelo empírico do planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻¹	79
Figura 18:	Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos por ultra-som com hexano (A) e metanol (B), das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubadas com fonte de nitrogênio.....	81
Figura 19:	Foto ilustrativa do aparelho de Extração Acelerada com Solventes.....	87
Figura 20:	Comparação dos rendimentos do modelo empírico e dos valores obtidos experimentalmente de um planejamento fatorial fracionário 2 ⁶⁻² para a extração acelerada com solventes.....	92
Figura 21:	Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) com hexano (A) e metanol (B), das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.....	93
Figura 22:	Desenho esquemático do equipamento usado para maceração.....	99
Figura 23:	Cromatogramas do íon total dos extratos das folhas de erva-mate obtidos por maceração com hexano (A), tolueno(B), diclorometano(C), acetato de etila(D), acetona(E) e metanol (F).....	103
Figura 24:	Cromatogramas do íon total dos extratos das folhas de erva-mate obtidos por extração com ultra-som com hexano (A), tolueno(B), diclorometano(C), acetato de etila(D), acetona(E) e metanol (F).....	106

Figura 25: Cromatogramas do ion total dos extratos das folhas de erva-mate obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) com hexano (A), tolueno(B), diclorometano(C), acetato de etila (D), acetona(E) e metanol (F).....

109

LISTA DE TABELAS

Tabela I:	Distribuição dos teores de nutrientes nos diferentes tecidos de erva-mate (g/100 g).....	14
Tabela II:	Revisão da literatura sobre aplicação de ultra-som na extração de plantas.....	20
Tabela III:	Revisão da literatura sobre aplicação da extração com líquido pressurizado (PLE) na extração de plantas.....	24
Tabela IV:	Propriedades termodinâmicas dos fluidos.....	25
Tabela V:	Aplicações da extração com fluido supercrítico em plantas.....	28
Tabela VI:	Comparação entre métodos de extração utilizados em plantas.....	30
Tabela VII:	Parâmetros instrumentais utilizados no FAAS.....	39
Tabela VIII:	Teor de cinzas [g/100g _{base seca}] das amostras de erva-mate.....	44
Tabela IX:	Conteúdo de macronutrientes das folhas de erva-mate em função da idade da folha, incidência de luz e adubação.....	45
Tabela X:	Conteúdo de micronutrientes das folhas de erva-mate em função da idade da folha, incidência de luz e adubação.....	46
Tabela XI:	Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%) dos conteúdos dos minerais das folhas de erva-mate, sob diferentes condições agronômicas.....	47
Tabela XII:	Condições cromatográficas utilizadas na análise dos extratos obtidos com CO ₂ a altas pressões por GC/MS.....	54
Tabela XIII:	Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de erva-mate com CO ₂ a altas pressões. Erva-mate com idade de poda de 12 meses cultivada a pleno sol e sem adubação.....	56
Tabela XIV:	Rendimentos dos extratos (misturas dos extratos da Tabela XIII) obtidos por cromatografia líquida preparativa (fracionamento), expressos em g (extrato) por 100 g de amostra.....	59
Tabela XV:	Compostos identificados na mistura dos extratos da Tabela XIII e das frações do extrato fracionado de erva-mate com idade de poda de 12 meses, cultivada a pleno sol e sem adubação, obtido por SFE.....	63
Tabela XVI:	Compostos das folhas de erva-mate com idade de 18 meses de poda, quantificados em função do tipo de fertilização e incidência de luz.....	68
Tabela XVII:	Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%): Efeito da intensidade de luz e do tipo de adubação sobre a concentração (mg/kg de amostra) de compostos selecionados do extrato de folhas de erva-mate com 18 meses de idade, obtidos por SFE.....	69
Tabela XVIII:	Variáveis e resultados de um planejamento fatorial fracionário 2 ⁵⁻¹ do processo de extração por ultra-som, das folhas de erva-mate.....	78
Tabela XIX:	Principais compostos identificados nos extratos por ultra-som com hexano e metanol, das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, plantada a pleno sol e adubadas com fonte de nitrogênio.....	82
Tabela XX:	Variáveis e resultados de um planejamento fatorial fracionário 2 ⁶⁻² , utilizados na extração com líquido pressurizado.....	90
Tabela XXI:	Principais compostos identificados nos extratos por extração com líquido pressurizado com hexano e metanol, nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.....	94

Tabela XXII:	Rendimento das extrações por maceração, ultra-som e extração acelerada por solvente, obtido para as amostras de erva-mate, expresso em gramas de (extrato) por 100 g de amostra.....	101
Tabela XXIII:	Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%). Efeito das técnicas de extração e o tipo de solvente considerado sobre o rendimento de extrato das folhas de erva-mate.....	102
Tabela XXIV:	Principais compostos identificados nos extratos obtidos por maceração com hexano (H), tolueno(T), diclorometano(D), acetato de etila(AE), acetona(A) e metanol (M) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.....	104
Tabela XXV:	Principais compostos identificados nos extratos por extração com ultra-som com hexano (H), tolueno(T), diclorometano(D), acetato de etila(AE), acetona(A) e metanol (M) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.....	107
Tabela XXVI:	Principais compostos identificados nos extratos por extração por líquido pressurizado com hexano (A), tolueno(B), diclorometano(C), acetato de etila(D), acetona(E) e metanol (F) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.....	110
Tabela XXVII:	Concentração dos compostos quantificados nos extratos obtidos nas diferentes técnicas de extração (maceração, ultra-som e extração com líquido pressurizado) das folhas de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio, expressos em mg/kg.....	112
Tabela XXVIII:	Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%) referente à concentração dos compostos das folhas de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio (mg/kg de amostra) obtidos por maceração, ultra-som e extração com líquido pressurizado.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE - extração acelerada por solvente

BSTFA - (N,O-bis(trimetilsil)trifluoroacetamida)

CTC-capacidade de troca de cátions

C₁₈ – fase estacionária octadecil – silano

EI - impacto por elétrons

FAAS – espectroscopia de absorção atômica

FM - fase móvel

GC/MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

IAL- Instituto Adolfo Lutz

LC/MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MAE - extração assistida por microondas

MIC – cromatograma por monitoramento de íons

MS – espectrometria de massas

OV-5 – fase estacionária de metil silicone com 5 % de grupos fenila

ρ - densidade

P_c - pressão crítica

PLE - extração com líquido pressurizado

PM – peso molecular

p/p – peso/ peso

P - pressão

p/v – peso/volume

SCAN – modo de operação na espectrometria de massas por varredura de íons

SFE – extração com fluido supercrítico

SIM – monitoramento de íons simples

SPE - extração em fase sólida

SPME – micro - extração em fase sólida

T - temperatura

TIC - cromatograma de íon total

TMS – trimetilclorossilano

t_R – tempo de retenção

US - ultra-som

v/v – volume/volume

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a composição química das folhas de erva-mate, sob diferentes condições agronômicas e técnicas de extração. Os métodos de extração usados foram maceração, ultra-som, extração com líquido pressurizado e extração com fluido supercrítico. Foram investigadas as variáveis que podem influenciar no processo de extração, tais como temperatura, pressão, polaridade do solvente, tempo de extração, massa de amostra, entre outras. A identificação dos compostos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Todos os métodos de extração utilizados mostraram-se eficientes para a obtenção dos extratos, com as diferenças sendo mais quantitativas do que qualitativas. Entre os métodos de extração que utilizam solventes orgânicos, a extração com líquido pressurizado mostrou-se mais eficiente, produzindo maior rendimento em massa de extrato e maior concentração de alguns dos compostos de interesse, com as vantagens de redução de solvente e tempo de extração. A composição química da erva-mate é influenciada pelas condições agronômicas de plantio, bem como pelas condições de extração de suas folhas. A melhor condição agronômica avaliada, ou seja, aquela que produziu maior quantidade de extrato, foi o cultivo das plantas a pleno sol, adubadas com nitrogênio e com idade de poda de 18 meses. A variável mais importante das técnicas de extração utilizadas foi a polaridade do solvente. Solventes de maior polaridade produziram maior rendimento em extrato. A análise cromatográfica dos extratos obtidos permitiu identificar cerca de 50 compostos qualitativamente e 6 quantitativamente, destacando-se a cafeína, fitol, ácido palmítico, ácido esteárico, esqualeno e vitamina E.

ABSTRACT

The main objective of this work was to study the chemical composition of the extracts of mate leaves cultivated under different agronomic conditions obtained from different extraction techniques. The extraction methods used were maceration, sonication, pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. It was investigated the influence of temperature, pressure, solvent polarity, extraction time, sample amount, etc., on the extraction process. The identification of the compounds was accomplished by gas chromatography coupled to mass spectrometry detector (GC/MS). Results showed that all the extraction methods were efficient, with more quantitative differences than qualitative. Among the extraction methods using organic solvents, the pressurized liquid extraction showed to be more efficient, producing larger mass yields and larger concentration of some of the present compounds in the mate leaves, with the advantages of solvent consumption and time reduction. It was verified that the chemical composition of the mate is influenced by the agronomic conditions, as well as the extraction conditions of the mate leaves. The best-evaluated agronomic condition, i.e., that produced the greatest amount of extract was the fertilization with nitrogen and the complete exposure to sunlight. Solvent polarity demonstrated to be the most important variable in the extraction procedure. Thus, solvents of greater polarity produced larger mass yields. The chromatographic analysis of the extracts allowed the qualitative identification of 50 compounds and 6 quantitative determined (caffeine, phytol, palmitic acid, stearic acid, squalene and vitamin E).

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) é uma espécie nativa da região sul do Brasil e tem importância histórica na cultura e na economia dessa região e de países limítrofes, como Argentina, Uruguai e Paraguai.

Por um longo período, a erva-mate tem sido um importante produto das exportações brasileiras e a sua produção ainda se constitui em uma grande fonte de renda e emprego, especialmente para os pequenos e médios produtores da região de ocorrência da espécie [1,2].

O setor ervateiro retomou seu crescimento a partir de 1993 com uma produção de 529 mil toneladas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul [1], atingindo cerca de 670 mil toneladas nos três estados em 2000 [2].

No estado do Rio Grande do Sul, a cultura compreende cerca de 250 municípios, onde estão direta ou indiretamente envolvidas 39.000 pequenas propriedades e empresas, gerando cerca de 165.000 empregos diretos [3], o que reforça a importância do setor ervateiro para a região.

O setor ervateiro, na microrregião de Erechim, compreende 9.363 famílias de produtores rurais, que têm na atividade ervateira uma importante fonte de renda e 42 empresas agroindustriais que produzem e comercializam erva-mate para diversas regiões do Brasil e também para exportação [3].

Atualmente, a erva-mate recupera seu "status" na economia, não pelo desbravamento físico de fronteiras, mas pela conquista de novos mercados face ao desenvolvimento de produtos no setor de bebidas, cosméticos, medicamentos e higiene, além do desenvolvimento de estudos fitoquímicos que objetivam explorar seu potencial.

A forma mais difundida de consumo da erva-mate é o chimarrão (infusão de erva-mate) em cuias de madeira ou porongo [5,6]. O mate é uma bebida estimulante: elimina a fadiga, estimula a atividade física e mental, atuando benéficamente sobre os nervos e músculos e favorecendo o trabalho intelectual. Por possuir vitaminas do complexo B, o mate participa do aproveitamento do açúcar nos músculos, nervos e atividade cerebral. Com a presença das vitaminas C e E, age como defesa orgânica e apresenta benefícios sobre os tecidos do organismo. A presença de sais minerais,

juntamente com a cafeína, estimula o trabalho cardíaco ajudando na circulação do sangue e diminuindo a tensão arterial, pois a cafeína atua como vaso dilatador [7].

O mate favorece a diurese e atua também sobre o tubo digestivo: ativa os movimentos peristálticos, facilita a digestão, suaviza os embaraços gástricos, favorecendo a evacuação e a micção. A ação estimulante do mate é mais prolongada que a do café, não deixando, porém, os efeitos colaterais ou residuais como irritabilidade e insônia [7].

Além de alimento, a erva-mate há muito tempo vem sendo considerada como tendo valor terapêutico, sendo recomendada como antiinflamatório, anti-reumático, tônico, estimulante, diurético, etc. Dada a sua utilização medicinal foi incorporada em várias Farmacopéias, podendo-se citar a argentina de 1898, a brasileira de 1929, as francesas de 1866 e 1844, as mexicanas de 1904, 1925 e 1952, a paraguaia de 1944, a portuguesa de 1876 e as venezuelanas de 1898, 1919, 1927 e 1939. Junto ao Ministério da Saúde Brasileiro estão registradas 14 preparações derivadas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. A erva-mate também é comercializada no exterior, por exemplo, na Alemanha onde há 6 preparações homeopáticas e 452 outras preparações comerciais [4].

No mercado há uma demanda por produtos orgânicos de uma forma geral, e esta tendência configura um diferencial no valor agregado quando a matéria-prima (erva-mate) é proveniente de ervais nativos ou ervais submetidos a condições agrônômicas, que obedecem a princípios de sustentabilidade.

Além de garantir o suprimento das exigências da cultura através da adubação, outros fatores são determinantes para manter as propriedades originais da planta.

Salienta-se, também, que hoje há uma grande oferta desse produto (erva-mate), o que tem incentivado a busca não apenas de melhorias na qualidade dos produtos em exploração, como também de novas formas de aproveitamento [3,4].

O conhecimento científico sobre a taxonomia do gênero, a composição química e as propriedades farmacológicas da espécie *Ilex paraguariensis* e do produto erva-mate são ainda incipientes.

O desenvolvimento de técnicas modernas de preparação de amostras com significantes vantagens sobre os métodos convencionais, também chamados oficiais (descritos em farmacopéias de diversos países), assume um papel importante em garantir a alta qualidade e certificação dos produtos provenientes de plantas, como por exemplo, a erva-mate.

A extração consiste na primeira etapa para que ocorra uma análise qualitativa ou quantitativa de uma planta, pois a extração separa os compostos da matriz celular para serem posteriormente analisados. As técnicas convencionais que podem ser empregados para extração de compostos da erva-mate compreendem extração com solvente orgânico, por maceração e ultra-som. No entanto, pouco tem sido apresentado na literatura com relação à identificação de compostos presentes na erva-mate obtidos por extração com solventes orgânicos. Esta justificativa, aliada ao interesse na utilização das técnicas modernas de extração, como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido pressurizado (PLE), mostra a relevância do presente trabalho.

Objetivos:

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver e/ou adaptar métodos para extração, separação e análise dos compostos químicos das folhas de erva-mate.

Podemos ainda citar os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a condição ótima de extração dos compostos da erva-mate através da técnica de extração por fluido supercrítico, utilizando um planejamento de experimentos.
- Extrair os compostos da erva-mate empregando a técnica de extração com fluido supercrítico, levando em consideração o efeito das variáveis agronômicas (intensidade de luz, idade de poda das folhas e fertilização).

- Determinar a composição mineral da erva-mate e verificar a influência das variáveis agronômicas de plantio (intensidade de luz, idade de poda das folhas e fertilização) sobre sua composição.
- Estudar as técnicas de ultra-som e extração com líquido pressurizado através de planejamentos experimentais para a obtenção da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate.
- Comparar as técnicas de extração utilizando solventes orgânicos, na condição ótima de extração, para análise qualitativa e quantitativa das folhas de erva-mate.
- Identificar compostos ou classes de compostos de alto valor agregado em diferentes condições agronômicas (idade de folha, sombreamento e adubação).

CAPÍTULO 2:
REVISÃO DA LITERATURA

1.0 ERVA-MATE

1.1 Classificação taxonômica

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) é originária da América do Sul. A classificação botânica da erva-mate, segundo o naturalista francês August de Saint Hillaire [5], é a seguinte:

- Divisão: Angiosperma
- Classe: Dicotiledônea
- Sub-classe: Archichlamydeae
- Família: *Aquifoliaceae*
- Gênero: *Ilex*
- Espécie: *Ilex paraguariensis* A. St. Hill



Figura 1: Foto ilustrativa da planta de erva-mate

O gênero *Ilex* pertence à família *Aquifoliaceae* e possui cerca de 500 espécies. A área de dispersão inclui as Américas, Ásia, Europa e o sul da África. O maior número de espécies está na região tropical da Ásia e das Américas [5, 6].

Algumas espécies de *Ilex* são bastante populares no mundo, destacando-se *I. aquifolium* L. (Europa), *I. Opaca* Ait (América do norte) e *I. cornuta* Lindley (Ásia), das quais os ramos com frutos tornaram-se símbolo de festividades importantes, como o Natal.

1.2 Biologia reprodutiva:

A erva-mate é uma espécie dióica, cuja floração ocorre de setembro a dezembro. Quanto à frutificação, ocorrem frutos maduros de dezembro até abril. A floração e frutificação iniciam gradativamente, aos 2 anos em árvores oriundas de propagação vegetativa e aos 5 anos em árvores provenientes de sementes, em sítios adequados. A dispersão das sementes é realizada por pássaros, principalmente sabiás [9].

1.3 Habitat e distribuição geográfica

A espécie possui grande ocorrência, atingindo aproximadamente 540.000 Km². A erva-mate ocorre no nordeste da Argentina, leste do Paraguai, noroeste do Uruguai e Brasil [7].

No Brasil, ela pode ser encontrada nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Sua área de ocorrência natural é de, aproximadamente, 450.000 Km², o que equivale a quase 5% do território brasileiro [8]. Estes dados estão apresentados na **Figura 2**.

A região sul é a maior produtora, onde 596 municípios desenvolvem a atividade ervateira, envolvendo um contingente de 710.000 pessoas, para uma produção anual aproximada de 650.000 toneladas de folhas.

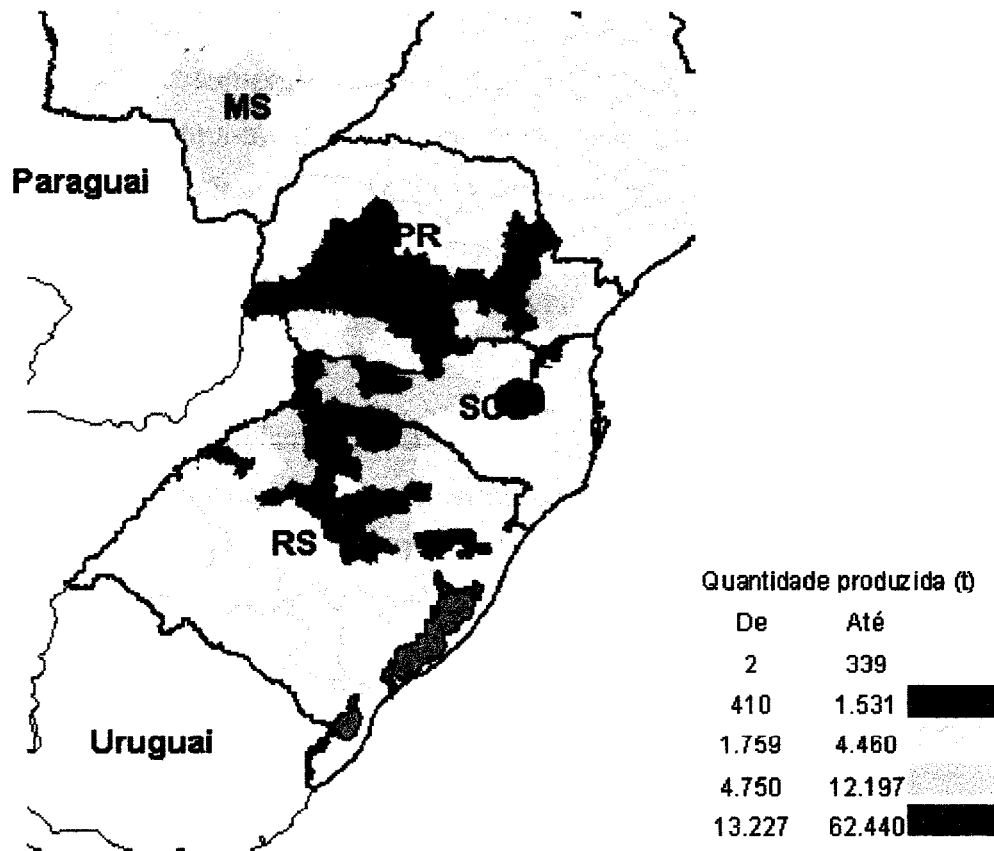


Figura 2: Distribuição da erva-mate plantada no Brasil [3].

1.4 Importância da erva-mate

No Brasil, são relatadas 68 espécies deste gênero [6,10]. Destas, *Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como erva-mate, é de importância histórica incontestável na região sul do Brasil e em países limítrofes, como Argentina, Paraguai e Uruguai. O consumo de erva-mate como chimarrão é um hábito fortemente incorporado pelas populações sul-brasileiras, em especial no

Rio Grande do Sul, maior consumidor do país, fazendo parte do perfil comportamental gaúcho.

As folhas da erva-mate são utilizadas tanto para o chimarrão como para o tererê, o mate solúvel e o chá mate [8,9]. A região sul é a que mais utiliza o chimarrão, consumindo em média, mais de 90% da produção. Os outros 10% são utilizados para produtos como chás, mate solúvel, entre outros.

O processamento básico para o beneficiamento da erva-mate para chimarrão constitui-se das etapas da colheita, recepção, sapeco, secagem, trituração, classificação, armazenagem, moagem, mistura, embalagem e expedição [7]. A indústria da erva-mate evoluiu consideravelmente nos últimos anos, e hoje utiliza modernos soques ervateiros e máquinas movidas a energia elétrica.

O sapeco é utilizado para evitar que as folhas da erva-mate escureçam. O escurecimento ocorre pela presença das enzimas polifenoloxidase (PFO) e peroxidase (POD) que, em 1928, foram identificadas por Senglet como as responsáveis pela oxidação dos compostos fenólicos quando as folhas são retiradas da planta e expostas ao ar. O sapeco, que tem por finalidade a inativação destas enzimas, consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador [7].

Além das tradicionais bebidas, a erva-mate é também utilizada em preparações farmacêuticas, tendo sido incorporada a várias farmacopéias. No Ministério da Saúde brasileiro estão registradas 14 preparações derivadas de *Ilex paraguariensis*, em função das propriedades terapêuticas, sendo recomendada como estimulante, antiinflamatório, anti-reumático, tônico e diurético [7,11].

Da erva-mate podem ser obtidos corantes e detergentes, especialmente para uso hospitalar. No Brasil, esses produtos estão sendo pesquisados em nível laboratorial. No exterior, especialmente nos países do hemisfério norte, essa planta já tem mercado em função das amplas possibilidades de aproveitamento [12].

1.5 Composição química da erva-mate

Alguns trabalhos [8,13-15] mostram que a composição química da erva-mate é muito complexa, apresentando metilxantinas, saponinas, taninos, vitaminas, componentes minerais, substâncias aromáticas, ácidos graxos, terpenos, álcoois, cetonas, aldeídos, fenóis, entre outros.

A presença de saponinas em folhas de *Ilex paraguariensis* foi estabelecida através de trabalhos realizados por Gosmann [4] e Montanha [16].

Gosmann e colaboradores [17] e Kraemer [18] descreveram a presença de 11 glicosídeos, como agliconas, ácido ursólico e ácido oleanólico e os açúcares arabinose, glicose e ramnose. Com o objetivo de conhecer mais detalhadamente a composição, em termos de saponinas, de outros órgãos além de folhas, Kraemer [19] analisou através de cromatografia em camada delgada, amostras de erva-mate (ramos, raízes, frutos verdes e maduros), além da cultura de células de *Ilex paraguariensis*. Athayde [14] estudou as saponinas presentes em folhas e frutos de árvores de *Ilex paraguariensis* nativas nos estados de Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Desde a descoberta da presença da cafeína por Stenhouse em 1843 e da teobromina por Oehrlí em 1927 em *Ilex paraguariensis* [20], muitos trabalhos têm sido publicados a respeito dos teores destas metilxantinas, tanto nas folhas, talos ou frutos, como no produto erva-mate [9,14,21-28]. Alguns autores fazem referência à presença de teofilina nas folhas e em produtos comerciais da erva-mate [21-22].

Cafeína, teofilina e teobromina são três alcalóides estreitamente relacionados, presentes na erva-mate, e, nesta planta, são os compostos mais interessantes sob o ponto de vista farmacológico e terapêutico. Os alcalóides são responsáveis pelas propriedades estimulantes do mate. A cafeína tem efeito sobre o sistema nervoso central, acelera a entrada de oxigênio nos pulmões, aumenta a velocidade do metabolismo e acelera o batimento

cardíaco [29]. As estruturas químicas destes compostos estão apresentadas no **Anexo 1**.

Diversas metodologias para a extração e a quantificação de metilxantinas em produtos vegetais têm sido propostas ao longo do tempo, comparando diversos métodos de extração e análise.

Gosmann, em 1989 analisou por cromatografia em camada delgada as metilxantinas nos extratos dos talos e folhas de *Ilex paraguariensis* de procedência do Rio Grande do Sul [4].

Clifford & Martinez [23] analisaram amostras comerciais de erva-mate quanto ao teor de cafeína, teobromina e teofilina, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa, utilizando uma coluna C18 com detecção a 276 nm.

Lacerda e colaboradores [24] realizaram uma avaliação dos teores de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) em amostras de chá preto e chá mate, utilizando como técnicas de extração a decocção, extração com ultra-som e microondas. Para a quantificação dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa.

Além das técnicas convencionais de extração (decocção ou maceração) e de técnicas não convencionais como ultra-som e microondas, tem sido utilizada a extração com fluido supercrítico para a extração das metilxantinas de amostras de erva-mate, verificando a influência dos parâmetros temperatura e pressão [25-28].

Kawakami & Kobayashi [30] identificaram os componentes voláteis de erva-mate comercial (mate cancheado argentino, mate tostado brasileiro) pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Um total de 196 compostos foram identificados no óleo volátil, incluindo 23 álcoois alifáticos, 24 aldeídos, 29 cetonas, 15 ácidos, 8 lactonas, 9 terpenos, 11 álcoois terpênicos, 25 alicíclicos, 11 fenóis, 7 aromáticos, 13 furanonas, 6 pirazidas e 2 pirróis.

Valduga [7] analisou por cromatografia gasosa o óleo essencial obtido por destilação a vapor das folhas de erva-mate e identificou os seguintes compostos: linalool, geraniol, benzaldeído, 2,4 hexadienal, 2-hexenal, 2-pentenol. A atividade antibactericida dos compostos linalool, β -ionona, α -terpineol, geraniol, 1-octanol, ácido octanóico, nerolidol e eugenol presentes no chá-mate foi estudada por Kubo e colaboradores [31], contra o *Streptococcus mutans*, que é uma das bactérias responsáveis pelas cáries dentárias. Todos os compostos exibiram alguma atividade contra esta bactéria cariogênica.

A erva-mate é rica em polifenóis hidrossolúveis, tais como ácido isoclorogênico, ácido caféico e ácido clorogênico, os quais apresentam alta capacidade antioxidante e podem conferir para suas infusões um papel hepatoprotetor (função de auxílio ao fígado) e reforçar a defesa antioxidante do organismo humano [32-36].

Chandra & Mejia [37] determinaram e compararam os teores de polifenóis e a capacidade antioxidante de *Ardisia compressa*, *Camélia sinensis* e *Ilex paraguariensis*. As folhas de erva-mate apresentaram uma capacidade antioxidante elevada frente ao ácido gálico em comparação com as outras plantas.

Segundo alguns trabalhos, os flavonóides e as substâncias lipofílicas presentes nas folhas de *Ilex paraguariensis* St. Hill causam efeitos farmacológicos, destacando-se a redução do apetite [38]. Estes compostos também apresentam propriedades anticarcinogênicas e antimutagênicas [39-40]. Entre os flavonóides presentes na erva-mate, podemos citar a rutina, quercetina e o canferol-3-o-rutinosídeo.

Pesquisas confirmam que a erva-mate responde pela presença de aminoácidos essenciais ao organismo humano, além de açúcar assimilável (em forma de glicose). A vitamina E, presente na erva-mate é benéfica aos diversos tipos de tecidos do organismo humano, enquanto a vitamina C participa da circulação sanguínea, agindo como defesa orgânica. Com as vitaminas do complexo B, participa do aproveitamento do açúcar pelos músculos e nervos e pela atividade cerebral. Entre as enzimas, foi identificada a oxidase, que junto com a cafeína, exerce a função de nutrição do organismo humano [12].

Os carboidratos (açúcares) nas folhas de erva-mate foram analisados por Paredes e colaboradores [41] tendo-se verificado teores de 2,85 %, 0,64% e 0,35% de sacarose, glicose e frutose, respectivamente.

Além destes compostos, a erva-mate contém quantidades significativas de minerais como cálcio, potássio, magnésio e manganês [7].

Alguns pesquisadores têm determinado o teor de macronutrientes (K, Ca, Mg e Na) e micronutrientes (Mn, Fe, Zn e Cu) nas folhas da erva-mate, no chá mate processado e suas infusões por digestão ácida e posterior análise pela técnica de espectroscopia atômica. Os elementos que apresentam as maiores concentrações nas infusões são K, Ca e Mg [42-44].

Reismann e colaboradores [22, 45] investigaram os níveis de nutrientes nos diferentes tecidos de erva-mate em ervais nativos, para avaliação das migrações de macronutrientes que ocorrem por ocasião da safra. Na **Tabela I** são apresentados os resultados obtidos com as análises, em duas épocas distintas: julho, quando o nível dos nutrientes é relativamente estável e baixo, e em outubro, período de franco desenvolvimento que culmina na floração.

Tabela I: Distribuição dos teores de nutrientes nos diferentes tecidos de erva-mate (g/100 g) de acordo com Reismann *et al* [45].

Elemento	Julho		Outubro		
	Folhas	Ramos	Folhas	Ramos	Flores
N (%)	1,92	1,01	2,20	1,21	2,67
P (%)	0,17	0,057	0,12	0,10	0,20
K (%)	1,59	0,98	1,86	1,70	3,71
Ca (%)	0,61	0,88	0,43	1,19	0,70
Mg (%)	0,42	0,34	0,33	0,23	0,37

Os resultados apresentados nesta **Tabela** são importantes quando se associa a eles o fato do cultivo comercial da erva-mate apresentar duas épocas de colheita, inverno e verão, chamadas respectivamente de safra e safrinha.

Verificou-se um aumento considerável dos nutrientes fósforo, nitrogênio e potássio até o mês de outubro (final da safra), enquanto que para o cálcio e magnésio há maior quantidade na safra de julho (meio da safra).

As concentrações de minerais são específicas, não somente para a espécie, idade e tecido, como também dependem do ambiente. Diversos fatores controlam o teor de minerais nos vegetais, principalmente o genético [20,46].

Os nutrientes nas árvores podem ser armazenados nos seus diferentes compartimentos em função das necessidades fisiológicas imediatas, ou como reserva para uso posterior, em outros órgãos [21, 47].

Zampier [23] analisou os teores de macro e micronutrientes por espectrometria de absorção atômica (FAAS) em folhas de 1 ano de idade de árvores nativas de erva-mate submetidas à adubação com matéria orgânica, sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio. Segundo esta pesquisadora, os teores de K, Ca, Mg, Mn e Cu foram significativamente maiores nos tratamentos submetidos à adubação orgânica.

Bertoni e colaboradores [12] ressaltam que o tipo de solo, idade da planta, data de coleta e características climáticas, influenciam significativamente na composição química da erva-mate.

2.0 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO APLICÁVEIS A PLANTAS

O preparo da amostra é uma etapa importante na análise de materiais de plantas, pois é necessário extrair os compostos químicos para posterior separação e caracterização [48].

Um extrato de planta pode ser definido como um composto ou mistura de compostos obtidos de plantas frescas ou secas, ou parte das plantas (flores, folhas, semente, raiz e casca), por diferentes métodos de extração. Caracteristicamente, os compostos ativos são obtidos juntamente com outros materiais presentes na massa vegetal (extrato) [49].

O desenvolvimento de técnicas modernas de preparação de amostras com significantes vantagens sobre os métodos convencionais, também

chamados oficiais (descritos em farmacopéias de diversos países), assume um papel importante em garantir a alta qualidade dos produtos provenientes de plantas.

Surgiram nos últimos anos uma série de novas técnicas de extração, como a micro-extração em fase sólida (SPME), extração em fase sólida (SPE), extração assistida por microondas (MAE), extração por fluido supercrítico (SFE) e extração com líquidos pressurizados (PLE) (conhecida também como extração por fluido pressurizado – PFE, ou extração acelerada com solventes – ASE). Estas técnicas são mais rápidas, utilizam menos solventes, diminuem a degradação da amostra, podem eliminar a etapa de “*clean-up*” da amostra, eliminam etapas de concentração antes das análises cromatográficas, melhoram a eficiência de extração, seletividade e/ou cinética, e são de fácil automação [50-55].

2.1 Extração por maceração

A maceração é uma técnica na qual a extração da planta é realizada em um recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional e também sem renovação do solvente extrator. Esta técnica utiliza os solventes orgânicos em função da polaridade. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula [56].

2.2 Extração com ultra-som

O ultra-som é um processo que utiliza a energia das ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana. O

ultra-som é definido com frequências acima de 20,0 kHz. Estas ondas sonoras criam uma variação de pressão no líquido gerando a cavitação [57].

Os principais efeitos do ultra-som na extração de plantas são: aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de cavitações (formação espontânea de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando num forte estresse dinâmico) e aumento do estresse mecânico das células, o que é também chamado de fricção interfacial [49].

Algumas células das plantas ocorrem na forma de glândulas (externas ou internas) preenchidas com o óleo essencial. Uma característica das glândulas externas é que a membrana é muito fina e pode ser facilmente destruída pelo colapso das bolhas de cavitação próximo a parede das células. Assim, facilita a penetração dos solventes nas células e a liberação do conteúdo do óleo no solvente [49,50].

O ultra-som pode facilitar a dilatação e hidratação do material da planta e causar alargamento dos poros da parede celular. Melhora a inchaço e a razão de transferência de massa e, ocasionalmente, quebra a parede celular, resultando no aumento da eficiência de extração e/ou redução do tempo de extração [58].

Para as glândulas internas, é importante reduzir o tamanho das partículas do material, aumentando assim o número de células diretamente expostas à extração por solvente com ultra-som.

Sumarizando, podemos dizer que os possíveis benefícios do ultra-som na extração são: o aumento da transferência de massa, quebra das células vegetais, aumento na penetração do solvente e diminuição de efeitos capilares [59].

O efeito do ultra-som no processo de extração depende da frequência, potência do aparelho e do tempo de extração [60].

Existem dois tipos distintos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas [59,60]: o banho de ultra-som e a sonda, que podem ser visualizados na **Figura 3**.

No banho de ultra-som, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultra-sonora é transmitida através de um líquido, usualmente a água. A energia é irradiada verticalmente pelas ondas sonoras geradas na base do banho e transmitidas através das paredes do vaso para o frasco com a mistura extratora [51,57].

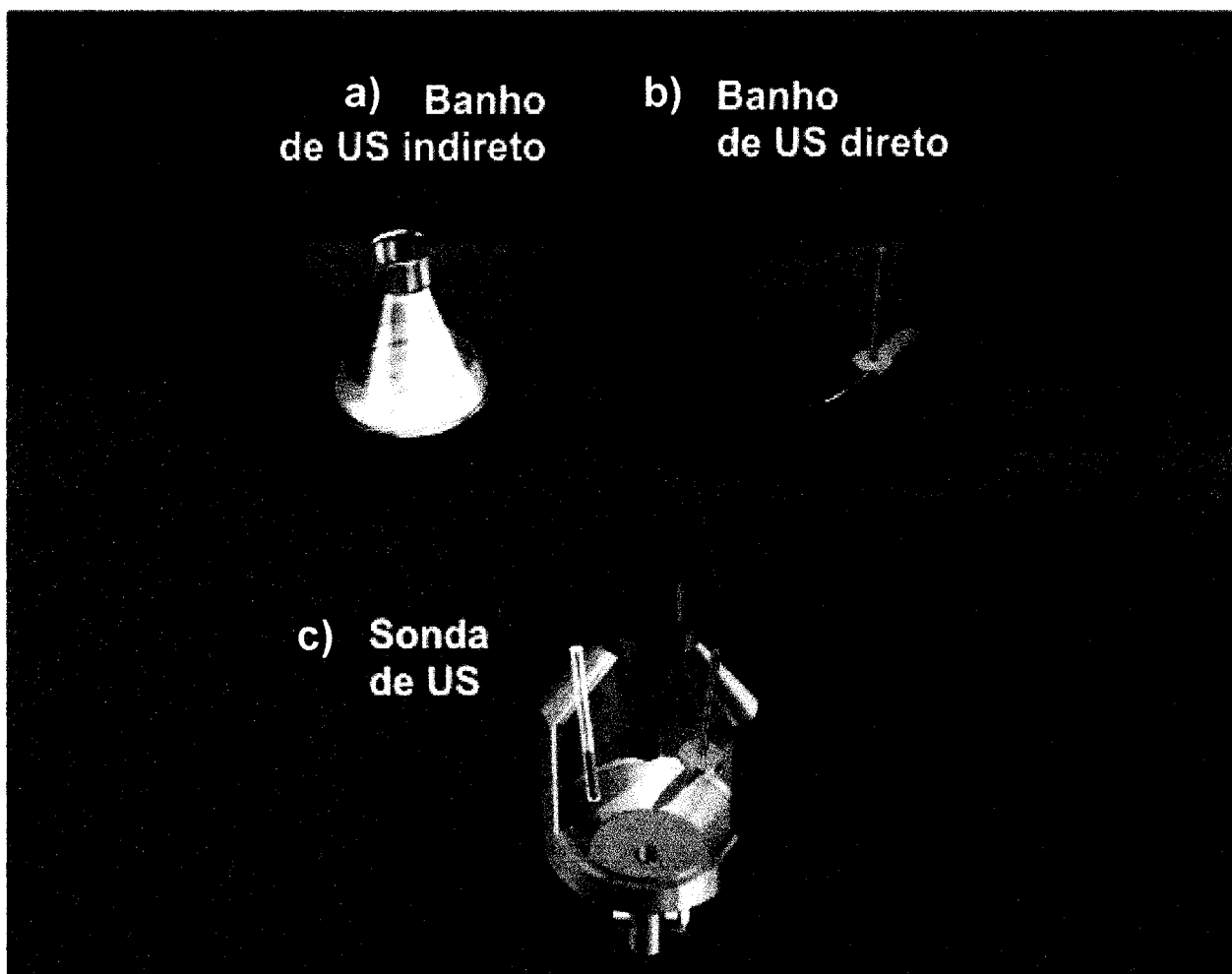


Figura 3: Esquema geral de sistemas de aplicação de ondas ultra-sonoras no campo da química: (a) banho indireto, (b) banho direto e (c) sonda.

O banho de ultra-som, a mais ampla fonte laboratorial disponível de irradiação ultra-sônica, apresenta como vantagens uma melhor distribuição de energia através das paredes do vaso de extração e o fato de não requerer adaptação especial para o frasco extrator. Apresenta como desvantagens o fato de que a quantidade de energia fornecida para o frasco extrator não é

facilmente quantificável, porque depende do tamanho do banho, do tipo de recipiente, da espessura das paredes do recipiente e da posição do frasco de extração no banho. É difícil controlar a temperatura do sistema, pois o equipamento tende a aquecer quando usado por longos períodos (a temperatura do meio extrator é mais alta que a temperatura do líquido no banho) [49].

A sonda, por outro lado, encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, em contato direto com o sistema extrator. Apresenta como vantagens a potência totalmente disponível (não há transferência de irradiação ultra-sônica pelas paredes do vaso) e a possibilidade de ser sintonizada para fornecer um melhor desempenho a diferentes potências. Como desvantagens, apresenta: frequência fixa, dificuldade de controle de temperatura em sistemas sem refrigeração e o fato de que espécies radiculares podem ser formadas na ponteira da sonda, conseqüentemente apresentando problemas relacionados à contaminação do meio extrator com a ponteira [51-57].

A eficiência da extração por ultra-som é comparável, ou pode ser ainda melhor que a obtida por Soxhlet, e tem como vantagens: alta reprodutibilidade, possibilidade de utilização de vários tamanhos de amostra, rapidez de processamento da amostra e baixo custo.

Na área de química analítica, a radiação de ultra-som tem sido usada freqüentemente no pré-tratamento de amostras sólidas, o que facilita e acelera operações, tais como a extração de compostos orgânicos e inorgânicos, dispersão, homogeneização, nebulização, lavagem e derivatização [61-63].

Nesta técnica, a amostra moída é misturada ao solvente e colocada em um recipiente, que é imerso em um banho de ultra-som. A amostra é submetida, geralmente, a vários solventes em ordem crescente de polaridade, dependendo da classe de compostos a serem extraídos, em um tempo determinado (muito menor do que na extração por Soxhlet) e a uma frequência própria do banho. Após, o extrato é submetido à filtração e concentração.

Exemplos de trabalhos publicados utilizando ultra-som como técnicas de extração de plantas estão apresentados na **Tabela II**.

Tabela II: Revisão da literatura sobre aplicação de ultra-som na extração de plantas.

Amostra	Analito	Referência	Nº
<i>Hibiscus tiliaceus</i> l.	ésteres, ácidos carboxílicos	Melechi <i>et al.</i>	[64]
<i>Mentha x piperata</i>	mentol	Shotipruk <i>et al.</i>	[65]
<i>Fagopyrum esculentum</i>	hemicelulose	Hromádková <i>et al.</i>	[66]
Chá preto, chá mate	metilxantina	Lacerda <i>et al.</i>	[24]
<i>Valerian officinalis</i> l.	borneol	Valachovic <i>et al.</i>	[41]
<i>Salvia officinalis</i>	cineol, borneol	Salisová <i>et al.</i>	[44]
<i>Chresta spp</i>	esteróides e triterpenos	Schinor <i>et al.</i>	[67]
<i>Macleaya cordata</i>	alcalóides	Zhang <i>et al.</i>	[68]
<i>Sophora japonica</i>	antioxidantes	Paniwnyk <i>et al.</i>	[69]
Manjerona e orégano	cis-sabineno hidratado, terpineol-4 e α -terpineol, timol e carvacrol	Rodrigues	[70]
<i>Panax ginseng</i>	saponinas	Wu <i>et al.</i>	[71]
Soja	gordura	Stavarache <i>et al.</i>	[72]
Celulose	eucalipto	Pappas <i>et al.</i>	[73]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	vitamina E	Torre <i>et al.</i>	[74]
Soja	isoflavonas	Rostagno <i>et al.</i>	[75]
<i>Pastinaca sativa</i>	furanocumarinas	Sowa <i>et al.</i>	[76]
Flores de citros	linalol	Alissandrakis <i>et al.</i>	[77]
<i>Pistachia vera</i>	antioxidantes	Goli <i>et al.</i>	[78]
Óleo vegetal	ácidos graxos	Chemat <i>et al.</i>	[79]
<i>Eucommia ulmodies</i>	ácidos clorogênicos	Li <i>et al.</i>	[80]

2.3 Extração com líquido pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma técnica de extração relativamente nova, que utiliza solventes convencionais em elevada temperatura e pressão, com o objetivo de melhorar extrações quantitativas de amostras sólidas e semi-sólidas [81-82]. A elevação da temperatura aumenta a solubilidade, razão de difusão e transferência de massa, enquanto a viscosidade e a tensão superficial dos solventes são menores do que à temperatura ambiente. Também ocorre a interrupção das fortes interações soluto-matriz, causadas por forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações de dipolo entre as moléculas do soluto e os sítios ativos da matriz. A

alta pressão melhora a penetração do solvente na matriz, o que favorece a extração. A técnica de extração com líquido pressurizado tem a vantagem de reduzir o tempo de extração e o descarte de solventes [83].

O processo de extração com líquido pressurizado (PLE) usando o equipamento ASE 300™ é constituído de 6 etapas: 1) colocação da célula no forno; 2) preenchimento da célula com solvente; 3) extração estática; 4) *flushing* com solvente novo; 5) purga do solvente do sistema com liberação da pressão residual e 6) esvaziamento da célula. Um esquema geral do equipamento assim como a descrição das principais etapas pode ser visualizado na **Figura 4**.

Uma pressão controlada é aplicada à célula de extração contendo uma quantidade de amostra conhecida. A célula é mantida aquecida (temperatura constante) durante todo o tempo de extração. Após a extração, o extrato é liberado através da passagem de gás inerte (N₂ ultra-puro) e a amostra é lavada com uma quantidade definida do mesmo solvente usado na extração (*flushing*). O extrato e o líquido de lavagem são coletados em um frasco apropriado.

Neste sistema, o processo de extração é realizado em temperaturas que excedem o ponto normal de ebulição do solvente, e, dessa forma, a pressão na célula de extração deve permanecer alta para manter o solvente no estado líquido. Temperatura e pressão influenciam na eficiência do processo. Devido às altas pressões e temperaturas utilizadas, a capacidade de solubilização, a difusividade e a cinética de extração são aumentadas, acompanhadas por uma diminuição dos tempos de extração e volumes de solventes [52].

Desde o desenvolvimento do primeiro aparelho de extração acelerada com solvente, em 1995, poucas referências podem ser encontradas quanto à aplicação da mesma na extração de plantas [84].

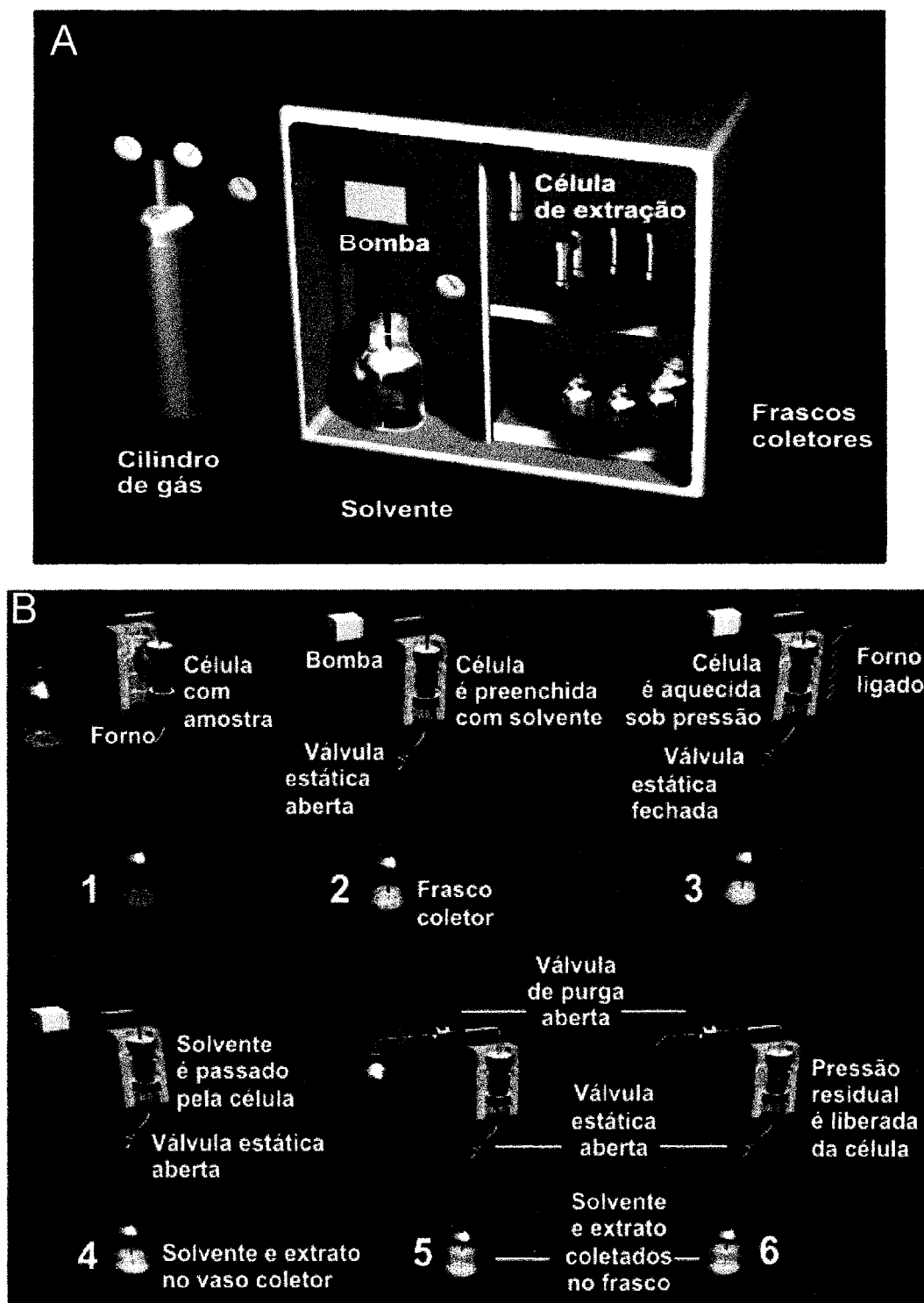


Figura 4: (A) Esquema geral do Equipamento e (B) Etapas da extração com líquido pressurizado no sistema ASE™: 1) colocação da célula no forno; 2) preenchimento da célula com solvente; 3) extração estática; 4) *flushing* com solvente novo; 5) purga do solvente do sistema com liberação da pressão residual e 6) esvaziamento da célula.

2.3.1 Vantagens e desvantagens da extração com líquido pressurizado

O uso da extração acelerada por solventes apresenta algumas vantagens e desvantagens sobre a utilização de técnicas convencionais de extração:

Vantagens:

- Reduzido tempo de extração;
- Fácil de operar;
- Preparo da amostra antes da extração é fácil e rápido;
- Alta pressão durante a extração permite a extração de compostos termicamente degradáveis;
- Pode-se utilizar somente um solvente ou uma mistura de solventes;
- Utiliza pouco solvente;
- Sistema automatizado; resultando em alta reprodutibilidade dos parâmetros de extração (temperatura, pressão, tempo estático, volume de “flush”);
- Extração de várias amostras em um ciclo.

Desvantagens:

- Alto custo do equipamento;
- A extração não é seletiva;
- “Clean-up” geralmente é necessário antes das análises cromatográficas.

Desde o desenvolvimento do primeiro aparelho de extração acelerada com solvente, em 1995, poucas referências podem ser encontradas quanto à aplicação da mesma na extração de plantas [84].

Algumas referências bibliográficas utilizando extração acelerada por solventes aplicadas a plantas encontram-se resumidas na **Tabela III**.

Tabela III: Revisão da literatura sobre aplicação da extração com líquido pressurizado (PLE) na extração de plantas.

amostra	analito	Referência	N°
Chá preto, café	cafeína	Dawidowicz et al.	85
Chá preto, café	cafeína	Dawidowicz et al.	86
<i>Spirulina platensis</i>	antioxidantes	Herrero, M. et al.	87
<i>Spirulina platensis</i>	antioxidantes	Herrero, M. et al.	88
Maçã	polifenóis	Alonso-Salces et al.	89
Castanha	vitamina E	Delgado-Zamarreño et al.	90
Soja	isoflavonas	Rostagno et al.	91
Alecrim	antioxidantes	Herrero, M. et al.	92
<i>Curcuma phaeocaulis</i>	sesquiterpenos	Yang et al.	93
Plantas medicinais	ginsenosídeos	Choi et al.	94
Plantas medicinais	alcalóides	Ong et al.	95
Soja	isoflavonas	Klejdus et al.	96
Plantas medicinais	timol, saponinas	Benthin et al.	97
Chá	catequinas	Piñeiro et al.	98
<i>Juniperus virginiana</i>	cedrol, cedreno	Eller et al.	99
<i>Angelica sinensis</i>	ácido ferrúlico	Lao et al.	100
Maçã	polifenóis	Alonso-Salces et al.	101

2.4 Extração com fluido supercrítico

A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária que explora as propriedades dos solventes acima de seus pontos críticos [102,103].

O solvente é chamado de supercrítico porque se encontra acima de sua temperatura crítica e de sua pressão crítica. A temperatura crítica é a temperatura mais alta, na qual um gás pode ser convertido em líquido pelo aumento da pressão. Por sua vez, a pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura [104-106]. Neste estado, comparativamente aos líquidos, o solvente apresenta coeficiente de difusão mais alto, viscosidade mais baixa e maior densidade do que os gases. As viscosidades mais baixas e as taxas de difusão mais altas do fluido supercrítico o tornam adequado para extração de compostos presentes em matrizes sólidas, por exemplo, extratos de plantas [107 –110].

A densidade, viscosidade e difusividade são propriedades da região crítica que são afetadas por mudanças na temperatura e/ou pressão. O aumento da pressão leva a maior densidade (o que favorece o rendimento do processo), por outro lado, menores difusividades e maiores viscosidades são produzidas (o que desfavorece o rendimento) [111-114]. Estas propriedades são apresentadas na **Tabela IV** [58].

Tabela IV: Propriedades termodinâmicas dos fluidos [58].

Estado do Fluido	Densidade (g.cm ⁻³)	Difusividade (cm ² .seg ⁻¹)	Viscosidade (g.cm ⁻¹ .seg ⁻¹)
Gás	(0,6-2) x 10 ⁻³	0,1-0,4	(1-3) x 10 ⁻⁴
Líquido	0,6-1,6	(0,2-2) x 10 ⁻⁵	(0,2-3) x 10 ⁻²
Supercrítico	0,2-0,5	0,7 x 10 ⁻³	(1-3) x 10 ⁻⁴

A temperatura apresenta, em determinado limite, um efeito oposto ao da pressão: o incremento da temperatura ocasiona uma diminuição na densidade (desfavorece o rendimento), um aumento na difusividade e diminuição da viscosidade (favorece o rendimento). Há de se salientar também, que o aumento da temperatura ocasiona um aumento na pressão de vapor do óleo, favorecendo o incremento do rendimento na extração. Assim, o efeito da temperatura e pressão é complexo, e o seu entendimento é de fundamental importância na análise do processo de SFE [115-118].

2.4.1 Dióxido de carbono como solvente

O dióxido de carbono (CO_2) é um solvente particularmente atrativo para aplicação em alimentos, mais especificamente em plantas, pois, além de atender aos critérios para escolha do solvente, apresenta certas características que comprovam a sua habilidade e justificam seu uso. No caso do CO_2 , o ponto crítico é alcançado sobre a curva líquido-gás a uma temperatura próxima à ambiente ($31,3\text{ }^\circ\text{C}$) e pressão relativamente baixa de 73 atm.

O CO_2 supercrítico é completamente miscível em hidrocarbonetos de baixo peso molecular e em compostos orgânicos oxigenados. Sua solubilidade mútua com a água é pequena, o que possibilita sua utilização na extração de compostos orgânicos de soluções aquosas. Tem alta volatilidade, comparado com qualquer composto orgânico, facilitando a separação e possibilitando a recuperação do produto e sua recirculação como solvente. As propriedades de transporte são favoráveis, pois apresenta baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Com seu baixo calor de vaporização, especialmente perto do ponto crítico, o consumo de energia em muitos processos é baixo [119].

No estado líquido, o CO_2 é miscível com todos os solventes líquidos comuns, do metanol ao pentano, e com hidrocarbonetos monoterpênicos puros, monoterpênicos aldeídicos e todos os ácidos carbônicos líquidos [120].

2.4.2 Técnica de extração supercrítica

A SFE é uma técnica analítica que apresenta meios bastante atrativos para o processamento de produtos de ocorrência natural, devido a várias características distintas, tais como a facilidade de recuperação do soluto e reciclagem do solvente com a simples manipulação de temperatura e/ou pressão, a possibilidade de direcionar a separação pela escolha das condições termodinâmicas de temperatura e/ou pressão, e, com isso, a sintonia do poder de solvência do fluido usado na extração para uma determinada extração e/ou separação, e o controle da seletividade do processo pela escolha apropriada do solvente e da combinação solvente/co-solvente utilizados [121].

Vários trabalhos são apresentados na literatura relacionados ao emprego de fluidos supercríticos como solventes na extração de compostos naturais. Os resultados apresentados apontam para um aumento considerável no rendimento do processo, através do emprego de um solvente atóxico, totalmente liberado no final do processo e da utilização de temperaturas amenas, evitando a possível degradação de compostos termolábeis. Em adição, os meios supercríticos permitem ainda elevada controlabilidade no poder de solvatação do solvente, possibilitando processos simples e pouco onerosos de separação após a extração. Tais características dos meios supercríticos são de grande valia para a extração e a obtenção de produtos naturais de alto valor, tanto que tem sido amplamente empregados.

Na **Tabela V** são apresentadas algumas referências bibliográficas encontradas na literatura sobre a técnica de SFE aplicada à extração de produtos naturais.

Tabela V: Aplicações da extração com fluído supercrítico em plantas.

Amostra	Analito	Referência	N°
<i>Ilex paraguariensis</i>	metilxantinas	Saldaña et al.	122
<i>Ilex paraguariensis</i>	alcalóides	Saldaña et al.	123
<i>Ilex paraguariensis</i>	cafeína, teobromina, esqualeno, fitol, vitamina E, ácido palmítico, esteróides.	Esmelindro et al.	124
<i>Laurus nobilis L.</i>	cineol, linalol, metil eugenol	Caredda et al.	125
<i>Lupinus spp</i>	alcalóides	Lanças et al.	126
<i>Carum copticum</i>	timol, mirceno, limoneno	Khajeh et al.	127
<i>Mentha pulegium L.</i>	menta	Aghel et al.	128
<i>Zataria multiflora Boiss</i>	timol, terpineno, ρ -cimeno	Ebrahimzadeh et al.	129
<i>Hypericum perforatum L.</i>	alcanos, ácidos orgânicos e ésteres	Seger et al.	130
<i>Ginkgo biloba</i>	flavanóides e terpenóides	Yang et al.	131
<i>Majorana hortensis Moench</i>	<i>cis</i> -sabineno hidratado, acetato de <i>cis</i> -sabineno hidratado, terpineol-4 e α -terpineol.	Rodrigues et al.	132
<i>Origanum vulgare</i>	<i>cis-trans</i> -sabineno hidratado, timol	Rodrigues et al.	133
<i>Euphorbia macroclada</i>	hidrocarbonetos	Özcan et al.	134
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	alcalóides	Pereira et al.	135
<i>Pistachia vera</i>	antioxidantes	Goli et al.	136
<i>Lupinus spp, Plinia pinnata</i>	alcalóides	Lanças et al.	137
Chá	catequinas	Chang et al.	138
<i>Ferula assa-foetida</i>	α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, β -ocimeno	Khajeh et al.	139
<i>Foeniculum vulgare Mill</i>	ácido hexadecanóico, tetradecano, sabineno, α -pineno, mirceno	Khajeh et al.	140
<i>Juglans regia L</i>	compostos fenólicos	Amaral et al.	141

2.4.3 Equipamento típico da extração supercrítica

O sistema de extração por CO₂ supercrítico consiste basicamente de cinco componentes: (A) fonte de CO₂; (B) bomba de alta pressão; (C) cela de extração; (D) restritor de pressão e (E) coletor, além dos sistemas controladores de temperatura e pressão [142], conforme pode ser visualizado na **Figura 5**.

O CO₂ é fornecido ao sistema já pressurizado através de cilindros sifonados. A pressão de operação, se superior a do cilindro, é obtida por uma bomba de alta pressão. A matriz do soluto é “lavada” pelo solvente no extrator e a mistura solvente-soluto é submetida a uma decompressão por válvula redutora de pressão. A mistura passa a ser, então, gás-soluto, sendo este recolhido no separador para posterior análise. O gás que emana do separador pode ser recirculado, quando em escala preparativa.

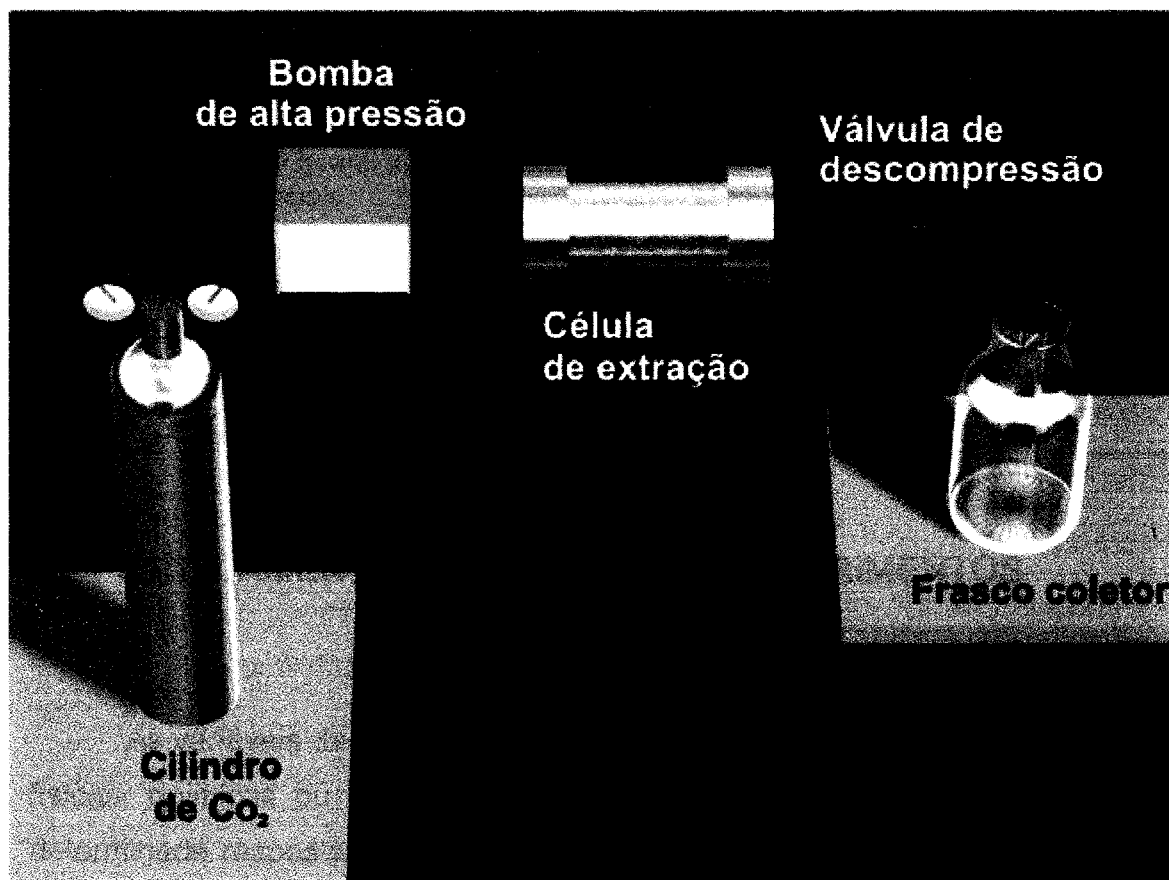


Figura 5: Esquema representativo de um processo de extração supercrítica, composto por: cilindro sifonado do solvente, bomba de alta pressão, célula de extração, válvula de decompressão e frasco coletor.

2.5 Comparação das técnicas de extração

Na Tabela VI são comparadas as principais vantagens e desvantagens das diferentes técnicas de extração utilizadas.

Tabela VI: Comparação entre métodos de extração utilizados em plantas.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Maceração	método padrão; grande quantidade de amostra; baixo custo.	tempo elevado de extração; grande quantidade de solvente; exposição do analista a solventes; requer evaporação do solvente.
SFE	rápido; o CO ₂ não é contaminante ambiental; método seletivo, pode-se variar a temperatura e pressão; pequena quantidade de solvente; não requer filtração; sem exposição a solventes; pode ser automatizado.	tamanho da amostra é limitado; depende da matriz; alto custo.
Ultra-som	rápido; grande quantidade de amostra; baixo custo.	grande quantidade de solvente; trabalhoso; requer filtração; requer evaporação do solvente; exposição do analista a solventes.
PLE	rápido; mínima quantidade de solvente; não requer filtração; totalmente automatizado; fácil de usar	custo muito elevado

3.0 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTOS

As variáveis de um planejamento estatístico representam características físicas, químicas ou físico-químicas, as quais definem ou influenciam uma determinada resposta. Em geral, estas variáveis são avaliadas dentro de um campo experimental previamente delimitado [143].

A resolução deste tipo de problema seguiu, durante muito tempo, metodologias baseadas no método empírico de tentativa e erro, ou aquelas onde todas as variáveis, menos uma, eram mantidas constantes. Na maioria das situações, esta abordagem representa um gasto desnecessário de tempo, esforço e recursos [144]. Em contraposição a essa sistemática, a abordagem moderna utiliza metodologias estatísticas de planejamento e otimização de experimentos, as quais têm se mostrado bastante promissoras [145]. Através de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os

pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos [146].

Planejar experimentos é definir uma seqüência de coleta de dados experimentais para atingir certos objetivos. De forma geral, podemos dividir as técnicas de planejamento de experimentos em três grandes grupos: a) para desvendar o grau de dependência entre variáveis e respostas; b) para desenvolver e discriminar modelos; c) para estimativa ótima de parâmetros dos modelos. Os dois últimos grupos exigem modelos do processo/fenômeno (teóricos ou semi-empíricos) sob investigação [147].

Um experimento fatorial é aquele que consiste em selecionar um número de variáveis (fatores e condições) a serem investigadas realizando-se experimentos em todas as combinações possíveis destes níveis e fatores. Desta forma, um projeto fatorial 2^2 possui dois níveis e dois fatores requerendo quatro condições experimentais. O número de condições experimentais, obtidas a partir de um projeto fatorial, cresce exponencialmente com o aumento do número de níveis e/ou variáveis empregadas. Por exemplo, com três variáveis e três níveis, têm-se 27 condições experimentais.

Os experimentos fatoriais têm como característica principal incluir, em cada ensaio completo, todas as combinações possíveis dos diferentes fatores ou conjuntos de tratamentos, exceto no caso particular dos experimentos fatoriais fracionários [148].

Os experimentos fatoriais fracionários são utilizados quando o número de experimentos a serem realizados é elevado. Neste caso, pode-se realizar um planejamento com uma fração determinada do planejamento fatorial completo, denominado de fração meia. A construção dessa fração meia segue metodologia descrita nos modelos estatísticos [146].

É importante salientar que números de experimentos e número de condições experimentais são conceitos distintos, já que certo número de réplicas deve ser adicionado ao número de condições experimentais para fornecer o número de experimentos.

As réplicas ou repetições de experimentos são de fundamental importância e servem para determinar o erro experimental na resposta em estudo e/ou a reprodutibilidade do esquema experimental utilizado (metodologia + equipamento).

Existem várias maneiras de abordar tal aspecto durante o planejamento dos experimentos, sendo que a escolha da abordagem é peculiar a cada experimento/equipamento e será ditada, principalmente, pela experiência do analista [147].

4.0 ANÁLISE INSTRUMENTAL

4.1 Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia é uma poderosa técnica de separação usada para os componentes de uma mistura complexa. Os componentes da amostra são distribuídos entre duas fases, uma das quais permanece estacionária, enquanto a outra elui entre os interstícios ou sobre a superfície da fase estacionária. O movimento da fase móvel (FM) resulta numa migração diferencial dos componentes da amostra. O mecanismo envolvido nesta migração diferencial vai depender do tipo de fase móvel e estacionária utilizada [149,70].

A amostra, que pode ser um gás ou um líquido volátil, é injetada no injetor do cromatógrafo através de uma micro-seringa ou de um sistema de injeção automático, onde é aquecida e vaporizada. Em determinadas temperaturas, as substâncias vaporizam e, de acordo com as suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por determinado tempo, chegando à saída da coluna em tempos diferentes. Os componentes da amostra movem-se na coluna numa velocidade determinada por vários fatores, mas principalmente pela força de retenção, que vai depender da solubilidade destes compostos na fase estacionária e da sua volatilidade na fase móvel. Os

componentes da amostra, já separados na coluna, entram no detector, onde são individualmente detectados [150,71].

Atualmente, a maioria dos espectrômetros de massas é conectada a um cromatógrafo a gás (GC/MS) ou líquido (LC/MS), assim este último serve como um meio de separação dos analitos e posterior introdução no espectrômetro de massas. O tipo de fonte de ionização mais comum em espectrometria de massas é a de impacto por elétrons (EI), a qual emprega um filamento aquecido para gerar elétrons com energia suficiente para provocar ionização dos analitos de interesse, mediante impacto destes elétrons energizados. Os íons formados são direcionados para o analisador, cuja função é separá-los de acordo com sua relação massa/carga (m/z) [151,72].

GC/MS é uma técnica muito utilizada pelos pesquisadores para análise de extratos de plantas, pois permite a separação dos componentes vaporizáveis e fornece um espectro de massas para cada pico. Esse espectro indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. Pela massa molecular obtêm-se dados sobre a classe química a qual a substância pertence, enquanto que o padrão de fragmentação serve para comparar com os dados da biblioteca de espectros de massas do computador. Uma vez feita a comparação, o computador mostra as probabilidades quanto à identidade da substância analisada. Para aumentar a sensibilidade e melhorar a seletividade da técnica GC/MS, os analitos podem ser analisados no modo SIM (monitoramento de íons selecionados) [152,73].

Para selecionar os íons a serem monitorados, analisa-se o espectro de massas de cada composto, ou classe de compostos tentativamente identificados e realiza-se uma nova injeção da amostra marcando estes íons. Tem-se, desta forma, a transformação do espectrômetro de massas de detector universal para detector seletivo. O cromatograma resultante (MIC – Monitoring Ion Chromatogram) difere do cromatograma inicial (TIC – Total Ion Chromatogram) por apresentar maior sensibilidade, maior seletividade e menor número de picos.

4.2 Espectroscopia de absorção atômica (FAAS)

Essa técnica de determinação de elementos químicos envolve a absorção ou emissão de luz por átomos, causada pela absorção de uma determinada forma de energia, que altera a estabilidade da configuração eletrônica destes elementos, promovendo a excitação de elétrons. Após este estado de instabilidade, o átomo imediatamente retorna à forma estável. Esse processo libera energia em quantidades proporcionais àquelas absorvidas na excitação, e os comprimentos de onda de energia emitida são característicos de cada elemento. Portanto, cada comprimento de onda da radiação absorvida ou emitida corresponde a um determinado elemento [74,154].

A energia absorvida ou emitida no processo é mensurada e aplicada a três campos da espectroscopia atômica: absorção, emissão e plasma. No caso da emissão atômica, a amostra recebe uma carga de energia, produzindo a excitação dos elétrons aptos a emitir luz. Caso o átomo absorva luz com comprimento de onda específico para atingir o estado de excitação, o processo é chamado de absorção atômica. Em emissão atômica, a energia de excitação é gerada por uma chama, enquanto que o processo de absorção atômica utiliza principalmente uma lâmpada (cátodo oco) como fonte de energia. Existem lâmpadas que emitem espectro de um só elemento, como também lâmpadas para vários elementos, ficando a cargo de o monocromador selecionar o comprimento de onda desejado.

O processo que utiliza lâmpada de cátodo oco para análise simples, ou seja, de um elemento cada vez, é mais confiável, pois produz uma intensidade de emissão superior àquela da lâmpada para análise de vários elementos, o que compromete a análise quando uma maior precisão é exigida [75,155]. Foram desenvolvidos equipamentos que utilizam processadores altamente especializados nas determinações químicas. A automatização proporcionou agilidade e confiabilidade às análises, calibrando e tornando estas curvas de calibração mais precisas, fornecendo resultados e correlações entre dados de absorbância e concentração com maior exatidão [76,156].

CAPÍTULO 3:
DETERMINAÇÃO DOS MINERAIS
DAS FOLHAS DE ERVA-MATE
CULTIVADAS SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES AGRONÔMICAS

1.0 EXPERIMENTAL

1.1 Detalhamento experimental de campo

As amostras de erva-mate foram coletadas em um experimento de campo, montado nas dependências da Indústria e Comércio de Erva-Mate Barão Ltda., no município de Barão de Cotegipe - RS, com manejo realizado mediante controle de adubação, intensidade de luz e idade da folha. Neste experimento foram conduzidos oito (8) tratamentos, onde cada tratamento dispunha de sete (7) plantas para a coleta das amostras. Todas as plantas, no início do experimento, tinham idade em torno de sete anos e foram podadas em condições idênticas. Neste ponto elas foram identificadas como tendo zero (0) meses de idade de folha.

O efeito da idade de folha foi avaliado com coletas semestrais, possibilitando a análise de folhas de 6, 12, 18 e 24 meses, onde se alternam as fases de inverno e verão. Desta forma, as amostras de 6 e 18 meses corresponderam ao período de verão, e as amostras de 12 e 24 meses ao período de inverno.

O método utilizado para investigar o efeito da adubação empregou quatro tratamentos diferentes: no primeiro deles (linha 1), nenhum adubo foi adicionado às plantas; no segundo (linha 2), foi aplicada uma dose de 300g/planta/ano de uréia (fonte de nitrogênio); no terceiro (linha 3) aplicou-se uma dose de 120 g/planta/ano de cloreto de potássio (fonte de potássio); no quarto tratamento (linha 4) foi aplicada uma dose de 300g/planta/ano de uréia e mais 120 g/planta/ano de cloreto de potássio.

Para avaliar o efeito da incidência de luz sobre a composição química da erva-mate, a área experimental foi dividida em duas metades, sendo que em uma delas foi utilizada uma tela de sombreamento (sombrite), na qual 75% da luminosidade incidente é retida, e na outra metade as plantas foram deixadas a pleno sol.

A **Figura 6** mostra o experimento de campo que evidencia o controle de intensidade de luz.



(a)



(b)

Figura 6: Foto ilustrativa do experimento de campo: (a) área a pleno sol e (b) área sombreada.

1.2 Amostras

A amostra de cada tratamento constituiu-se de ramos e folhas de sete (7) plantas. Em cada uma destas sete plantas foram coletados de 500 a 600 g de folhas e ramos do terço superior, médio e inferior. Para cada tratamento foram retirados 4 kg de amostras homogeneizadas, para cada idade de poda.

Após a coleta, as amostras foram submetidas ao processo de secagem em estufa com recirculação de ar por um período de 24 horas, a uma temperatura entre 32 e 35° C.

A umidade total das amostras foi determinada segundo o método padrão do Instituto Adolfo Lutz (IAL) citado por Valduga [7], ficando em torno de 5 % para todas as amostras. Após a secagem, as amostras foram moídas e classificadas quanto à granulometria, em peneiras Tyler (40 mesh). Para evitar a oxidação, as amostras foram acondicionadas em ambiente inerte (com N₂) dentro de frascos de vidro e armazenadas em refrigerador (6 a 8 °C) até o momento da extração.

1.2.1 Digestão das amostras

As amostras de cada tratamento (3g) foram calcinadas a 700 °C por um período de 5 horas, até a decomposição de toda a matéria orgânica. As cinzas obtidas foram solubilizadas em 2 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio a 30% e aquecidas até a obtenção uma solução clara. Posteriormente, esta solução foi transferida para balões volumétricos, completando-se o volume a 50 mL com água deionizada.

1.3 Procedimento para determinação dos minerais

Para a determinação dos minerais foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) modelo Varian AA55.

Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Mg, Na, Mn, Zn, Fe e Cu como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama de ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. Os parâmetros instrumentais são apresentados na **Tabela VII**.

As determinações de Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção, e a determinação de Na e K no modo emissão. Todas as análises foram realizadas em triplicata para as amostras e soluções padrão. Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em uma curva de calibração obtida com as soluções padrão.

Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg, foi adicionado cloreto de lantânio nas amostras e nas soluções padrão na proporção de 1% (w/v).

Tabela VII: Parâmetros instrumentais utilizados no FAAS.

Elemento	λ (nm)	Intensidade da lâmpada (mA)	Fenda (nm)	Concentração de trabalho (mg L ⁻¹)
Ca	239,9	10	0,2	2 – 800
Na	303,2	5	0,2	2 – 400
Mg	202,6	4	1,0	0,15 – 20
Mn	403,1	5	0,2	0,5 – 60
Zn	213,9	5	1,0	0,01- 2.0
Cu	324,7	4	0,5	0,03 – 10
Fe	248,3	5	0,2	0,06 – 15

Os efeitos das variáveis investigadas no conteúdo dos metais selecionados foram estatisticamente avaliados por análise de variância acoplada ao teste de Tukey, com nível de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistica Windows 6.0.

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Influência das condições agronômicas sobre o teor de minerais nas folhas de erva-mate

A **Figura 7** apresenta uma foto das folhas de erva-mate detalhando o efeito da intensidade de luz sobre as mesmas.



Figura 7: Foto das folhas da erva-mate com idade de 18 meses, sem adubação e cultivada sob sol (a) e sombra (b).

Percebe-se que a folha da planta cultivada sob menor intensidade de luz (**Figura 7(b)**) é mais escura e mais espessa.

Os teores de cinzas obtidos para as folhas de erva-mate, em função das condições agronômicas investigadas, estão apresentados na **Tabela VIII** (página 43). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados representam a média dos experimentos. Os teores de cinzas das folhas de

erva-mate ficaram em torno de 4,97 a 7,63 %, mostrando-se de acordo com a literatura [7].

Os valores das cinzas são mais elevados em amostras de plantas protegidas do sol, uma vez que o metabolismo da planta é diminuído devido à redução na fotossíntese das folhas. Segundo Kaspary [156], mudas de erva-mate desenvolvidas em condição de sombreamento adquirem maior altura e maior produção de matéria seca, ou seja, maior produção de material mineral. Este fato talvez esteja ligado à aparência da folha, como já foi visualizado na **Figura 7**.

As **Tabelas IX e X** (páginas 44 e 45) mostram os resultados em termos de quantidade de macronutrientes e micronutrientes em mg/100g nas folhas de erva-mate proveniente de plantas cultivadas ao sol e à sombra, em diferentes épocas de poda e com diferentes tipos de adubação. Pode-se observar que os macro-nutrientes (K, Ca, Mg e Mn) apresentam valores entre 500 e 2500 mg/100g, sendo o potássio o composto majoritário. Estes valores estão de acordo com os valores encontrados por Sanz *et al.*[42] e Garcia *et al.*[43]. Em geral, o teor de K, Ca, Mg e Mn são altos para tecidos de plantas, e a ordem crescente de concentração destes metais é: K>Ca>Mg>Mn [157, 158].

Entre os micronutrientes (Na, Zn, Fe e Cu), o sódio é o elemento majoritário, apresentando um teor acima de 50 mg/100 g nas folhas de erva-mate.

A **Tabela XI** (página 46) apresenta os resultados da análise estatística da influência da intensidade de luz, idade das folhas e adubação no teor de macro e micro-nutrientes das folhas de erva-mate. Os valores apresentados nesta tabela são a média dos valores do conteúdo dos metais para cada condição. Pode-se observar que a idade das folhas exerce uma grande influência no seu conteúdo mineral.

O comportamento dos macro e micronutrientes é levemente afetado pelas condições agronômicas (idade das folhas, fertilização e intensidade de luz). Em folhas jovens (6 meses) os macronutrientes e os micronutrientes têm geralmente os maiores valores de concentração.

A concentração dos macronutrientes, exceto para magnésio, diminui com o aumento da idade de poda das folhas. Além disso, o conteúdo de alguns micronutrientes é aumentado em folhas de idade intermediária, em torno de 12 meses, e alguns deles não apresentam uma significativa diminuição do teor com o tempo.

Com relação à intensidade de luz, plantas cultivadas à sombra apresentaram maiores teores de minerais (com exceção do magnésio e manganês) do que as cultivadas ao sol.

A erva-mate é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente nas florestas, nas condições de sub-bosque, ou seja, tolerando o sombreamento natural causado por espécies de maior altura, o que faz com que seja conhecida também como planta reprodutora à sombra. Portanto, ao ser cultivada fora de suas condições naturais, pode-se esperar alterações fisiológicas no sentido de sua adaptação ao meio. É o que ocorre quando a mesma é cultivada em condições de luminosidade mais intensa. Nesta situação, a planta tende a reduzir a superfície foliar não só para diminuir a fotoinibição (inibição da captação de luz pela clorofila, o que resulta em menor fotossíntese das plantas) e o aquecimento excessivo, mas também para reduzir a perda de água [159].

Em condições de sombreamento, a erva mate é considerada uma espécie de alta longevidade foliar. A planta metaboliza substâncias químicas inibidoras de insetos desfoliadores, o que propicia à folha muito mais tempo para realizar a fotossíntese que numa planta que se desenvolve em condições de pleno sol. Com isso, a planta sombreada também deve assimilar uma maior quantidade de nutrientes [160].

Em relação ao Mg, o mesmo é absorvido pelas plantas na forma de íon Mg^{+2} e constitui o núcleo central da molécula de clorofila, fundamental para a fotossíntese. Como não houve diferença de concentração deste elemento nas folhas sombreadas e não sombreadas, o maior acúmulo dos outros nutrientes (K, Ca, Cu, Zn e Fe) nas folhas sombreadas pode não ser só devido à fotossíntese, mas também a outros fatores, como menor evapotranspiração (perda de água durante o processo de evaporação e transpiração) e menor

aquecimento foliar. Isso faz com que a própria fotossíntese seja mais eficiente, uma vez que os estômatos tendem a ficar mais tempo abertos, em função da menor perda de água. Assim, pode-se esperar que no ambiente mais sombreado, a atividade metabólica seja mais constante.

Na **Tabela XI** também é observado um aumento expressivo no conteúdo de manganês quando as plantas são adubadas com fontes de nitrogênio e potássio ao mesmo tempo. No caso do Mn, a maior concentração foliar no ambiente sombreado foi observada somente no tratamento sem adubação. Quando se aplicou só N, os teores de Mn não diferiram significativamente. Porém, chama a atenção o fato de que quando se aplicou N juntamente com K ou apenas K, houve um expressivo aumento de Mn foliar nas duas situações de luminosidade. Como não há na literatura informações a respeito de uma possível sinergia entre K e Mn, pode-se trabalhar com a hipótese de que tenha ocorrido um deslocamento de íons Mn^{+2} da CTC (capacidade de troca de cátions) do solo pela aplicação do adubo potássico, o que levaria a uma maior disponibilidade de Mn^{+2} para as plantas. A hipótese se fundamenta pelo fato de que em solos ácidos ($pH < 5,0$) o Mn pode estar ocupando, como cátion adsorvido eletrostaticamente, 20 a 30% da CTC do solo. Neste caso, a concentração de Mn^{+2} na solução do solo, que é, em última análise, de onde as plantas retiram os nutrientes, pode ter aumentado em função da sua substituição na CTC pelos íons K^+ que foram supridos através da adubação potássica [159].

Os teores de K foliar foram maiores na condição de sombreamento, entretanto, nas duas condições de luminosidade, os tratamentos envolvendo aplicação de N ao solo propiciaram sensíveis decréscimos no teor de K (**Tabela IX**). Embora não ocorra na literatura registros de antagonismo entre N e K, os dados obtidos indicam a possibilidade de o N inibir a absorção de K na cultura da erva-mate.

Tabela VIII: Teor de cinzas [g/100g _{base seca}] das amostras de erva-mate sob diferentes condições agronômicas (intensidade de luz, idade de poda da folha e adubação).

Adubação	Teor de cinzas (g/100g) ± desvio padrão							
	6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
	sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra
Sem adub.	5,39±0,04	6,43±0,03	5,30±0,10	7,47±0,15	5,88±0,14	5,94±0,21	6,23±0,04	6,71±0,06
N	5,25±0,05	6,40±0,04	5,30±0,14	7,63±0,05	5,11±0,06	5,60±0,14	5,85±0,01	6,84±0,01
K	4,97±0,05	5,69±0,06	5,40±0,10	7,10±0,20	6,07±0,10	6,23±0,01	5,47±0,01	6,26±0,06
N + K	5,34±0,05	5,77±0,11	5,32±0,05	7,00±0,10	6,40±0,36	6,44±0,13	6,35±0,06	7,21±0,10

Tabela IX: Conteúdo de macronutrientes das folhas de erva-mate em função da idade da folha, incidência de luz e adubação.

Mineral	Fertilização	Conteúdo de metais (mg/100g base seca) \pm desvio padrão							
		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
		Sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra
K	sem adubação	1476,3 \pm 7,9	1746,9 \pm 55,5	1072,9 \pm 15,5	1136,2 \pm 11,8	612,6 \pm 7,7	649,6 \pm 5,3	545,0 \pm 4,0	590,40 \pm 7,7
	N	1034,9 \pm 7,4	1430,3 \pm 31,5	810,8 \pm 4,6	857,1 \pm 13,9	513,9 \pm 13,7	597,3 \pm 0,7	513,9 \pm 13,7	543,2 \pm 2,5
	K	1637,2 \pm 18,6	2084,6 \pm 12,5	1220,3 \pm 17,9	1535,1 \pm 12,0	653,2 \pm 8,5	696,0 \pm 14,1	653,2 \pm 8,5	673,4 \pm 8,8
	N + K	1159,1 \pm 29,5	1933,5 \pm 3,2	1082,0 \pm 10,1	1260,5 \pm 18,4	612,6 \pm 2,5	667,2 \pm 8,9	612,6 \pm 2,5	554,3 \pm 6,0
Ca	sem adubação	464,6 \pm 16,1	755,1 \pm 6,1	345,3 \pm 6,4	480,9 \pm 16,8	415,0 \pm 2,2	648,1 \pm 10,4	414,5 \pm 1,6	514,1 \pm 13,4
	N	814,9 \pm 2,9	852,0 \pm 16,2	630,7 \pm 8,8	811,9 \pm 17,6	639,0 \pm 1,4	815,0 \pm 2,7	550,7 \pm 7,9	720,1 \pm 8,2
	K	631,2 \pm 12,4	826,0 \pm 9,7	598,1 \pm 0,4	691,4 \pm 7,4	521,1 \pm 6,9	721,0 \pm 4,4	521,1 \pm 6,9	703,1 \pm 3,1
	N + K	598,1 \pm 0,4	793,4 \pm 12,2	517,0 \pm 9,5	628,7 \pm 28,1	429,4 \pm 5,4	661,9 \pm 3,0	424,3 \pm 5,3	569,6 \pm 6,6
Mg	sem adubação	761,8 \pm 1,8	743,0 \pm 7,1	788,8 \pm 4,7	777,5 \pm 2,1	748,5 \pm 4,0	757,6 \pm 4,8	726,8 \pm 3,7	753,8 \pm 6,0
	N	768,5 \pm 3,0	780,5 \pm 7,2	797,7 \pm 5,0	797,0 \pm 0,5	768,0 \pm 8,2	773,7 \pm 13,4	797,5 \pm 3,8	786,9 \pm 3,3
	K	744,7 \pm 1,6	729,7 \pm 1,1	765,3 \pm 7,5	765,2 \pm 2,8	727,7 \pm 10,7	749,2 \pm 10,4	709,5 \pm 1,3	726,8 \pm 3,8
	N + K	762,0 \pm 1,0	755,0 \pm 2,0	794,0 \pm 1,4	784,0 \pm 5,7	754,5 \pm 4,7	773,4 \pm 6,5	775,6 \pm 2,5	775,9 \pm 2,8
Mn	sem adubação	182,7 \pm 3,3	186,5 \pm 7,7	128,5 \pm 2,3	172,6 \pm 2,7	116,8 \pm 3,8	149,8 \pm 2,1	122,1 \pm 0,8	148,1 \pm 0,8
	N	219,3 \pm 6,1	216,2 \pm 4,1	170,0 \pm 1,1	182,4 \pm 5,7	149,1 \pm 0,9	158,7 \pm 1,2	152,4 \pm 0,8	152,7 \pm 2,1
	K	271,2 \pm 7,4	318,4 \pm 9,5	180,2 \pm 2,9	210,0 \pm 2,8	267,1 \pm 2,6	201,8 \pm 1,6	240,6 \pm 1,6	182,6 \pm 1,6
	N + K	275,8 \pm 8,8	354,2 \pm 10,5	258,8 \pm 2,5	221,7 \pm 4,7	282,6 \pm 2,2	217,5 \pm 2,1	262,1 \pm 2,4	239,7 \pm 3,2

Tabela X: Conteúdo de micronutrientes das folhas de erva-mate em função da idade da folha, incidência de luz e adubação.

Mineral Fertilização		Conteúdo de metais (mg/100g base seca) \pm desvio padrão							
		6 meses		12 meses		18 meses		24 meses	
		sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra	sol	sombra
Zn	sem adubação	4,7 \pm 0,1	6,5 \pm 0,2	3,6 \pm 0,1	6,8 \pm 0,2	4,2 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1
	N	6,5 \pm 0,1	8,1 \pm 0,1	5,1 \pm 0,1	9,8 \pm 0,1	5,9 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1	9,1 \pm 0,1
	K	5,3 \pm 0,1	6,9 \pm 0,2	4,1 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	5,4 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	3,9 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1
	N + K	5,4 \pm 0,1	7,7 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2
Fe	sem adubação	5,4 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	11,6 \pm 0,2	7,9 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1	7,6 \pm 0,1	7,8 \pm 0,1
	N	5,8 \pm 0,1	9,0 \pm 0,1	6,6 \pm 0,1	11,6 \pm 0,1	8,1 \pm 0,1	8,5 \pm 0,1	7,7 \pm 0,1	8,1 \pm 0,1
	K	6,0 \pm 0,1	9,3 \pm 0,1	6,7 \pm 0,1	11,8 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	8,0 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1
	N + K	6,2 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	7,0 \pm 0,1	12,0 \pm 0,1	8,3 \pm 0,1	8,9 \pm 0,1	8,2 \pm 0,1	8,4 \pm 0,1
Cu	sem adubação	1,00 \pm 0,1	1,50 \pm 0,1	0,88 \pm 0,1	1,47 \pm 0,1	0,73 \pm 0,2	1,10 \pm 0,1	0,80 \pm 0,1	0,91 \pm 0,1
	N	0,93 \pm 0,1	1,33 \pm 0,1	0,77 \pm 0,1	1,27 \pm 0,1	0,68 \pm 0,1	0,89 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	0,89 \pm 0,1
	K	0,88 \pm 0,1	1,17 \pm 0,1	0,74 \pm 0,1	1,17 \pm 0,1	0,64 \pm 0,1	0,82 \pm 0,1	0,75 \pm 0,1	0,76 \pm 0,1
	N + K	0,84 \pm 0,1	1,00 \pm 0,1	0,70 \pm 0,1	0,98 \pm 0,1	0,62 \pm 0,1	0,78 \pm 0,1	0,73 \pm 0,1	0,74 \pm 0,1
Na	sem adubação	31,9 \pm 1,2	48,7 \pm 1,1	21,1 \pm 0,6	50,1 \pm 1,9	37,2 \pm 0,6	56,5 \pm 0,8	30,6 \pm 2,1	22,0 \pm 0,1
	N	27,9 \pm 1,3	46,3 \pm 0,5	22,5 \pm 0,6	41,1 \pm 1,3	26,1 \pm 0,7	34,4 \pm 0,6	29,9 \pm 2,5	26,2 \pm 0,2
	K	30,9 \pm 1,8	38,8 \pm 2,3	29,4 \pm 0,3	34,6 \pm 0,7	27,0 \pm 0,7	32,8 \pm 2,3	29,5 \pm 1,1	32,8 \pm 0,1
	N + K	20,8 \pm 1,3	40,2 \pm 1,5	24,3 \pm 0,8	29,6 \pm 0,4	34,3 \pm 0,3	27,6 \pm ,8	31,7 \pm 1,3	30,4 \pm 3,5

Tabela XI: Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%) dos conteúdos dos minerais das folhas de erva-mate, sob diferentes condições agrônômicas.

Mineral	Idade das folhas				Intensidade de luz		Adubação			
	mg/100g				mg/100g		mg/100g			
	06 meses	12 meses	18 meses	24 meses	Sol	sombra	Sem adubação	N	K	N + K
K	1562,9 ^a	1121,9 ^b	625,3 ^c	585,8 ^d	926,7 ^b	1030,8 ^a	978,7 ^b	787,7 ^c	1144,1 ^a	985,2 ^b
Ca	716,9 ^a	588,0 ^b	606,3 ^c	522,2 ^d	532,2 ^b	699,5 ^a	504,7 ^d	729,3 ^a	651,6 ^b	577,8 ^c
Mg	755,6 ^b	783,7 ^a	756,6 ^b	756,7 ^b	761,9 ^a	764,3 ^a	757,2 ^c	783,7 ^a	739,7 ^d	771,8 ^b
Mn	253,0 ^a	190,5 ^b	192,9 ^b	187,5 ^b	205,0 ^a	207,0 ^a	150,9 ^d	175,1 ^c	234,0 ^b	264,0 ^a
Na	35,67 ^a	31,56 ^b	34,58 ^a	29,12 ^b	28,4 ^b	37,0 ^a	37,30 ^a	31,79 ^b	31,97 ^b	29,88 ^c
Fe	7,45 ^d	9,22 ^a	8,37 ^b	8,01 ^c	7,14 ^b	9,39 ^a	7,95 ^c	8,18 ^{bc}	8,40 ^{ab}	8,52 ^a
Zn	6,37 ^a	6,45 ^a	5,59 ^c	5,97 ^b	4,73 ^b	7,45 ^a	4,95 ^c	7,01 ^a	6,19 ^b	6,25 ^b
Cu	1,08 ^a	1,00 ^b	0,78 ^c	0,80 ^c	0,80 ^b	1,05 ^a	1,05 ^a	0,94 ^b	0,87 ^c	0,80 ^d

Letras iguais entre dois níveis da média de um fator, não tem diferença significativa a 5 % (Teste de Tukey).

3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS

A avaliação da influência das variáveis agronômicas na quantidade dos minerais nas folhas de erva-mate permitiu concluir que:

- As folhas de erva-mate apresentaram altas quantidades dos metais K, Ca, Mn e Mg estando de acordo com os níveis encontrados para as plantas.
- Analisando a influência da idade de poda das folhas de erva-mate pode-se observar que o teor de minerais é mais alto em folhas jovens.
- Plantas cultivadas em áreas sombreadas apresentam maior quantidade de nutrientes do que aquelas plantadas ao sol.
- As variáveis agronômicas que mais influenciaram foram a idade de poda das folhas e a intensidade de luz.
- A Espectrometria de Absorção Atômica (FAAS) permitiu determinar com segurança a composição mineral das amostras estudadas.

CAPÍTULO 4:
APLICAÇÃO DO CO₂ A ALTAS
PRESSÕES NA EXTRAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS
DE ERVA-MATE

1.0 EXPERIMENTAL

Neste capítulo foram estudadas as variáveis da técnica de extração (temperatura e pressão) com fluido supercrítico (SFE) nas amostras de folhas de erva-mate sob diferentes condições agronômicas (intensidade de luz, idade de folha e adubação) sobre o rendimento de extrato. Também foram identificados e quantificados os principais compostos das folhas de erva-mate de 18 meses, avaliando a intensidade de luz e a adubação sobre estes compostos. Foi utilizado o mesmo experimento de campo descrito no capítulo 3. O tratamento inicial das amostras seguiu o mesmo procedimento indicado no capítulo 3, quanto à coleta das amostras, secagem, moagem, classificação granulométrica e estocagem.

1.1 Reagentes e solventes

Para o procedimento de extração supercrítica foi utilizado CO₂ (White Martins) de grau UP, com 99,9% de pureza (cilindro com tubo pescador). Os padrões cafeína, teobromina, ácido mirístico, ácido hexadecanóico, ácido esteárico, esqualeno, eicosano, docosano, hexacosano, nonacosano, tricosano, heneicosano, heptacosano, triacontano, linolenato de metila, linoleato de metila, oleato de metila, β -sitosterol, agnosterol, hexadecanoato de metila, hexadecanoato de etila, pentadecanoato de etila, gama-delactona, estearato de metila, tetracosano, vitamina E, estigmasterol, fitol e bifenila foram adquiridos da Aldrich, Palo Alto, Califórnia, EUA. Foram preparadas soluções estoques de cada padrão (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em diclorometano e guardadas sob refrigeração. Os solventes (grau p.a.) utilizados foram adquiridos da Merck, bidestilados.

1.2 Extração com CO₂ supercrítico

As extrações foram realizadas em uma unidade em escala de laboratório, que consiste basicamente de um cilindro de CO₂, dois banhos termostáticos (QUIMIS), uma bomba de alta pressão (ISCO 260D), um reator em aço inoxidável (100 mL), um transdutor de pressão (SMAR LD301) equipado com um controlador (SMAR, HT 201) com uma precisão de $\pm 0,012$ MPa e um tubo coletor de vidro, conforme esquematizado na **Figura 8** e visualizado através de foto na **Figura 9**.

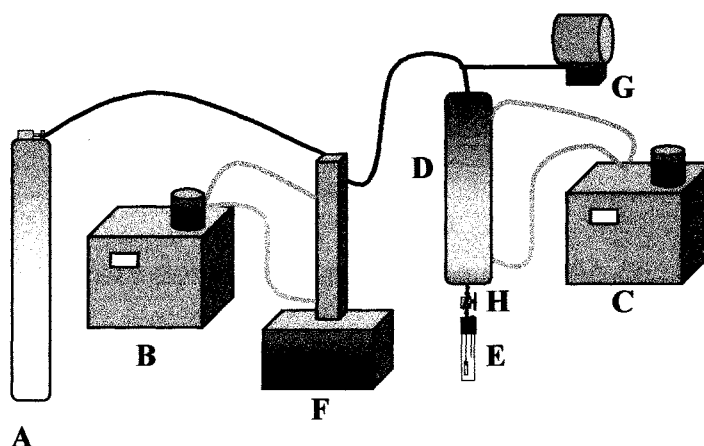


Figura 8: Esquema representativo de um sistema de extração a altas pressões: (A) – cilindro de CO₂; (B) e (C) – banhos termostáticos; (D) - extrator; (E) – tubo coletor de vidro; (F) – bomba de alta pressão; (G) – medidor de pressão; (H) – válvula micrométrica com sistema de aquecimento.

1.3 Variáveis de extração

As condições de extração foram estabelecidas nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C e nas pressões de 100, 175 e 250 atm. Foram avaliados os efeitos destas variáveis sobre o rendimento de extrato da folha (seca) de erva-mate e sua composição química. O intervalo de variáveis estudado (temperatura e

pressão) foi estabelecido de forma a cobrir a região de interesse no que se refere às propriedades de transporte e poder solvente do dióxido de carbono.



Figura 9: Fotografia com vista parcial da unidade de extração com dióxido de carbono pressurizado.

As amostras de erva-mate (25 g) foram colocadas no extrator e o CO_2 foi bombeado até a pressão de extração. Este solvente foi deixado em contato com a amostra por 1 h para estabilização do sistema. Após, a válvula micrométrica foi aberta, sendo coletado o óleo solubilizado. O fluxo de CO_2 foi acompanhado através do registrador da bomba de alta pressão. O óleo extraído foi coletado e pesado em intervalos de tempo definidos (15 a 20 min). Um outro tubo foi conectado ao equipamento e a extração continuou até que não se obteve quantidade significativa de extrato em intervalo de tempo determinado. O tempo de extração em cada experimento foi estabelecido em aproximadamente 400 minutos, isotermicamente, à pressão constante. Cada experimento consumiu em média 10 h, incluindo-se pesagem da amostra, carga do extrator, estabilização da temperatura do extrator e dos banhos, extração, despressurização e descarga do extrator.

Um planejamento experimental fatorial 2² foi estabelecido para avaliar a influência das variáveis do processo no rendimento e na composição química do extrato. As extrações foram realizadas nas temperaturas de 20 a 40°C e pressões de 100 a 250 atm. As corridas foram realizadas em duplicata, em todas as condições.

1.4 Cromatografia líquida preparativa em sílica gel

Os extratos brutos de SFE foram submetidos à cromatografia líquida preparativa em sílica gel, conforme a seguinte metodologia: em uma coluna de vidro (30 cm x 11 mm) foram adicionados 3,0 g de sílica previamente ativada a 180°C por 20 horas em cápsula de porcelana revestida com papel de alumínio perfurado e, posteriormente, guardada em dessecador. A coluna foi condicionada com 20 mL de hexano e este eluente foi descartado. Em um béquer, foram adicionados cerca de 100 mg da mistura dos extratos obtidos por SFE, e misturados com 0,5 g de sílica e 3 mL de hexano, homogeneizando bem. Após a evaporação do solvente, esta mistura foi colocada no topo da coluna. A seguir fez-se eluir cerca de 150 mL dos seguintes solventes, seguindo a ordem de polaridade: hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Foram obtidas seis frações (**Figura 10**) que foram concentradas em atmosfera de nitrogênio e mantidas em dessecador até peso constante.

1.5 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS)

Os extratos obtidos na extração das amostras de erva-mate com CO₂ a altas pressões foram analisados por GC/MS, conforme condições analíticas descritas na **Tabela XII**.

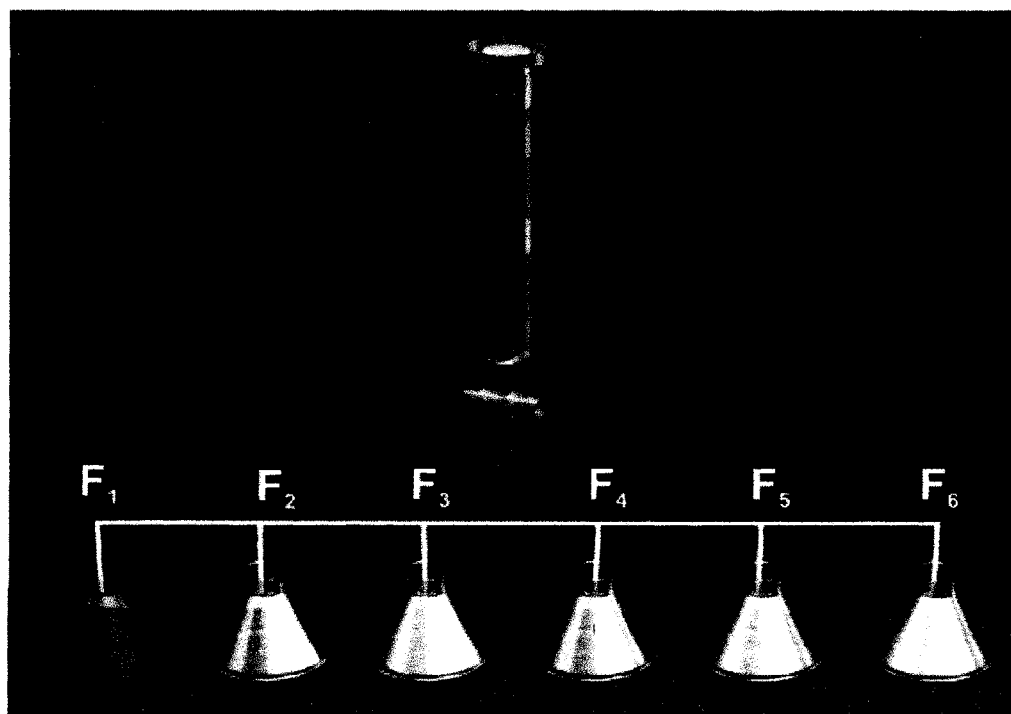


Figura 10: Esquema do fracionamento aplicado à mistura dos extratos obtidos por SFE.

Tabela XII: Condições cromatográficas utilizadas na análise dos extratos obtidos com CO₂ a altas pressões por GC/MS.

Parâmetro	Condição
Equipamento	GC/MS – Shimadzu QP-5050 ^A
Coluna	OV – 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Ionização	Impacto eletrônico com 70 eV
Modo de injeção	Split 1:20
Gás de arraste e fluxo	He; 1,5 mL min ⁻¹
Programação de Temperatura	100°C (1 min) - 3°C min ⁻¹ - 280°C (30 min)
Temperatura do injetor e interface	280°C

A identificação de alguns compostos foi feita com base na injeção de padrões (caféina, teobromina, ácido mirístico, ácido hexadecanóico, ácido esteárico, esqualeno, eicosano, docosano, hexacosano, nonacosano, tricosano, heneicosano, heptacosano, triacontano, linolenato de metila, linoleato de metila, oleato de metila, β-sitosterol, agnosterol, hexadecanoato de metila, hexadecanoato de etila, pentadecanoato de etila, gama-delactona, estearato de metila, tetracosano, vitamina E, estigmasterol, fitol), usando a

usando a bifenila como padrão interno, através da comparação dos espectros de massas e dos tempos de retenção dos compostos. Os demais compostos foram identificados por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley do equipamento. Foram preparadas soluções estoque de cada padrão a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diclorometano e soluções contendo todos os padrões em várias concentrações, além de soluções de cada extrato em torno de $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diclorometano, sendo injetado $1 \mu\text{L}$ de cada solução. A quantificação de alguns destes compostos nos extratos foi efetuada a partir da injeção da mistura padrão e dos extratos no sistema GC/MS operando no modo SIM (monitoramento de íons individuais). A programação de temperatura foi modificada para a quantificação dos compostos utilizando-se uma programação de temperatura mais rápida. As condições cromatográficas foram: $140 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 min)- $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ - $170 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min.)- $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ - $230 \text{ }^\circ\text{C}$ - $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ - $290 \text{ }^\circ\text{C}$ (10 min), $T_{\text{injetor}}=280 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{detector}}: 290 \text{ }^\circ\text{C}$, split: 1:20 e fluxo de $1,5 \text{ mL}/\text{min}$. Usou-se o método de padronização interna, com a bifenila como padrão interno. Os íons usados neste procedimento foram: cafeína ($m/z = 194$), ácidos palmítico e esteárico ($m/z = 73$), fitol ($m/z = 143$), esqualeno ($m/z = 69$), vitamina E ($m/z = 165$) e bifenila (PI) ($m/z = 154$) ($m/z=\text{massa}/\text{carga}$).

1.5.1 Derivatização

As amostras e os padrões foram derivatizados utilizando-se a combinação de BSTFA (N, O-bis (trimetilsil) trifluoroacetamida) e TMCS (trimetilclorossilano) na proporção de 99:1 dos reagentes e amostra e a mistura de BSTFA e TMCS foi realizada na proporção de 1:1(v/v) [161]. Uma reação esquemática do processo de derivatização está apresentada no **Anexo 1**, exemplificando a derivatização para o caso do ácido hexadecanóico (ácido palmítico) e para o fitol. Esta derivatização tornou-se necessária para melhorar a separação cromatográfica de substâncias muito polares, as quais podem ficar retidas irreversivelmente na coluna cromatográfica.

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Efeito das variáveis de extração (P x T)

A etapa inicial da extração das amostras de erva-mate consistiu em avaliar o efeito da pressão e da temperatura sobre o rendimento da mesma.

A **Tabela XIII** resume as condições de extração e os resultados alcançados quanto ao rendimento. Os rendimentos foram calculados com base na porcentagem do óleo extraído em relação à massa seca da amostra colocada no extrator, em um tempo de 400 minutos. Observa-se uma grande variação na densidade do solvente (0,612 a 0,963 g/cm³) calculada com base em dados fornecidos por Angus e colaboradores [162]. As variáveis, vazão do solvente e massa de erva-mate, foram mantidas constantes em 2 g min⁻¹ e 25 g, respectivamente.

Tabela XIII: Condições experimentais e rendimentos obtidos nas extrações de erva-mate com CO₂ a altas pressões. Erva-mate com idade de poda de 12 meses cultivada a pleno sol e sem adubação.

Experimento	Temperatura (°C)	Pressão (atm)	Densidade (g cm ⁻³)	Rendimento (g _{extrato} /100g _{erva-mate})
1	30	175	0,868	1,93
2	20	250	0,963	1,73
3	40	250	0,880	2,46
4	20	100	0,854	1,19
5	40	100	0,612	0,53

A **Figura 11** mostra o efeito da temperatura e da pressão sobre o rendimento da extração da erva-mate, empregando dióxido de carbono a alta pressão como solvente. As curvas experimentais de extração foram construídas através do rendimento total de extrato de erva-mate, em função da massa de dióxido de carbono utilizada, que foi monitorada pelo decaimento no volume do solvente na bomba de seringa.

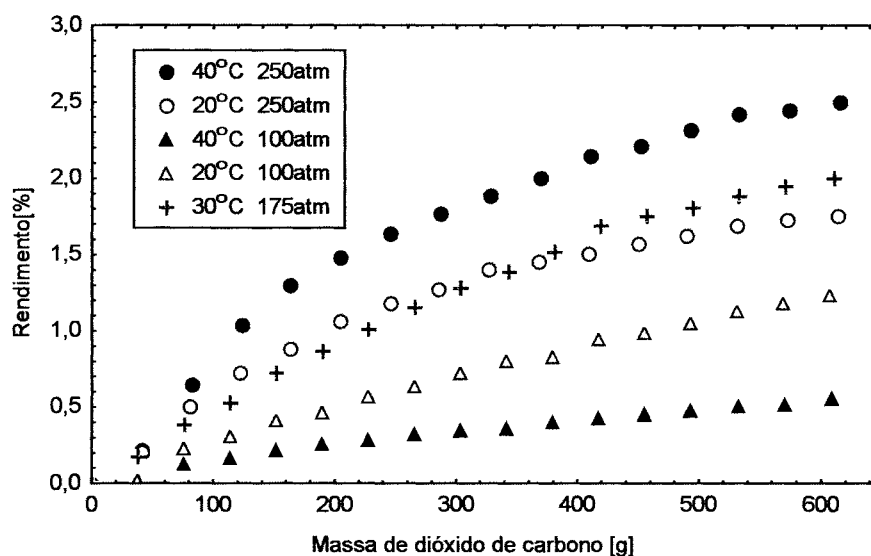


Figura 11: Curvas de extração obtidas para erva-mate usando CO₂ a altas pressões (condições descritas na **Tabela XIII**). Erva-mate com idade de poda de 12 meses cultivada a pleno sol e sem adubação.

Como podemos observar nesta **Figura**, as curvas de extração são formadas por uma etapa linear inicial (taxa constante de extração), onde a solubilidade do óleo no solvente (função somente de temperatura e da pressão) governa a extração. Nesta etapa, o óleo está completamente exposto e as partículas sólidas estão cobertas por uma camada deste. Neste período, o solvente deixa o extrator saturado de óleo e a concentração do óleo no solvente, na saída do extrator, é igual a sua solubilidade no solvente. Numa segunda etapa, a taxa de extração decresce em função da resistência à difusão no interior das folhas. Neste período, a superfície do sólido começa a apresentar falha na camada superficial de óleo e a área efetiva de troca diminui consideravelmente. Assim, a transferência de massa é controlada pela difusão

das partículas do sólido e pela difusão do solvente-soluto para fora da matriz porosa.

Pode-se observar que em pressões menores (100 atm), à medida que se aumenta a temperatura, diminui o rendimento da extração. Este fato se deve à brusca redução da densidade. Para altas pressões (250 atm), o aumento da temperatura até 40 °C resulta no aumento do rendimento da extração. Nesta região está claramente demonstrado que, apesar da densidade diminuir com o aumento da temperatura, a diminuição da viscosidade, o aumento do coeficiente de difusão do solvente e o aumento da pressão de vapor do óleo, compensam este decréscimo. Isto faz com que o rendimento seja aumentado quando se altera a temperatura de 20 para 40 °C. Em termos de rendimento, a amostra de erva-mate analisada a 250 atm e 40 °C foi a que apresentou maior valor, de 2,46 %.

2.2 Fracionamento dos extratos

Após a definição dos efeitos das variáveis temperatura e pressão no processo de extração por SFE, uma mistura de todos os extratos da **Tabela XIII** foi submetida a um fracionamento em sílica gel. Diferentes solventes foram utilizados e a ordem de eluição foi seguida de acordo com o aumento da polaridade dos solventes: hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. A **Tabela XIV** apresenta os resultados dos rendimentos dos extratos obtidos na cromatografia líquida preparativa (fracionamento).

Podemos observar nesta tabela que o extrato da fração de tolueno é o que apresenta maior rendimento em comparação com as outras frações. Este fato pode estar associado à presença de ceras isoladas nesta fração. A perda máxima de massa durante o fracionamento foi de 4%.

Tabela XIV: Rendimentos dos extratos (mistura dos extratos da Tabela XIII) obtidos por cromatografia líquida preparativa (fracionamento), expressos em gramas (extrato) de cada solvente pela quantidade global da mistura do extrato.

Fração	Eluente	Rendimento(%)
1	Hexano	3,6
2	Tolueno	59,2
3	Diclorometano	8,8
4	Acetato de etila	14,8
5	Acetona	3,2
6	Metanol	6,4

2.2.1 Análise cromatográfica (GC-MS) dos extratos obtidos no fracionamento cromatográfico em sílica gel

A mistura de todos os extratos de SFE (conforme Tabela XIII), fracionados com hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol foram analisados via GC/MS.

A identificação de alguns compostos foi feita com base na injeção de padrões e da bifenila como padrão interno, através da comparação dos espectros de massas e do tempo de retenção de cada padrão.

A Figura 12 apresenta o cromatograma do íon total da mistura dos extratos de erva-mate obtidos por extração com fluido supercrítico.

Os extratos de erva-mate apresentaram uma mistura complexa de hidrocarbonetos, compostos oxigenados (álcoois, ácidos graxos, ésteres, fitoesteróis) e nitrogenados (cafeína e teobromina), estando de acordo com a literatura [7,15,28].

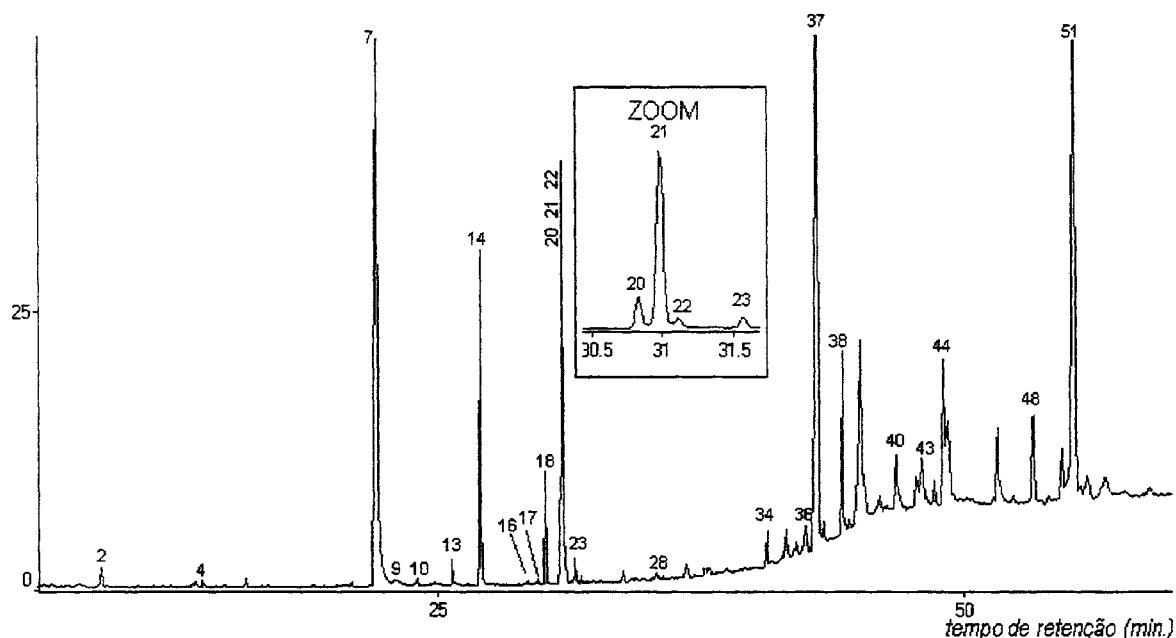


Figura 12 - Cromatograma do íon total da mistura dos extratos de erva-mate obtido via extração supercrítica com CO₂ (condições de extração da mistura dos extratos apresentada na **Tabela XIII**). Identificação dos picos apresentada na **Tabela XV**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XII**.

Alguns trabalhos citados na literatura têm se preocupado em identificar e quantificar as metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina) dos extratos de erva-mate obtidos via extração com fluido supercrítico. Em geral, todos estes estudos esclarecem que, nas condições de extração estudadas, a cafeína é o composto majoritário [7,15,24-28].

Em outro trabalho, Esmelindro e colaboradores [28] estudaram os efeitos das condições de processamento industrial sobre os compostos da erva-mate utilizando a técnica de extração por fluido supercrítico. Neste estudo, os extratos obtidos da extração com CO₂ da erva-mate, analisados via GC/MS, apresentaram em sua composição cafeína, teobromina, ácido hexadecanóico, fitol, esqualeno, octacosanol, esteróides e terpenos.

Nos extratos obtidos das folhas de erva-mate com fluido supercrítico, 51 compostos foram detectados e identificados (por comparação dos tempos

de retenção dos padrões ou tentativamente identificados com base na biblioteca Wiley NBS do equipamento), e se encontram listados na **Tabela XV** em ordem de eluição na coluna cromatográfica OV-5. Foram considerados tentativamente identificados quando as probabilidades de semelhança do espectro de massa foram superiores a 84%.

Cafeína (pico 7), ácido hexadecanóico (picos 11, 13 e 14), esqualeno (pico 37), fitol (picos 15 e 18), vitamina E (pico 44), stigmasterol (picos 49 e 50) e sitosterol ou stigmastadienol (picos 48 e 51) são alguns dos mais abundantes e importantes constituintes dos extratos de erva mate. A cafeína é responsável pelas propriedades estimulantes das folhas de erva-mate, pois tem efeito sobre o sistema nervoso central, acelera a entrada de oxigênio nos pulmões, aumenta a velocidade do metabolismo e acelera o batimento cardíaco [29]. O esqualeno apresenta propriedades de prevenção contra o câncer [163,164] e o stigmasterol e seus derivados são reconhecidos como antioxidantes [87,88]. A extração de fitoesteróis de plantas tem aumentado o interesse de pesquisadores devido aos seus efeitos na redução de osteoporose e o controle dos níveis de colesterol [165,166]. A vitamina E é uma substância reconhecida pelas suas propriedades medicinais (é o mais potente antioxidante nutricional lipossolúvel), sendo utilizada contra aproximadamente 80 doenças, como câncer, fibrose cística, insuficiência pancreática e doenças neurológicas, como Alzheimer [167]. A indústria alimentícia tem utilizado a vitamina E nos óleos comestíveis como um protetor contra a peroxidação lipídica, auxiliando a conservação de suas propriedades [168].

Os ésteres graxos (ésteres de ácidos e álcoois de cadeias longas) formam uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares. Essa classe é composta, principalmente, por derivados do ácido palmítico (C16) (ácido hexadecanóico) e ácido esteárico (C18) [169].

O fracionamento dos extratos de plantas utilizando uma coluna preparativa com sílica resultou em distintas frações com diferentes graus de complexidade, que pode ser visualizado nos cromatogramas da **Figura 13** e **Tabela XV**.

A fração de hexano (A) contém principalmente hidrocarbonetos, incluindo esqualeno e vitamina E. Cafeína e teobromina foram encontradas nas frações de acetato de etila (D) e acetona (E). Álcoois e fenóis, tais como fitol, também estão presentes nestas frações.

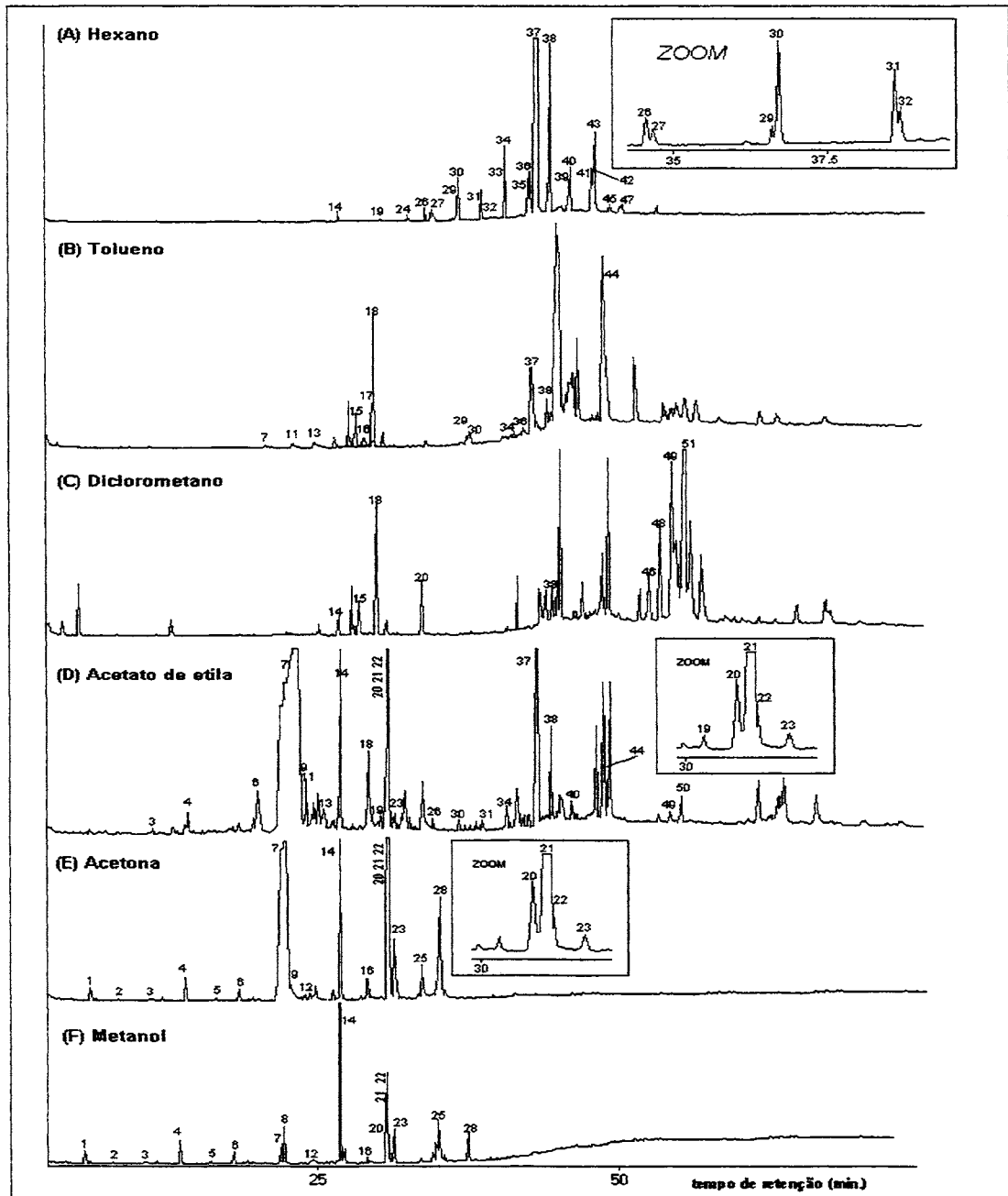


Figura 13 : Cromatograma do íon total das frações do extrato fracionado dos extratos de erva-mate obtido por CO₂ a altas pressões. Identificação dos picos apresentada na **Tabela XV**. Condições cromatográficas descritas na **Tabela XII**.

Tabela XV: Compostos identificados na mistura dos extratos da **Tabela XIII** e das frações do extrato fracionado de erva-mate com idade de poda de 12 meses, cultivada a pleno sol e sem adubação, obtido por SFE.

Nº	t _R médio	nome do composto	fórmula/MM	identificação (*)	prob.(%)
1	6,6	ácido octanóico (*)	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ /206	padrão, MS	85
2	8,8	ácido nonanóico (*)	C ₁₂ H ₂₆ O ₂ /220	padrão, MS	88
3	11,5	ácido decanóico (*)	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ /234	padrão, MS	85
4	14,3	ácido undecanóico (*)	C ₁₄ H ₃₀ O ₂ /248	padrão, MS	88
5	16,7	ácido dodecanóico (*)	C ₁₅ H ₃₂ O ₂ /262	padrão, MS	87
6	18,6	ácido tridecanóico (*)	C ₁₆ H ₃₄ O ₂ /286	padrão, MS	86
7	22,1	cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ /194	padrão, MS	96
8	21,9	ácido tetradecanóico (*)	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ /300	padrão, MS	92
9	22,8	teobromina	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂ /180	padrão, MS	90
10	23,2	pentadecanoato de metila	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ /254	MS	88
11	24,1	hexadecanoato de metila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂ /270	MS	86
12	24,5	ácido pentadecanóico (*)	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ /314	padrão, MS	85
13	25,5	hexadecanoato de etila	C ₁₈ H ₃₆ O ₂ /284	padrão, MS	90
14	26,9	ácido hexadecanóico (*)	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ /328	padrão, MS	96
15	28,6	fitol	C ₂₀ H ₄₀ O/296	padrão, MS	93
16	29,1	ácido heptadecanóico (*)	C ₂₀ H ₄₂ O ₂ /342	padrão, MS	90
17	29,2	linolenato de metila	C ₁₉ H ₃₂ O ₂ /292	padrão;MS	89
18	29,9	fitol (éter-TMS)	C ₂₃ H ₄₈ OSi/368	padrão, MS	90
19	30,3	docosano	C ₂₂ H ₄₆ /310	MS	88
20	30,7	ácido linoléico (*)	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ /352	MS	92
21	30,9	ácido linolênico (*)	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ /350	MS	90
22	31,0	ácido oléico (*)	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ /354	MS	90
23	31,4	ácido esteárico (*)	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ /356	padrão, MS	92
24	32,5	tricosano	C ₂₃ H ₄₈ /324	padrão, MS	86
25	33,7	ácido nonadecanóico (*)	C ₂₂ H ₄₆ O ₂ /370	MS	89
26	34,6	tetracosanol	C ₂₄ H ₅₀ O/354	MS	85
27	34,7	tetracosano	C ₂₄ H ₅₀ /338	padrão, MS	86
28	35,6	ácido eicosanóico (*)	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ /384	MS	85
29	36,6	pentacosanol	C ₂₅ H ₅₂ O/368	MS	87
30	36,7	pentacosano	C ₂₅ H ₅₂ /352	padrão, MS	88
31	38,6	hexacosanol	C ₂₆ H ₅₄ O/382	MS	88
32	38,7	hexacosano	C ₂₆ H ₅₄ /366	padrão, MS	88
33	40,5	heptacosanol	C ₂₇ H ₅₆ O/396	MS	86
34	40,6	heptacosano	C ₂₇ H ₅₆ /380	padrão, MS	87
35	42,4	octacosanol	C ₂₈ H ₅₈ O/410	MS	88
36	42,5	octacosano	C ₂₈ H ₅₈ /394	padrão, MS	88
37	42,7	esqualeno	C ₃₀ H ₅₀ /410	padrão;MS	92
38	44,2	nonacosano	C ₂₉ H ₆₀ /408	padrão, MS	90
39	45,8	triacontanol	C ₃₀ H ₆₂ O/438	MS	89
40	45,9	triacontano	C ₃₀ H ₆₂ /422	padrão, MS	88
41	47,5	commato de metila (C ou D)	C ₃₁ H ₅₀ O ₄ /486	MS	87
42	47,7	commato de metila (C ou D)	C ₃₁ H ₅₀ O ₄ /486	MS	87
43	47,9	untriacontano	C ₃₁ H ₆₄ /436	padrão/MS	87
44	48,8	vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂ /430	padrão/MS	90
45	50,2	dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆ /450	padrão, MS	89
46	52,3	estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O/412	padrão, MS	87
47	53,0	trtriacontano	C ₃₃ H ₆₈ /464	padrão, MS	88

Continuação da Tabela XV

N°	t _R médio	nome do composto	fórmula/MM	Identificação (*)	prob.(%)
48	53,2	estigmasterol (éter-TMS)	C ₂₉ H ₄₈ OSi/528	padrão, MS	89
49	54,1	estigmast-5-em-3-ol (3-beta)	C ₂₉ H ₅₀ O/414	MS	89
50	54,9	estigmast-8-em-3-ol (3-beta)	C ₂₉ H ₅₀ O/414	MS	88
51	55,1	beta-sitosterol (éter-TMS)	C ₃₂ H ₅₈ OSi/486	padrão, MS	88

(*) identificado sob a forma de éster trimetil siliil (TMS)

As frações obtidas pela eluição com acetato de etila (D), acetona (E) e metanol (F) apresentaram principalmente ésteres, ácidos saturados e insaturados. Alguns destes compostos têm sido citados na literatura em extratos de erva-mate obtidos por SFE [28] e por outros processos de extração. Também podemos observar na **Figura 13** que a maior porcentagem de cafeína foi eluída na fração de acetato de etila (D), completando-se a eluição nos solventes subsequentes. É interessante notar que nos extratos brutos foram encontrados ácidos carboxílicos e também ésteres metílicos e etílicos. Isto pode ser afirmado pois, os ácidos livres foram derivatizados formando o éster TMS, enquanto os outros aparecem como ésteres metílicos e etílicos. É também interessante observar que o cromatograma da fração (B) (eluído com tolueno) apresenta alguns compostos que não foram identificados com picos intensos e também que esta fração tem uma alta porcentagem de extrato (**Tabela XIV**). Podemos concluir que alguns compostos a base de cera podem ter sido isolados nesta fração.

Em geral alguns órgãos (as folhas) são recobertos externamente por uma fina camada de cera, que desempenha grande importância biológica nas relações entre a planta e o meio ambiente em que esteja inserida. Por definição, ceras epidérmicas são compostos hidrofóbicos, da superfície das plantas, que são removidos por uma breve imersão em solvente orgânico, como clorofórmio ou hexano. Elas são misturas complexas de compostos de cadeias longas (> C₁₈), tais como ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos alifáticos polinucleares e compostos fenólicos; compostos que podem apresentar massas moleculares altas [169].

2.3 Efeito das variáveis agronômicas sobre o rendimento da SFE

Para analisar o efeito das variáveis agronômicas, as extrações foram realizadas mantendo fixas a temperatura em 30 °C e a pressão em 175 atm, ou seja, as condições do ponto central do planejamento estatístico.

2.3.1 Efeito da adubação e sombreamento

Para avaliar o efeito da adubação, foram selecionadas as plantas a pleno sol com idade de poda de 12 meses. Tendo-se dividido o terreno de plantio em linhas, os diferentes tratamentos foram distribuídos como descrito a seguir: as plantas da Linha 1 não receberam nenhum tipo de adubação; as da Linha 2 receberam uma adubação, tendo como fonte de nitrogênio a uréia; as da Linha 3 receberam adubação, tendo como fonte de potássio o cloreto de potássio e as plantas da Linha 4 receberam uma adubação com fonte de nitrogênio e de potássio simultaneamente.

A Figura 14 apresenta o efeito da adubação e sombreamento sobre as curvas cinéticas da extração da erva-mate.

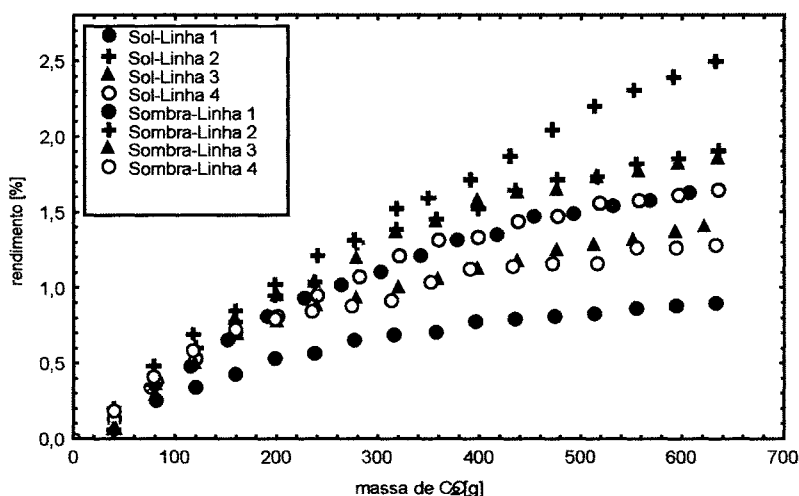


Figura 14: Cinética da extração da erva-mate de 12 meses de poda, sob diferentes intensidades de luz e adubação. Temperatura de extração de 30 °C e pressão de extração de 175 atm.

Observa-se que quando a adubação das plantas é feita somente com fontes de nitrogênio, maiores foram os rendimentos obtidos, comparados com

as plantas que não receberam nenhum tipo de adubo. O mesmo efeito, embora em menor escala, acontece quando se aduba as plantas com fonte de potássio (cloreto de potássio). Quando as plantas foram adubadas simultaneamente com fontes de nitrogênio e potássio, uma sinergia negativa foi observada, e o rendimento da extração não apresentou mudanças significativas em relação aquele obtido a partir de plantas não adubadas.

Também podemos observar que, independente da condição de adubação, quando as plantas se encontram a pleno sol o rendimento da extração (quantidade de compostos solúveis no dióxido de carbono) é aumentado em relação aquele obtido com plantas sombreadas. Porém, quando as plantas sombreadas são adubadas com fonte de nitrogênio, um apreciável aumento no rendimento da extração é observado.

2.3.2 Efeito da idade de poda

O efeito da idade de poda das folhas sobre o rendimento da extração pode ser observado através da **Figura 15**.

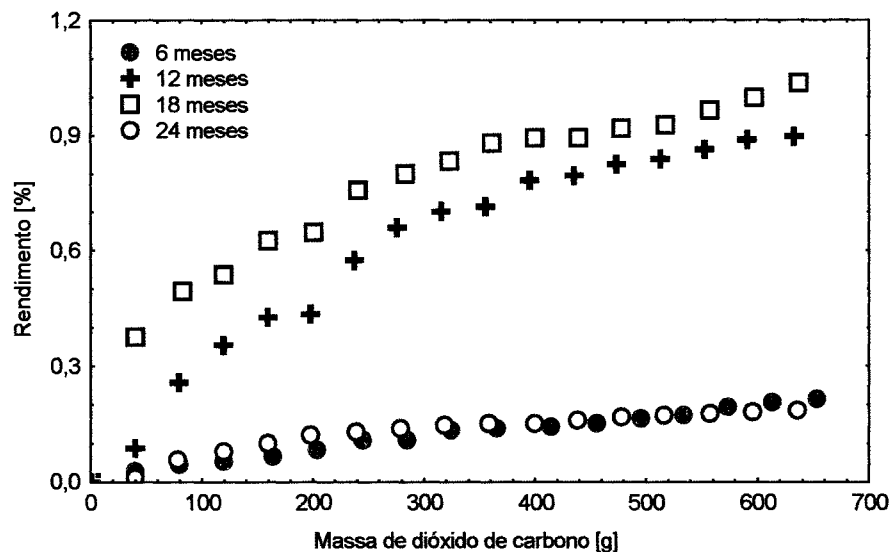


Figura 15: Cinética da extração da erva-mate sob diferentes idades de poda, plantadas a pleno sol e adubadas com nitrogênio. Temperatura de extração de 30 °C e pressão de extração de 175 atm.

Podemos observar que até os 18 meses, o acréscimo na idade de poda das folhas proporciona um aumento significativo no rendimento da extração. A partir de 18 meses, a quantidade de compostos voláteis passíveis de extração diminui consideravelmente, chegando aos 24 meses com rendimentos similares aos obtidos com plantas de 6 meses de idade de poda. Este comportamento pode ser explicado em termos do tempo de vida das folhas, onde, segundo Mosele [3], as folhas de erva-mate caem antes de completarem 24 meses e, neste sentido, as folhas coletadas após 24 meses de poda podem ser, na verdade, folhas bastante jovens.

2.4 Análise quantitativa dos compostos da erva-mate

A análise quantitativa dos extratos por CO₂ a altas pressões sob diferentes condições agronômicas (intensidades de luz, fertilização e idade de poda de 18 meses), foi realizada utilizando-se como padrões a cafeína, ácido palmítico, fitol, ácido esteárico, esqualeno, vitamina E, e a bifenila como padrão interno. Para a quantificação dos compostos da erva-mate foram escolhidas as folhas com idade de poda de 18 meses, pois nesta idade a folha apresentou maior rendimento de extrato. A **Tabela XVI** apresenta as concentrações dos compostos quantificados da erva-mate (cafeína, ácido palmítico, fitol, ácido esteárico, esqualeno e vitamina E) calculadas usando como padrão interno a bifenila. Todas as análises foram realizadas em duplicata (extrações e injeção da amostra e padrões). Alguns destes compostos foram selecionados em função de suas características e aplicações. A cafeína é um alcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas [8, 9,14]. As xantinas são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta de curta duração [5,29]. Particularmente, a cafeína é a substância estimulante de maior consumo em todo o mundo. O fitol é um álcool diterpênico, que é material básico para a produção sintética de vitamina K1 e E [170]. O esqualeno é um bactericida natural, empregado amplamente na indústria cosmética, na fabricação de cremes e emulsões [163-164]. A vitamina E é uma vitamina essencial para a atividade do organismo e, atualmente vem sendo amplamente estudada em função de sua poderosa atividade antioxidante [167].

Tabela XVI: Compostos das folhas de erva mate com idade de 18 meses de poda, quantificados em função do tipo da fertilização e incidência de luz.

composto	mg/kg \pm desvio padrão(*)							
	sombra				sol			
	sem adubo	N	K	N+K	sem adubo	N	K	N+K
cafeína	4290 \pm 84,8	8688,9 \pm 69,1	5487,0 \pm 80,6	4689,3 \pm 83,9	1705,0 \pm 21,2	5418,1 \pm 27,6	2889,8 \pm 15,5	2058,2 \pm 10,3
ác. palmítico	242,2 \pm 16,7	229 \pm 9,3	358,4 \pm 12,9	256,8 \pm 11,5	129,2 \pm 4,7	210,6 \pm 9,6	288,8 \pm 6,4	255,8 \pm 10,5
fitol	336,3 \pm 10,8	182,7 \pm 8,2	229,9 \pm 3,4	102,8 \pm 5,9	332,8 \pm 10,2	111,8 \pm 5,6	132,7 \pm 5,2	93,4 \pm 2,2
ác. esteárico	29,75 \pm 1,0	27,3 \pm 0,9	28,6 \pm 0,6	28,0 \pm 0,7	28,4 \pm 0,8	31,8 \pm 0,4	31,4 \pm 0,3	26,6 \pm 0,7
esqualeno	10501,1 \pm 158,7	9596,9 \pm 118	8389,6 \pm 40,7	9193,8 \pm 52,6	12801,1 \pm 71,8	9742,7 \pm 104,2	8595,7 \pm 87,7	9073,8 \pm 24
vitamina E	1260,1 \pm 39,1	1525,6 \pm 50,1	1227,8 \pm 46,5	1091,6 \pm 29,6	1930,0 \pm 40,1	2755,4 \pm 56,1	1548,5 \pm 26,7	999,2 \pm 16,4

(*) média de três determinações

A **Tabela XVII** apresenta os resultados da análise estatística da influência de intensidade de luz e do tipo de adubação na quantidade dos compostos orgânicos selecionados. Os valores apresentados nesta tabela são os valores médios obtidos em cada nível das variáveis. Letras iguais entre dois níveis da média de um fator, não tem diferença significativa a 5 % (teste de "Tukey"), o que pode ser observado com o conteúdo de ácido esteárico.

Tabela XVII: Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%). Efeito da intensidade de luz e do tipo de adubação sobre a concentração (mg/kg de amostra) de compostos selecionados do extrato de folhas de erva-mate com 18 meses de idade, obtidos por SFE.

composto	mg/kg					
	intensidade de luz		adubação			
	sombra	sol	sem adubo	N	K	N+K
cafeína	5788,8 ^a	3017,8 ^b	4188,4 ^b	7053,5 ^a	2997,5 ^d	3373,8 ^c
ác.palmítico	271,6 ^a	221,1 ^b	185,7 ^d	219,8 ^c	323,6 ^a	256,3 ^b
fitol	212,9 ^a	167,7 ^b	334,6 ^a	147,2 ^c	181,3 ^b	98,2 ^d
ác. esteárico	28,4 ^a	29,6 ^a	29,1 ^a	29,6 ^a	30,0 ^a	27,3 ^a
esqualeno	9420,3 ^b	10053,4 ^a	11651,2 ^a	9669,8 ^b	8492,7 ^d	9133,6 ^c
vitamina E	1808,3 ^a	1276,3 ^b	1595,1 ^b	2140,5 ^a	1388,2 ^c	1045,4 ^d

Analisando a **Tabela XVII**, pode-se observar que a intensidade de luz tem um efeito negativo sobre as concentrações de cafeína, fitol, ácido palmítico e vitamina E. Desta forma, maiores teores de cafeína, fitol, ácido palmítico e vitamina E podem ser obtidos das plantas que se encontram em áreas protegidas

do sol. Em relação ao esqualeno e ao ácido esteárico, a concentração é aumentada sob intensidade de luz, ou seja, em plantas cultivadas a pleno sol.

Mazzafera [171], estudando a erva-mate, observou as mesmas tendências quando analisou cafeína, ou seja, encontrou maiores concentrações em folhas parcialmente sombreadas.

O efeito da adubação sobre a composição química mostrou-se bastante correlacionado com a intensidade de luz. Quando as plantas de erva-mate são adubadas com fontes de nitrogênio ocorre um aumento significativo do teor de cafeína e vitamina E. O fitol e o esqualeno apresentaram maiores concentrações em plantas não adubadas, enquanto que o teor de ácido palmítico aumentou em plantas adubadas com K.

O efeito da fertilização nitrogenada sobre a produção de alcalóides tem sido objeto de pesquisas. Embora com algumas exceções, muitas pesquisas têm apresentado aumento no conteúdo de alcalóides nas folhas de erva-mate com fertilização nitrogenada. Em alguns casos, a resposta pode variar de acordo com a fonte nitrogenada utilizada na fertilização (nitrato, amônia ou uréia) [23]. Segundo Mazzafera [172], como os alcalóides são compostos nitrogenados, baixo teor de cafeína é esperado em tratamentos com menor disponibilidade de N. O nível de cafeína varia como parte integrada do metabolismo de compostos nitrogenados da planta, e em função do fornecimento deste elemento.

Também podemos observar na **Tabela XVII** que a concentração de cafeína diminuiu com a utilização de adubação com fonte de potássio e com fonte de nitrogênio e potássio simultaneamente. Além do nitrogênio, pesquisas demonstram que a redução de K geralmente resulta em aumento da porcentagem de alcalóides em plantas [23]. Mazzafera [171], ao estudar o comportamento do suprimento de nutrientes sobre o conteúdo de cafeína em folhas de café (*Coffea arábica* L.), observou que a ausência de K induziu o aumento do conteúdo de cafeína nas folhas.

De acordo com a literatura, a concentração de cafeína nas folhas de erva-mate pode variar de 0,16 % em folhas velhas, a 1,4 % em folhas jovens, sobre a

massa das folhas secas [8, 14, 22,23,173]. Saldaña et al. [26] identificaram e quantificaram a cafeína em extratos de folhas de erva-mate obtidos por extração por fluido supercrítico e encontraram valores de 4308 mg/kg deste composto, na temperatura de 70 °C e pressão de 255 atm.

Em um outro trabalho, Saldaña et al. [27], observaram que a modificação do solvente com diferentes quantidades de etanol resultou em um aumento da concentração de cafeína nos extratos das folhas de erva-mate obtida por SFE a 200 atm e 70°C (de 3320 mg/kg para 6110 mg/kg de cafeína nas folhas erva-mate). Os valores de cafeína da **Tabela XVII** estão dentro da faixa de concentração encontrada por estes pesquisadores.

3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS

A verificação da influência das variáveis de extração da técnica de extração por fluido supercrítico e das variáveis agronômicas das folhas de erva-mate, permitiu concluir que:

- As variáveis temperatura e pressão exercem efeito pronunciado sobre a quantidade de extrato produzido. Pressões maiores (250atm) levam a melhores rendimentos, uma vez que a elevação da pressão (aumento da densidade) incrementa o poder de solubilização do solvente.
- Foi observado um maior rendimento de extrato das folhas de erva-mate na pressão de 250 atm e 40 °C;
- O fracionamento dos extratos obtido por SFE permitiu a identificação de 51 compostos presentes nas folhas de erva-mate.
- O manejo da planta também interfere no rendimento da extração.
- Em relação ao sombreamento das plantas, observou-se que plantas cultivadas a pleno sol produzem maior quantidade de extratos orgânicos do que plantas sombreadas, utilizando a técnica de SFE.

- A idade de poda das folhas também afeta notadamente o rendimento da extração. Até os 18 meses, o acréscimo na idade de poda das folhas proporciona um aumento significativo no rendimento da extração. Após os 18 meses a quantidade de compostos voláteis passíveis de extração diminui consideravelmente, chegando aos 24 meses com rendimentos semelhantes aos das plantas de 6 meses de idade de poda.
- Quando as plantas são adubadas somente com fontes de nitrogênio, obtém-se maiores rendimentos em massa de extrato quando comparados com as plantas sem adubação. O mesmo efeito acontece quando se aduba as plantas com fonte de potássio (cloreto de potássio). Quando as plantas são adubadas simultaneamente com fontes de nitrogênio e potássio, o rendimento da extração não apresenta mudanças significativas em relação aquele obtido a partir de plantas não adubadas.
- A partir dos resultados alcançados pode-se concluir que a intensidade de luz tem um efeito negativo sobre a concentração da cafeína, fitol, ácido hexadecanóico e vitamina E. A concentração do esqualeno é aumentada sob intensidade de luz.

1.0 EXPERIMENTAL

Neste capítulo foram estudadas as condições da extração por ultra-som, utilizando um planejamento estatístico 2^{5-1} nas amostras de folhas de erva-mate, adubadas com nitrogênio, plantadas ao sol e com idade de folha de 18 meses. Neste planejamento foram avaliadas as seguintes variáveis de extração: tempo de extração, polaridade do solvente, quantidade de amostra, temperatura do banho de extração e relação de massa de amostra/volume de solvente. O tratamento inicial das amostras seguiu o mesmo procedimento indicado nos capítulos anteriores, quanto à secagem, moagem, classificação granulométrica e estocagem. De forma idêntica, também os padrões e soluções estoque foram preparados conforme o item 1.2 da parte experimental do capítulo 4.

1.1 Extração por ultra-som

Utilizou-se um aparelho modelo Fisher Scientific – FS14H, com potência de 90 W, frequência de 40 kHz e intensidade de radiação de $0,27 \text{ W/cm}^2$. As dimensões do banho utilizado foram de 24 cm x 14 cm x 10 cm (**Figura 16**). Foram utilizados erlenmeyers de 250 e 500 mL, com boca esmerilada, conectados a um condensador de ar de 30 cm de altura.

Primeiramente, realizou-se um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , que inclui a avaliação dos seguintes parâmetros:

- X_1 : tempo de extração (60 e 180 minutos)
- X_2 : temperatura do banho (25 e 75 °C)
- X_3 : polaridade do solvente (hexano e metanol)
- X_4 : quantidade de amostra (2,5 e 7,5 g)
- X_5 : relação de massa de amostra/volume de solvente (1:10 e 1:30) (g/mL)

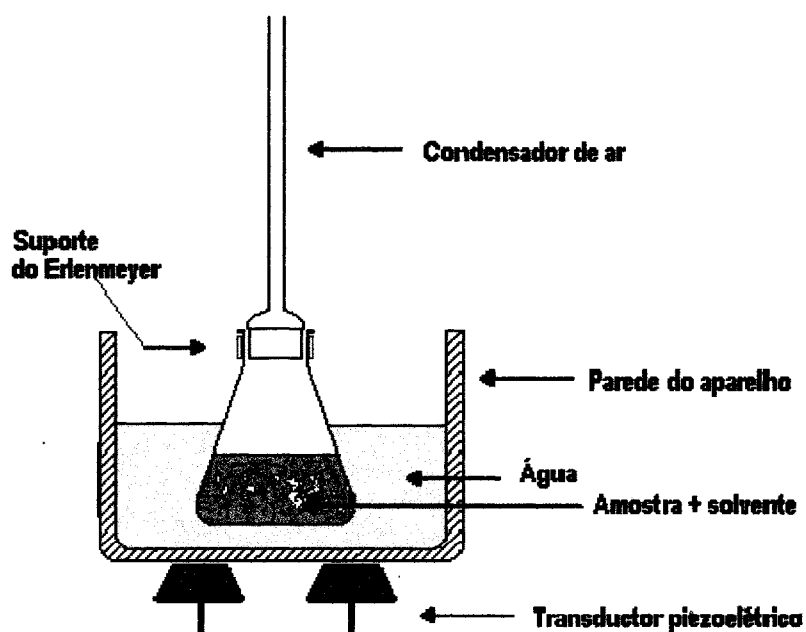


Figura 16: Equipamento utilizado para extração com ultra-som das folhas de erva-mate.

Como variável de resposta, em todos os planejamentos realizados considerou-se a porcentagem do rendimento de cada extração e o perfil cromatográfico, resultando em 16 experimentos (Tabela XVIII, apresentada na seção de resultados já com os rendimentos obtidos), gerando uma equação que descreve um modelo ajustado ao experimento global. Nesta equação identificam-se as variáveis mais importantes do processo de extração e a interação entre as mesmas.

1.2 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS)

Os extratos obtidos na extração das amostras de erva-mate por ultra-som foram analisados por GC/MS, conforme condições analíticas descritas na Tabela XII.

A identificação e quantificação de alguns compostos (caféina, teobromina, ácido mirístico, ácido hexadecanóico, ácido esteárico, esqualeno, eicosano, docosano, hexacosano, nonacosano, tricosano, heneicosano, heptacosano, triacontano, linolenato de metila, linoleato de metila, oleato de metila, β -sitosterol, agnosterol, hexadecanoato de metila, hexadecanoato de etila, pentadecanoato de etila, gama-delactona, estearato de metila, tetracosano, vitamina E, estigmasterol, fitol), bem como as derivatizações foram realizadas conforme descrito no **item 1.6.1 do capítulo 4**.

CAPÍTULO 5:
APLICAÇÃO DO ULTRA-SOM
NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
ORGÂNICOS DE ERVA-MATE

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Variáveis de extração

A etapa inicial da extração das amostras de erva-mate por ultra-som consistiu em avaliar o efeito das variáveis tempos de extração, quantidade de amostra, relação massa/solvente, polaridade do solvente e temperatura de extração sobre o rendimento das mesmas.

A **Tabela XVIII** apresenta os resultados e as condições experimentais de um planejamento estatístico 2^{5-1} , aplicado em dois níveis (+1 e -1) para cada variável. Foi considerada como variável de resposta à porcentagem em massa (g/100g) da extração. Os rendimentos foram calculados com base na porcentagem do extrato em relação à massa da amostra utilizada na extração.

Os resultados foram analisados utilizando o software "Statistics for Windows" versão 6.0 e, discriminando os efeitos significativos, foi obtida a seguinte equação empírica:

$$y (\%) = A_0^* + A_1X_1 + A_2X_2^* + A_3X_3^* + A_4X_4 + A_5X_5^* + A_6X_1X_4^* + A_7X_1X_5 + A_8X_4X_5 + A_9X_4X_3 + A_{10}X_5X_3$$

A partir desta equação, temos a média dos coeficientes assinalados com asterisco, na qual o efeito apresenta diferença significativa em nível de 5% de confiança ($p < 0,05$), utilizando o teste de "Tukey". Em outras palavras, os parâmetros assinalados, que são a troca do nível baixo ao nível alto de uma variável, causam uma significativa variação na variável de saída (rendimento de extrato). Substituindo os valores teóricos de A_i ($i = 1$ a 10) a equação é expressa como:

$$Y (\%) = 5.32 + 0.48X_1 + 1.08X_2 + 4.59X_3 + 0.38X_4 + 0.85X_5 + 0.83X_1X_4 - 0.59X_1X_5 - 0.47X_4X_5 + 0.43 X_4X_3 + 0.63 X_5X_3$$

Tabela XVIII: Variáveis e resultados de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} do processo de extração por ultra-som, das folhas de erva-mate.

exp	variáveis e valores										rend. em massa (%)	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	exper.	teor.					
1	(-) 60	(-) 25	(-) Hex	(-) 2,506	(-) 1:10	0,33	0,00					
2	(-) 60	(-) 25	(-) Hex	(-) 2,508	(+) 1:30	0,63	1,32					
3	(-) 60	(-) 25	(+) Met	(+) 7,501	(-) 1:10	5,84	6,73					
4	(-) 60	(-) 25	(+) Met	(+) 7,486	(+) 1:30	9,95	9,93					
5	(+) 180	(-) 25	(-) Hex	(+) 7,506	(-) 1:10	0,66	0,13					
6	(+) 180	(-) 25	(-) Hex	(+) 7,501	(+) 1:30	1,13	0,80					
7	(+) 180	(-) 25	(+) Met	(-) 2,502	(-) 1:10	6,78	7,98					
8	(+) 180	(-) 25	(+) Met	(-) 2,505	(+) 1:30	13,4	13,07					
9	(-) 60	(+) 75	(-) Hex	(+) 7,509	(-) 1:10	0,33	1,77					
10	(-) 60	(+) 75	(-) Hex	(+) 7,506	(+) 1:30	0,64	0,07					
11	(-) 60	(+) 75	(+) Met	(-) 2,507	(-) 1:10	6,6	6,31					
12	(-) 60	(+) 75	(+) Met	(-) 2,505	(+) 1:30	9,6	9,02					
13	(+) 180	(+) 75	(-) Hex	(-) 2,503	(-) 1:10	0,78	1,43					
14	(+) 180	(+) 75	(-) Hex	(-) 2,504	(+) 1:30	1,39	1,61					
15	(+) 180	(+) 75	(+) Met	(+) 7,505	(-) 1:10	12,1	12,70					
16	(+) 180	(+) 75	(+) Met	(+) 7,503	(+) 1:30	12,6	13,53					

(-1) nível baixo; (+1) nível alto; X_1 (tempo de extração em minutos); X_2 (temperatura de extração °C); X_3 (polaridade do solvente); X_4 (massa de amostra em g); X_5 (massa de amostra/volume de solvente em g/L).

Os maiores valores estão em negrito na equação e representam uma grande influência no processo, sendo os coeficientes que possuem valores $p < 0,05$ no teste de "Tukey". Os valores experimentais de porcentagem de extrato em massa (mg/100g) e os obtidos pela aplicação da equação acima (valor teórico) para cada experimento são apresentados na **Tabela XVIII**.

A análise da equação permitiu observar que todas as variáveis manifestaram um efeito positivo. As principais variáveis que influenciaram o processo de extração por ultra-som foram X_2 (tempo de extração), X_3 (polaridade do solvente) e X_5 (razão massa de amostra / volume de solvente). Assim, maior tempo de extração (180 minutos), maior quantidade de solvente (225 mL) e solvente mais polar (metanol), produzem maior quantidade de extrato nas folhas de erva-mate. A variável X_3 (polaridade do solvente) apresentou um efeito positivo mais alto (+ 4.59 X_3), isto é, quanto maior a polaridade do solvente maior

será a massa de extrato. A interação entre as variáveis (X_1X_4) apresentou efeito significativo ($0.83X_1X_4$), indicando que grande quantidade de amostra e maior temperatura de extração produzem mais extrato. As outras interações entre as variáveis não apresentaram efeito significativo.

Baseado nestas informações, pode-se concluir que as condições mais favoráveis, entre as estudadas para a extração por ultra-som, são: maior quantidade de solvente, solvente polar e maior tempo de extração.

A **Figura 17** apresenta a correlação entre os valores experimentais e aqueles calculados pelo modelo empírico.

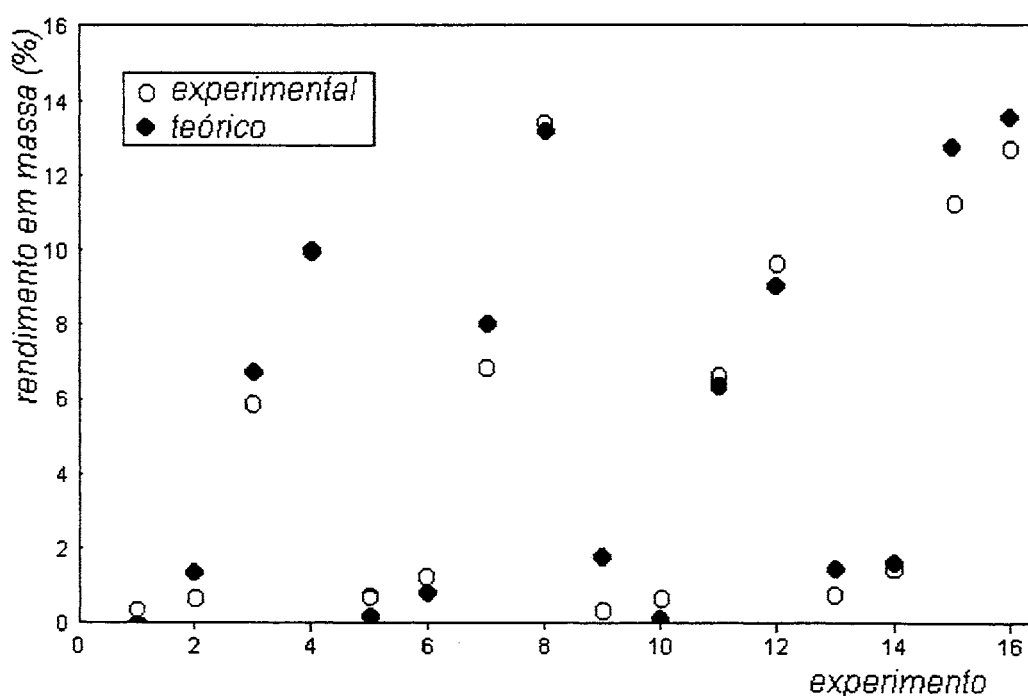


Figura 17: Correlação entre os rendimentos obtidos experimentalmente e aqueles calculados pelo modelo empírico do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .

Pode-se observar que, para alguns experimentos (1, 6, 8, 11 e 14), existe uma apropriada aproximação entre os dados experimentais e teóricos. Também é possível concluir que o modelo é capaz de capturar as principais tendências das observações experimentais, com o valor do coeficiente de correlação entre o experimental e o calculado ($R = 0,984$) bastante próximo da unidade. O

experimento 16 (7,5 g de amostra, 225 mL de metanol, 180 minutos de extração a 75°C) foi o que apresentou as melhores condições de extração pelo processo de ultra-som.

2.2 Caracterização química dos extratos

A **Figura 18** apresenta os cromatogramas do íon total dos extratos de erva-mate obtido por sonicação com hexano e metanol.

A **Tabela XIX** e a **Figura 18** apresentam os principais compostos identificados nos extratos das folhas de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivadas a pleno sol, adubadas com fonte de nitrogênio e a composição química individual de cada extrato obtida para cada solvente, utilizando o método de extração por ultra-som.

Os extratos das folhas de erva-mate obtidos por ultra-som apresentam em sua composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos e compostos nitrogenados (cafeína, teobromina), estando tal composição de acordo com a literatura [7].

Nos extratos de erva-mate, 25 compostos foram detectados e identificados (por comparação dos tempos de retenção dos padrões ou tentativamente identificados com base na biblioteca Wiley NBS de espectros de massas do equipamento) e estão listados na **Tabela XIX** em ordem de eluição na coluna cromatográfica OV-5 (metil silicone com 5% de grupos fenila). Os compostos só foram considerados positivamente identificados quando as probabilidades de semelhança entre os espectros de massa (comparando com o banco de espectros da biblioteca do equipamento) foram superiores a 84%.

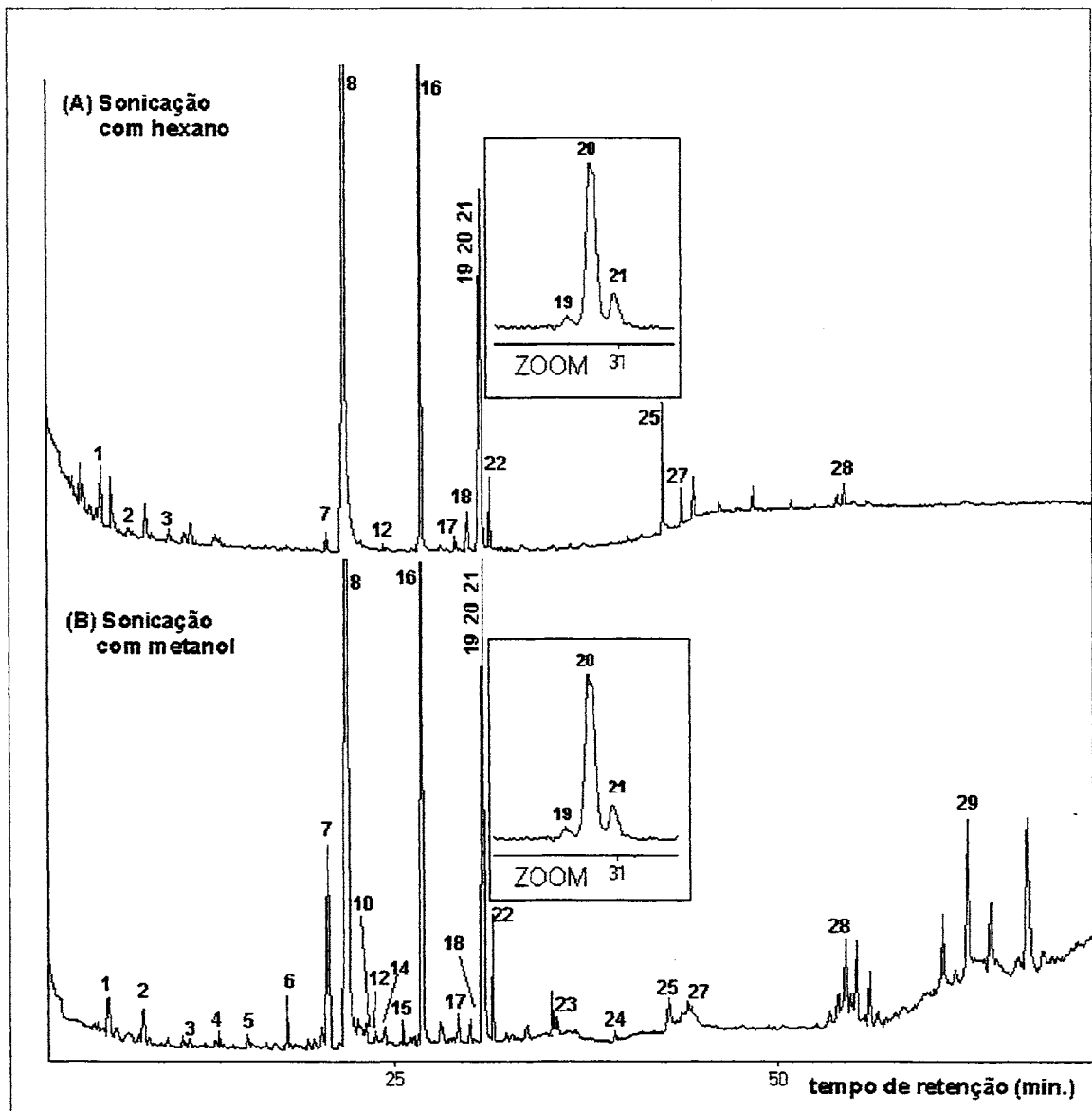


Figura 18: Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos por ultra-som com hexano (A) e metanol (B), das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio. Os picos identificados estão na **Tabela XIX**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

Tabela XIX: Principais compostos identificados nos extratos por ultra-som com hexano e metanol, das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, plantada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.

N°	t _R médio	compostos identificados	Solvente		fórmula/MM	Identificação (*)	prob. (%)
			hexano	metanol			
1	6,54	ácido octanóico(*)	X	X	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si/206	MS	85
2	8,80	ácido nonanóico(*)	X	X	C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si/220	MS	88
3	11,36	ácido decanóico (*)	X	X	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si/234	MS	85
4	15,48	ácido heptanodióico(*)		X	C ₁₃ H ₂₈ O ₄ Si ₂ /304	MS	85
5	16,74	ácido dodecanóico (*)		X	C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si/262	MS	87
6	18,10	ácido octanodióico(*)		X	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si ₂ /318	MS	92
7	20,74	ácido nonanodióico(*)	X	X	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂ /332	MS	90
8	21,81	cafeína	X	X	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ /194	Padrão/MS	96
9	22,82	teobromina		X	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂ /180	Padrão/MS	92
10	24,47	ácido pentadecanóico(*)	X	X	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ /314	Padrão/MS	85
11	25,70	ácido undecanodióico(*)		X	C ₁₇ H ₃₆ O ₄ Si ₂ /360	MS	86
12	26,40	ácido palmitoleico (*)		X	C ₃₈ H ₇₄ O ₂ Si/ 591	padrão/MS	87
13	26,94	ácido hexadecanóico(*)	X	X	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si/ 328	padrão/MS	96
14	29,22	ácido heptadecanóico(*)	X	X	C ₂₀ H ₄₂ O ₂ Si/ 342	padrão/MS	90
15	29,99	fitol (TMS-derivado)		X	C ₂₃ H ₄₈ OSi / 368	padrão/MS	90
16	30,63	ácido linoleico(*)	X	X	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si/ 352	MS	92
17	30,80	ácido linolênico(*)	X	X	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si/ 350	MS	90
18	30,91	ácido oléico (*)	X	X	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si/ 354	MS	90
19	31,38	ácido esteárico(*)	X	X	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si/ 356	padrão/MS	92
20	35,62	ácido eicosanóico(*)		X	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si/ 384	MS	85
21	39,52	ácido docosanóico(*)		X	C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si/412	MS	85
22	42,92	esqualeno	X	X	C ₃₀ H ₅₀ / 410	padrão/MS	92
23	44,18	nonacosano	X	X	C ₂₉ H ₆₀ / 408	padrão/MS	90
24	54,97	estigmast-8-en-3-ol	X	X	C ₂₉ H ₅₀ O/414	padrão/MS	85
25	62,86	agnosterol(éter-TMS derivado)		X	C ₃₃ H ₅₆ OSi / 496	padrão/MS	85

(*) identificado sob a forma de éster trimetil siliil (TMS)

Cafeína (8) e ácido hexadecanóico (13) são os compostos predominantes dos extratos de erva-mate obtidos por ultra-som. A cafeína, segundo vários autores, está associada com as propriedades estimulantes e diuréticas das folhas de erva-mate [29].

Comparando-se os cromatogramas da **Figura 18** podemos verificar que o ácido heptanodióico, ácido dodecanóico, ácido octanodióico, teobromina, ácido undecanodióico, ácido palmitoleico, ácido eicosanóico, ácido docosanóico e agnosterol foram identificados somente no extrato utilizando metanol.

Pela comparação dos extratos de erva-mate obtidos por ultra-som, podemos verificar que o metanol apresenta uma maior capacidade extratora dos compostos relativamente ao hexano.

Os compostos identificados neste extrato foram: hidrocarbonetos, metilxantinas (cafeína e teobromina), ácidos carboxílicos saturados e insaturados, ésteres, fitol e fitosteróis (stigmasterol e agnosterol).

Em geral, a polaridade do solvente apresenta uma grande influência no rendimento de extrato, sendo que a alta polaridade produz maior quantidade de extrato [88]. O planejamento fatorial 2^{5-1} também mostrou que um maior tempo de extração aumenta o rendimento do extrato.

Pela análise dos resultados pode-se observar que a técnica de ultra-som pode ser aplicada às amostras de erva-mate, como um método de extração, com as vantagens de redução do tempo de extração e solvente.

3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS:

Os resultados obtidos para a determinação da melhor condição de extração por ultra-som dos compostos orgânicos da erva-mate e da análise qualitativa dos extratos possibilitaram estabelecer as seguintes conclusões:

- As principais variáveis que influenciaram o processo de extração por ultra-som foram: tempo de extração, polaridade do solvente e razão massa de amostra / volume de solvente.
- Maior tempo de extração (180 minutos), maior quantidade de solvente (225 mL) e solvente mais polar (metanol), produzem maior quantidade de extrato nas folhas de erva-mate.
- A utilização de um planejamento experimental possibilitou a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate utilizando a técnica de extração com líquido pressurizado. A condição

ótima ocorreu com 225 mL de metanol, 7,5 g de erva-mate, 180 minutos de extração a 75 °C.

- As condições mais favoráveis, entre as estudadas para a extração por ultra-som, são: maior quantidade de solvente, solvente polar e maior tempo de extração.
- O metanol apresenta uma maior capacidade extratora dos compostos da erva-mate do que o hexano.

**CAPÍTULO 6:
APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO COM
LÍQUIDO PRESSURIZADO NA
ANÁLISE DOS COMPOSTOS
ORGÂNICOS DE ERVA-MATE**

1.0 EXPERIMENTAL

1.1 Amostras, reagentes e solventes.

Neste capítulo foram estudadas as condições da extração por extração com líquido pressurizado (PLE), utilizando um planejamento estatístico 2^{6-2} nas amostras de folhas de erva-mate, adubadas com nitrogênio, plantadas ao sol e com idade de folha de 18 meses. Neste planejamento foram avaliadas as seguintes variáveis de extração: tempo de extração, polaridade do solvente, quantidade de amostra, "flushing", número de ciclos e temperatura de extração. Como variável de resposta, em todos os planejamentos realizados, considerou-se a porcentagem do rendimento em massa de cada extração e o perfil cromatográfico. O tratamento inicial das amostras seguiu o mesmo procedimento indicado nos capítulos anteriores, quanto à secagem, moagem, classificação granulométrica e estocagem. De forma idêntica, também os padrões e soluções estoque foram preparados conforme o item 1.2 da parte experimental do capítulo 4.

1.2 Extração com líquido pressurizado (PLE) ou extração acelerada com solventes (ASE)

A partir deste capítulo o termo ASE será usado como sinônimo de PLE, uma vez que o equipamento usado é assim designado comercialmente. As folhas de erva-mate foram extraídas em um equipamento de ASE 300TM da marca Dionex, conforme visualizado na foto da **Figura 19**. Foram utilizadas células de aço inoxidável para extração, com capacidade máxima de 100 mL e frascos coletores de vidro com capacidade de 250 mL.

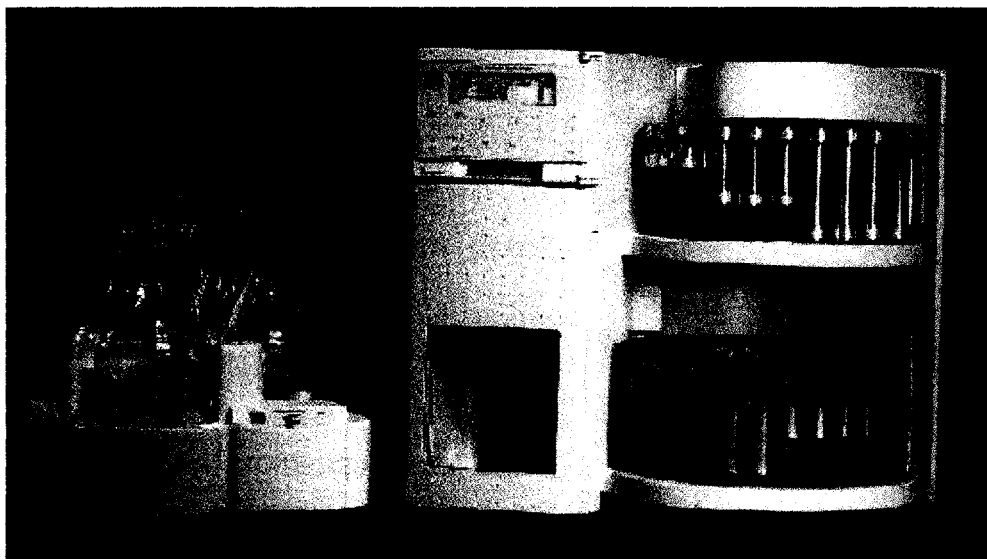


Figura 19: Foto ilustrativa do aparelho de Extração Acelerada com Solventes ASE[®] 300[™]

Para a otimização do processo de extração, foi elaborado um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} que envolve as seguintes variáveis:

- X_1 = temperatura (50 e 100°C)
- X_2 = *flushing* (50 e 100 %)
- X_3 = polaridade do solvente (hexano e metanol)
- X_4 = massa de amostra (2,5 e 7,5 g)
- X_5 = tempo de extração (10 e 30 min)
- X_6 = número de ciclos (1 e 3 ciclos)

As variáveis pressão e tempo estático foram mantidas constantes em 1500 psi e 5 minutos, respectivamente. A matriz obtida para este primeiro planejamento, utilizando 2 níveis, é mostrada na **Tabela XX**.

Como variável de resposta, em todos os planejamentos realizados, considerou-se a porcentagem do rendimento em massa de cada extração e o perfil cromatográfico, resultando 16 experimentos.

1.3 Cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS)

As análises cromatográficas dos padrões e dos extratos obtidos das amostras de erva-mate por PLE foram analisados por GC/MS, conforme condições analíticas descritas na **Tabela XII**, seguindo-se o procedimento descrito nos capítulos 4 e 5.

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Variáveis de extração

A etapa inicial na extração das amostras de erva-mate consistiu em avaliar o efeito das variáveis temperatura de extração, "flushing", quantidade de amostra, polaridade do solvente, tempo de extração e número de ciclos sobre o rendimento das mesmas.

A **Tabela XX** apresenta os resultados e as condições experimentais de um planejamento estatístico 2^{6-2} , aplicado em dois níveis (+1 e -1) para cada variável. Foi considerada como variável de resposta a porcentagem em massa (g/100g) da extração. Os rendimentos foram calculados como porcentagem do extrato em relação à massa da amostra utilizada na extração.

Os resultados foram analisados utilizando o software "Statistics for Windows" versão 6.0, e discriminando os efeitos significativos foi obtida a seguinte equação empírica:

$$y \% = A_0^* + A_1X_1^* + A_2X_2 + A_3X_3^* + A_4X_4^* + A_5X_5 + A_6X_6 + A_7X_1X_4 + A_8X_1X_2^* + A_9X_4X_6$$

Nesta equação, é apresentada a média dos coeficientes sinalizados com asterisco, na qual o efeito apresenta diferença significativa em nível de 5% de confiança ($p < 0,05$) utilizando o teste de "Tukey". Em outras palavras, para os parâmetros assinalados, a troca do nível baixo ao nível alto de uma variável causa uma significativa variação na variável de saída (rendimento de extrato). Substituindo os valores teóricos de A_i ($i = 1$ a 10):

$$y \% = 7.753 + 1.030 X_1 + 0.608 X_2 + 6.089 X_3 + 1.788 X_4 - 0.841 X_5 + 0.283 X_6 + 0.546 X_1X_4 + 2.009 X_1X_2 - 0.649 X_4X_6.$$

Os altos valores (em negrito) apresentam uma grande influência no processo, sendo os coeficientes que possuem valores $p < 0,05$ no teste de

“Tukey”. Os valores experimentais de porcentagem de extrato em massa (g/100g) e os obtidos pela aplicação da equação acima (valor teórico) para cada experimento são apresentados na **Tabela XX**.

Tabela XX: Variáveis e resultados de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , utilizados na extração com líquido pressurizado.

Exp.	variáveis e valores												rend. em massa (%)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	exp.	teórico						
1	(-)	50	(-)	50	(-)	Hex	(-)	2,483	(-)	10	(-)	1	1,1	0,70
2	(-)	50	(-)	50	(-)	Hex	(-)	2,589	(+)	30	(+)	3	1,3	0,91
3	(-)	50	(-)	50	(+)	Met	(+)	7,575	(-)	10	(-)	1	14,1	16,58
4	(-)	50	(-)	50	(+)	Met	(+)	7,517	(+)	30	(+)	3	15,9	14,21
5	(-)	50	(+)	100	(-)	Hex	(+)	7,480	(-)	10	(+)	3	1,0	0,90
6	(-)	50	(+)	100	(-)	Hex	(+)	7,661	(+)	30	(-)	1	0,70	0,0
7	(-)	50	(+)	100	(+)	Met	(-)	2,627	(-)	10	(+)	3	11,5	11,98
8	(-)	50	(+)	100	(+)	Met	(-)	2,538	(+)	30	(-)	1	8,1	8,44
9	(+)	100	(-)	50	(-)	Hex	(+)	7,681	(-)	10	(+)	3	2,5	2,89
10	(+)	100	(-)	50	(-)	Hex	(+)	7,656	(+)	30	(-)	1	1,5	1,91
11	(+)	100	(-)	50	(+)	Met	(-)	2,541	(-)	10	(+)	3	12,5	11,73
12	(+)	100	(-)	50	(+)	Met	(-)	2,505	(+)	30	(-)	1	8,2	8,17
13	(+)	100	(+)	100	(-)	Hex	(-)	2,568	(-)	10	(-)	1	2,9	2,98
14	(+)	100	(+)	100	(-)	Hex	(-)	2,579	(+)	30	(+)	3	2,4	3,13
15	(+)	100	(+)	100	(+)	Met	(+)	7,596	(-)	10	(-)	1	23,1	20,93
16	(+)	100	(+)	100	(+)	Met	(+)	7,587	(+)	30	(+)	3	17,2	18,56

Legenda: X₁ = Temperatura (50 e 100°C); X₂ = Flushing (50 e 100 %); X₃ = Polaridade do solvente (hexano e metanol); X₄ = massa de amostra (2,5 e 7,5 g); X₅ = tempo de extração (10 e 30 min) e X₆ = número de ciclos (1 e 3 ciclos)

A análise da equação permitiu observar que todas as variáveis manifestaram um efeito positivo, com exceção da variável X_5 . As principais variáveis que influenciaram a técnica por extração com líquido pressurizado foram X_1 (temperatura de extração), X_3 (polaridade do solvente) e X_4 (massa de amostra). Assim, maior temperatura de extração (100 °C), maior quantidade de amostra (7,5 g) e solvente mais polar (metanol) produzem maior quantidade de extrato das folhas de erva-mate. A variável X_3 (polaridade do solvente) apresentou um efeito positivo mais elevado (+ 6,089 X_3), isto é, quanto maior a polaridade do solvente maior será a massa de extrato.

As variáveis como volume de “flushing” (X_2), tempo de extração (X_5), e número de ciclos (X_6) não influenciaram significativamente o processo de extração acelerada com solvente. A interação entre as variáveis X_1 e X_2 manifestou efeito significativo (2,009 X_1X_2), indicando que elevada temperatura de extração e elevado volume de “flushing” produzem mais extrato. Portanto, maior quantidade de amostra, maior polaridade de solvente e elevado volume de “flushing” implicam um maior rendimento nos extratos de erva-mate utilizando esta técnica.

A influência da temperatura no processo de ASE pode ser explicada pelo aumento do coeficiente de difusão do solvente na amostra (matriz sólida) com o aumento da temperatura de extração, que favorece a cinética de dessorção dos compostos da matriz.

A **Figura 20** apresenta a interação entre os dados experimentais com aqueles propostos pelo modelo empírico. Pode-se observar que somente para os experimentos 3, 4, 15 e 16 os valores experimentais e teóricos não foram semelhantes. Para os outros experimentos existe uma apropriada aproximação entre os dados experimentais e teóricos.

Também na **Figura 20** é possível observar que o modelo é capaz de capturar as principais tendências das observações experimentais, com o valor do coeficiente de correlação entre o experimental e o calculado $R = 0,984$. O experimento 15 (7,5 g de amostra, 100% de “flushing”, metanol, 10 minutos de

extração a 100 °C e um ciclo) foi o que apresentou as melhores condições de extração pelo processo de extração com líquido pressurizado.

Para efeito de comparação, o experimento 13 (2,5 g de amostra, 100% "flushing", hexano, 10 minutos de extração a 100 °C e um ciclo) também foi considerado, pois, esta foi a melhor condição do processo de PLE com hexano.

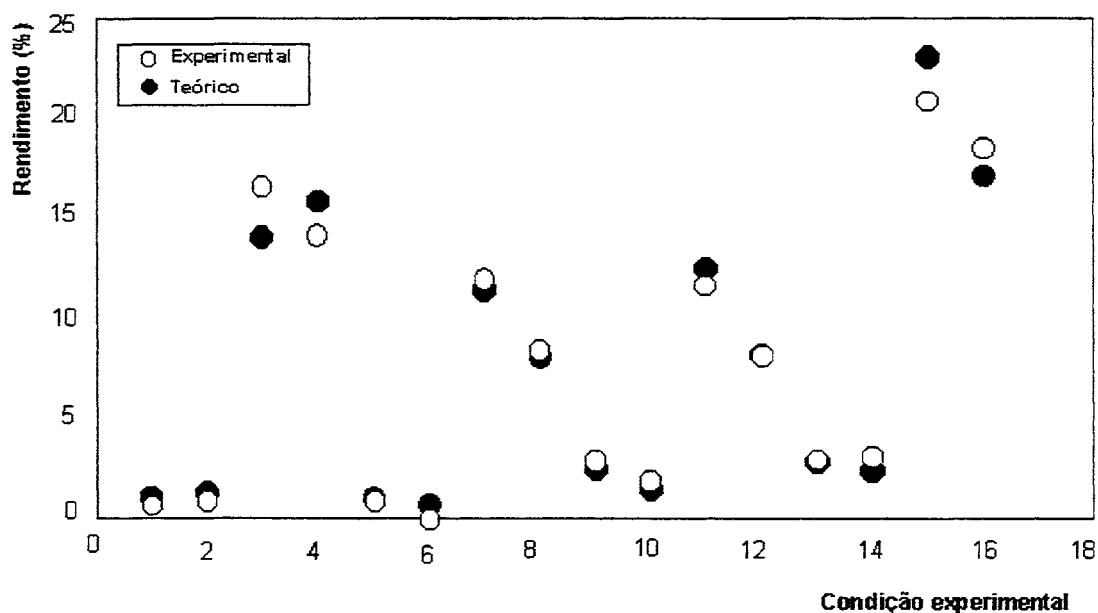


Figura 20: Comparação dos rendimentos do modelo empírico e dos valores obtidos experimentalmente de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} para a extração acelerada com solventes.

2.2 Caracterização química dos extratos

A **Figura 21** apresenta os cromatogramas do íon total dos extratos de erva - mate obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) utilizando hexano e metanol como solventes. A identificação dos picos está apresentada na **Tabela XXI**.

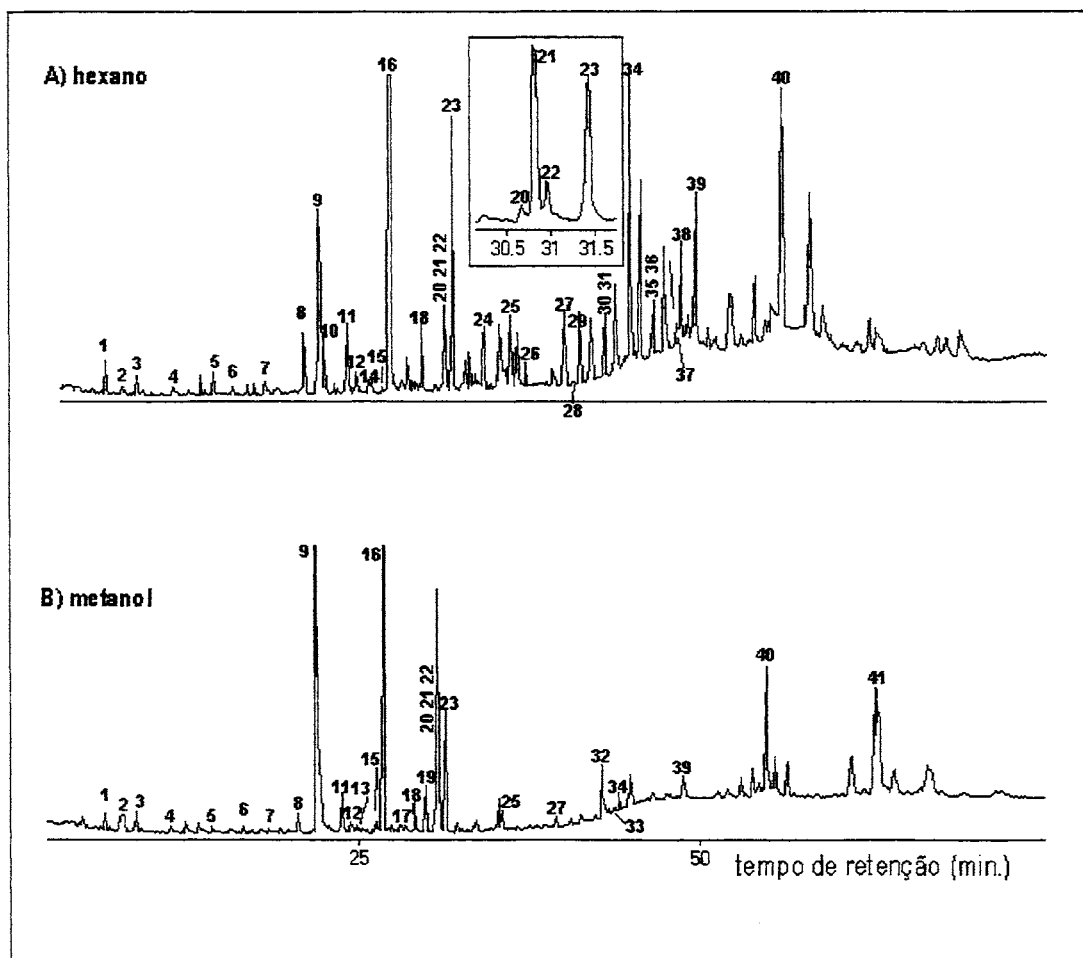


Figura 21: Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) com hexano (A) e metanol (B), das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio. Os compostos correspondentes aos picos identificados estão listados na **Tabela XXI**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

Tabela XXI: Principais compostos identificados nos extratos por extração com líquido pressurizado com hexano e metanol, nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.

Nº	t _R médio	compostos identificados	Solvente		fórmula/MM	Identificação (*)	prob. (%)
			hexano	metanol			
1	6,54	ácido octanóico(*)	X	X	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si/206	MS	85
2	7,67	ácido butanodióico(*)	X	X	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ /262	MS	87
3	8,80	ácido nonanóico(*)	X	X	C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si/220	MS	88
4	11,36	ácido decanóico (*)	X	X	C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si/234	MS	85
5	14,30	ácido undecanóico(*)	X	X	C ₁₄ H ₃₀ O ₂ Si/ 248	MS	88
6	16,74	ácido dodecanóico (*)	X	X	C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si/262	MS	87
7	18,10	ácido octanodióico(*)	X	X	C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si ₂ /318	MS	92
8	20,74	ácido nonanodióico(*)	X	X	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂ /332	MS	90
9	21,81	cafeína	X	X	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ /194	Padrão/MS	96
10	22,0	ácido tetradecanóico(*)	X	X	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ / 300	Padrão/MS	92
11	23,86	hexadecanoato de metila	X	X	C ₁₇ H ₃₄ O ₂ / 270	Padrão/MS	85
12	24,45	ácido hexadecanóico		X	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ /256	Padrão/MS	85
13	24,47	ácido pentadecanóico(*)	X	X	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ / 314	MS	85
14	25,70	hexadecanoato de etila	X		C ₁₈ H ₃₆ O ₂ / 284	padrão/MS	96
15	26,40	ácido palmítico (*)	X	X	C ₃₈ H ₇₄ O ₂ Si/ 591	padrão/MS	87
16	26,94	ácido hexadecanóico(*)	X	X	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si/ 328	padrão/MS	96
17	28,56	fitol		X	C ₂₀ H ₄₀ O / 296	padrão/MS	93
18	29,22	ácido heptadecanóico(*)	X	X	C ₂₀ H ₄₂ O ₂ Si/ 342	padrão/MS	90
19	29,99	fitol(éter-TMS-derivado)		X	C ₂₃ H ₄₈ OSi / 368	padrão/MS	90
20	30,63	ácido linoleico(*)	X	X	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si/ 352	MS	92
21	30,80	ácido linolênico(*)	X	X	C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si/ 350	MS	90
22	30,91	ácido oléico (*)	X	X	C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si/ 354	MS	90
23	31,38	ácido esteárico(*)	X	X	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si/ 356	padrão/MS	92
24	33,69	ácido nonadecanóico(*)	X		C ₂₂ H ₄₆ O ₂ Si/ 370	MS	89
25	35,62	ácido eicosanóico(*)	X	X	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si/ 384	MS	85
26	36,72	pentacosano	X		C ₂₅ H ₅₂ / 352	padrão/MS	88
27	39,52	ácido docosanóico(*)	X	X	C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si/412	MS	85
28	40,48	heptacosanol	X		C ₂₇ H ₅₆ O / 396	MS	86
29	40,50	heptacosano	X		C ₂₇ H ₅₆ / 380	padrão/MS	87
30	42,43	octacosanol	X		C ₂₈ H ₅₈ O / 410	MS	88
31	42,55	octacosano	X		C ₂₈ H ₅₈ / 394	padrão/MS	88
32	42,92	esqualeno		X	C ₃₀ H ₅₀ / 410	padrão/MS	92
33	43,12	hexadecanal	X		C ₁₆ H ₄₀ O	padrão/MS	88
34	44,18	nonacosano		X	C ₂₉ H ₆₀ / 408	padrão/MS	90
35	45,82	triacontanol	X		C ₃₀ H ₆₂ O / 438	MS	89
36	45,88	triacontano	X		C ₃₀ H ₆₂ / 422	Padrão/MS	88
37	47,68	acet. estigmasta-5,22-dien-ol	X		C ₃₁ H ₅₀ O ₂ /454	MS	87
38	47,87	untriacontano	X		C ₃₁ H ₆₄ / 436	padrão/MS	87
39	48,7	vitamina E	X	X	C ₂₉ H ₅₀ O ₂ / 430	padrão/MS	89
40	54,97	estigmast-8-en-3-ol	X	X	C ₃₂ H ₅₆ OSi / 528	padrão/MS	85
41	62,86	agnosterol(TMS-derivado)		X	C ₃₃ H ₅₆ OSi / 496	padrão/MS	85

(*) identificado sob a forma de éster trimetil siliil (TMS)

Nos extratos de erva-mate obtidos por PLE, 41 compostos foram detectados e identificados (por comparação dos tempos de retenção dos padrões ou tentativamente identificados com base na biblioteca Wiley NBS do equipamento) e estão listados na **Tabela XXI** em ordem de eluição na coluna cromatográfica OV-5. Foram considerados tentativamente identificados quando as probabilidades de semelhança do espectro de massa foram superiores a 84%.

Nos extratos das folhas de erva-mate obtidos por extração com líquido pressurizado foram identificados cafeína, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, fitosteróis, ésteres, álcoois, vitamina E, e aldeídos. Cafeína (9), ácido hexadecanóico (16), ácido linolênico (21), ácido esteárico (23) e nonacosano (34) são os maiores compostos dos extratos de erva-mate obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) utilizando hexano e metanol como solventes. Na fração hexânica foram identificados um número maior de compostos em comparação com a fração metanólica. Podemos observar que alguns compostos são identificados simultaneamente nas duas frações, o que indica que a extração destes compostos pode ser realizada com apenas um solvente.

3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos para a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate e da análise qualitativa dos extratos possibilitaram estabelecer as seguintes conclusões:

- As principais variáveis que influenciaram a técnica por extração com líquido pressurizado foram temperatura de extração, polaridade do solvente e massa de amostra.
- As variáveis como volume de “*flushing*”, tempo de extração e número de ciclos não influenciaram significativamente no processo de extração acelerada por solvente.

- A utilização de elevada temperatura de extração e elevado volume de “*flushing*” produzem mais extrato das folhas de erva-mate.
- A utilização de um planejamento experimental possibilitou a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate utilizando a técnica de extração com líquido pressurizado. A condição ótima ocorreu com metanol, 7,5 g de erva-mate, 100% de “*flushing*”, 10 minutos de extração a 100 °C e 1 ciclo.
- Apesar da fração metanólica apresentar um maior rendimento, esta exhibe um menor número de compostos, mas com massa molecular mais elevada do que os compostos da fração hexânica.
- Nos extratos de erva-mate obtidos por PLE, 41 compostos foram detectados e identificados. Entre eles podemos citar a cafeína, fitol, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, fitosteróis, ésteres, álcoois, vitamina E, e aldeídos.
- Cafeína, ácido hexadecanóico, ácido linolênico, ácido esteárico e nonacosano são os compostos majoritários dos extratos de erva-mate obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) utilizando hexano e metanol como solventes.

**CAPÍTULO 7:
COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DE
EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
ORGÂNICOS DA ERVA -MATE
USANDO SOLVENTES ORGÂNICOS**

1.0 EXPERIMENTAL

Neste capítulo foram comparados os métodos de extração utilizando solventes orgânicos (ultra-som e extração com líquido pressurizado), na condição ótima de extração, com o método clássico de maceração. Foram utilizadas amostras de erva-mate, adubada com nitrogênio, plantada ao sol e com idade de poda da folha de 18 meses. O tratamento inicial das amostras seguiu o mesmo procedimento indicado nos capítulos anteriores, quanto à secagem, moagem, classificação granulométrica e estocagem. De forma idêntica, também os padrões e soluções estoque foram preparados conforme o item 1.2 da parte experimental do capítulo 4.

1.1 Amostras, reagentes e solventes

O tratamento das amostras e a escolha dos solventes e reagentes seguiram o mesmo método descrito nos capítulos anteriores.

1.2 Técnicas de extração utilizadas

Além das técnicas já discutidas e desenvolvidas nos capítulos anteriores (extração por ultra-som e extração com líquido pressurizado) foi também aplicado, para fins de comparação, o método clássico de extração por maceração.

1.2.1 Procedimento para a extração por maceração

Cerca de 7,5 g de amostra foram colocados em um erlenmeyer de 500 mL, conforme esquema da **Figura 22**. A extração foi realizada utilizando 225 mL dos seguintes solventes orgânicos: hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol (razão massa/solvente 1:30). Solvente e amostra permaneceram misturados por um período de 10 dias, com agitação ocasional. O mesmo procedimento foi repetido para os outros solventes, utilizando uma nova amostra. Após uma filtragem, os filtrados foram concentrados em evaporador rotatório, secos sob N₂ e guardados ao abrigo da luz e calor.

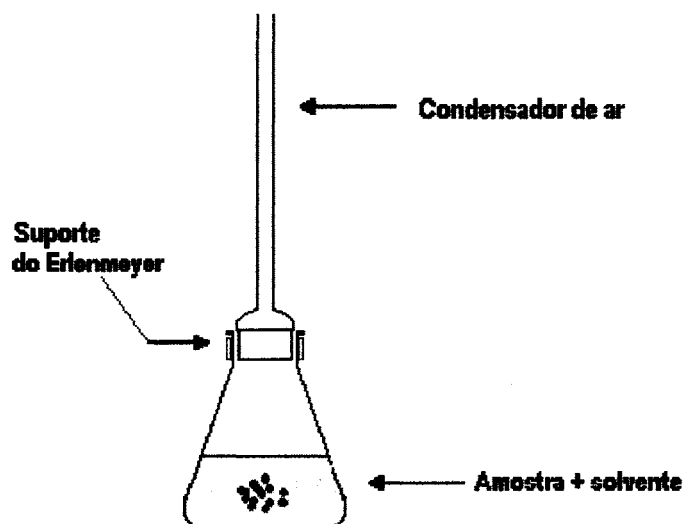


Figura 22 – Desenho esquemático do equipamento usado para maceração.

1.2.2 Procedimento para a extração por ultra-som

Para a comparação de métodos, a extração dos compostos ativos das folhas de erva-mate foi realizada na melhor condição de extração estudada no **Capítulo 5** (7,5 g de amostra, 225 mL de solvente, 180 minutos de extração a

75°C). O extrato foi recuperado por filtração em papel filtro Whatman 1PS. Os solventes foram usados na mesma ordem de polaridade do processo de maceração: hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Após a extração com um solvente, uma nova amostra de erva-mate foi extraída com o solvente seguinte, e assim sucessivamente. Estes extratos foram secos sob N₂, pesados e guardados ao abrigo da luz e calor.

1.2.3 Procedimento para a extração com líquido pressurizado

Para a extração dos compostos ativos, as folhas de erva-mate foram extraídas na melhor condição de extração estudada no **Capítulo 6** (7,5 g de amostra, 100% de “flushing”, 10 minutos de extração a 100 °C e 1 ciclo). O extrato foi recuperado por filtração em papel filtro Whatman 1PS. Os solventes foram usados pela ordem de polaridade: hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. Após a extração com um solvente, uma nova amostra de erva-mate foi extraída com o solvente seguinte e assim sucessivamente. Estes extratos foram secos sob N₂, pesados e guardados ao abrigo da luz e calor.

1.3 Análise cromatográfica dos extratos (GC/MS).

A análise cromatográfica dos extratos obtidos na extração das amostras de erva-mate foi realizada por GC/MS, conforme condições analíticas descritas na **Tabela XII**, e seguindo o procedimento descrito nos **Capítulos 5 e 6**.

A identificação e quantificação dos compostos seguiram o procedimento experimental descrito no capítulo 4, item 1.5, página 55.

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Análise do rendimento dos extratos de erva-mate

Os resultados obtidos nas extrações por maceração, ultra-som e extração acelerada por solvente dos extratos das folhas de erva-mate com hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol expressos em g/100g são apresentados na **Tabela XXII**. O teor de umidade de cada amostra foi calculado e apresentou um valor médio de 6%.

Tabela XXII – Rendimento das extrações por maceração, ultra-som e extração acelerada por solvente, obtido para as amostras de erva-mate, expresso em gramas de (extrato) por 100 g de amostra.

método	solventes- extrato (g/100 g)					
	hexano	tolueno	diclorometano	acetato de etila	acetona	metanol
maceração	2,40±0,05	1,90±0,04	2,50±0,10	1,80±0,06	7,3±0,14	14,3±0,14
ASE	2,90±0,08	4,20±0,07	2,10±0,04	1,30±0,05	3,20 ±0,08	23,1 ±0,2
US	1,35±0,07	4,40 ±0,1	1,90±0,09	2,30±0,1	3,0±0,08	14,4±0,2

A **Tabela XXIII** apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos das técnicas de extração e do tipo de solvente utilizado sobre o rendimento de extrato das folhas de erva-mate. Os valores apresentados nesta tabela são a média dos valores do rendimento do extrato para cada condição. Letras iguais entre dois níveis da média de um fator não tem diferença significativa a 5% (teste de Tukey).

Pode-se verificar nesta **Tabela** que os três métodos de extração estudados apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que o método de extração com líquido pressurizado exibiu maior rendimento. A alta pressão e temperatura de 100 °C utilizados no processo de extração favoreceram a penetração do solvente dentro da matriz, aumentando a transferência de massa, e, conseqüentemente, melhorando a extração. A técnica de extração com líquido

pressurizado tem a vantagem de reduzir o tempo de extração, a diminuição do descarte de solventes e várias amostras podem ser extraídas ao mesmo tempo.

Tabela XXIII: Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%). Efeito das técnicas de extração e o tipo de solvente considerado sobre o rendimento de extrato das folhas de erva-mate.

método de extração			extrato (g/100g)					
			solventes					
maceração	US	PLE	hexano	tolueno	diclorometano	acetato de etila	acetona	metanol
5,0 ^b	4,6 ^c	6,2 ^a	2,2 ^d	3,5 ^c	2,2 ^d	1,8 ^d	4,5 ^b	17,3 ^a

Os extratos obtidos por ultra-som por 180 minutos são comparáveis aqueles realizados pelo método de extração por maceração por 10 dias. A eficiência da extração utilizando-se a técnica de ultra-som é comparável a obtida por maceração e tem ainda como vantagens a possibilidade de utilização de vários tamanhos de amostra, a rapidez de processamento da amostra e o baixo custo.

Quanto aos solventes utilizados, podemos constatar que os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila não apresentaram diferença significativa, ou seja, os três solventes exibiram praticamente o mesmo rendimento. Entre os solventes utilizados, o que apresentou maior rendimento foi o metanol, resultado devido à maior polaridade deste solvente [88].

2.2 Análise dos extratos de erva-mate por GC/MS

2.2.1 Extração por maceração

A **Figura 23** apresenta os cromatogramas das frações de hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, dos extratos obtidos por maceração das folhas de erva-mate. A **Tabela XXIV** apresenta os principais compostos identificados nos extratos obtidos por maceração.

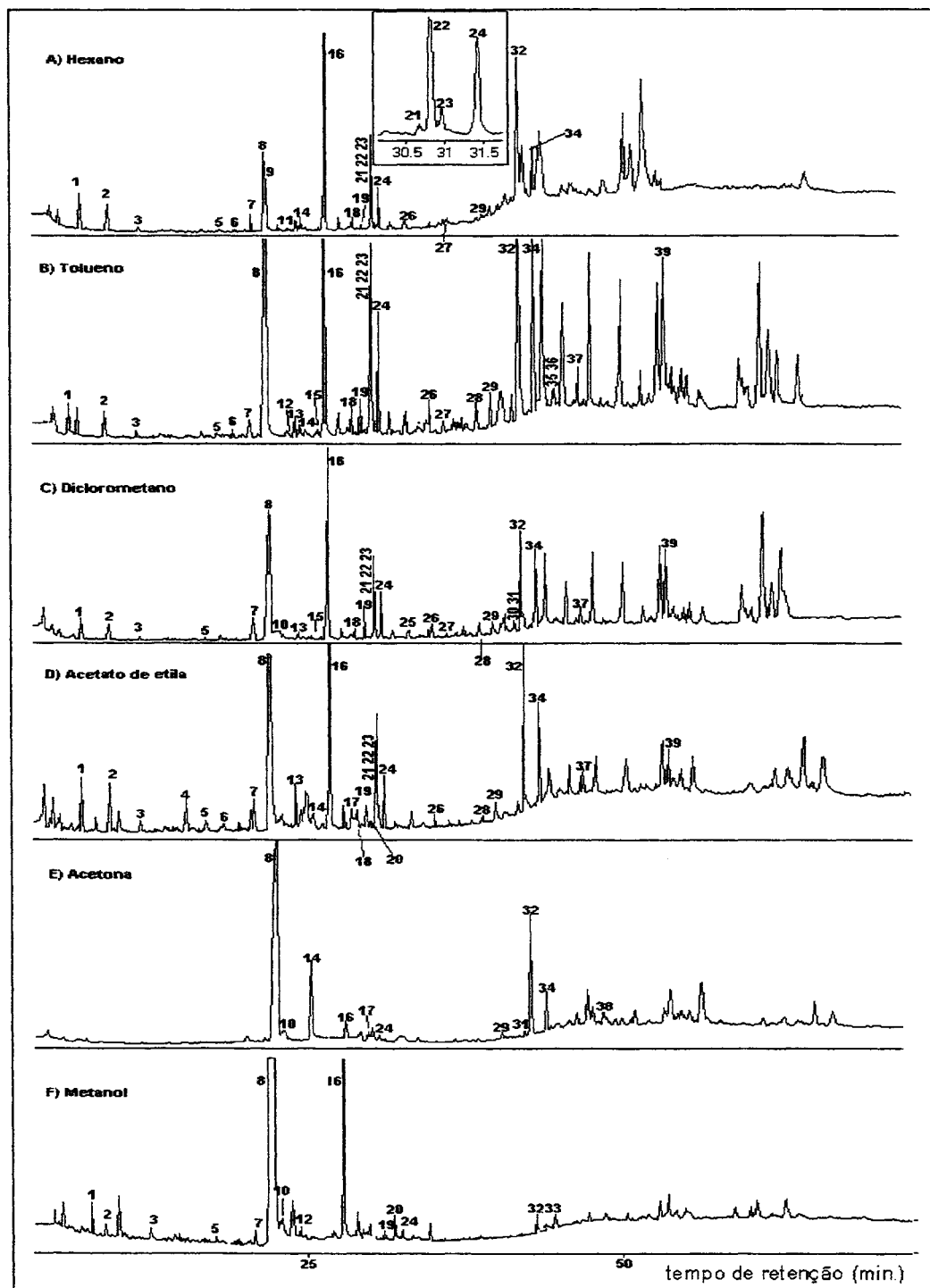


Figura 23: Cromatogramas do íon total dos extratos das folhas de erva-mate obtidos por maceração com hexano (A), tolueno (B), diclorometano (C), acetato de etila (D), acetona (E) e metanol (F). As condições cromatográficas estão descritas na Tabela XII. Os picos detectados ou tentativamente identificados estão na Tabela XXV.

Tabela XXIV: Principais compostos identificados nos extratos obtidos por maceração com hexano(H), tolueno(T), diclorometano(D), acetato de etila (AE), acetona (A) e metanol(M) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.

N°	t _R médio	compostos identificados	H	T	D	AE	A	M	Identificação (*)	prob. (%)
1	6,54	ácido octanóico (*)	X	X	X	X		X	MS	85
2	8,80	ácido nonanóico (*)	X	X	X	X		X	MS	88
3	11,36	ácido decanóico(*)	X	X	X	X		X	MS	85
4	14,3	ácido undecanóico(*)				X			MS	88
5	16,74	ácido dodecanóico (*)	X	X	X	X		X	MS	87
6	18,10	ácido octanodióico (*)	X	X		X			MS	92
7	20,74	ácido nonanodióico(*)	X	X	X	X		X	MS	90
8	21,81	cafeína	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
9	22,00	ácido tetradecanóico(*)	X						padrão/MS	92
10	22,82	teobromina			X		X	X	padrão/MS	90
11	23,22	pentadecanoato de etila	X						padrão/MS	89
12	23,86	hexadecanoato de metila		X				X	padrão/MS	88
13	24,47	ácido pentadecanóico (*)		X	X	X			MS	85
14	24,87	ácido hexadecanóico	X	X		X	X		padrão/MS	89
15	26,40	ácido palmitoleico(*)		X	X				MS	87
16	26,94	ácido hexadecanóico (*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
17	28,56	fitol				X	X		padrão/MS	93
18	29,22	ácido heptadecanóico (*)	X	X	X	X			padrão/MS	90
19	29,99	fitol (éter-TMS derivado)	X	X	X	X		X	padrão/MS	90
20	30,25	docosano				X			padrão/MS	88
21	30,63	ácido linoleico (*)	X	X	X	X			MS	92
22	30,80	ácido linolênico(*)	X	X	X	X			MS	90
23	30,91	ácido oleico(*)	X	X	X	X			MS	90
24	31,38	ácido esteárico(*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	92
25	33,69	ácido nonadecanóico (*)			X				MS	89
26	35,62	ácido eicosanóico(*)	X	X	X	X			MS	85
27	36,72	pentacosano	X	X	X				padrão/MS	88
28	39,52	ácido docosanóico		X		X			MS	85
29	40,50	heptacosano		X	X	X	X		padrão/MS	87
30	42,43	octacosanol		X					padrão/MS	88
31	42,55	octacosano		X			X		padrão/MS	88
32	42,92	esqualeno	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	92
33	43,02	estigmast-5-en-3-ol						X	padrão/MS	85
34	44,18	nonacosano	X	X	X	X	X		padrão/MS	90
35	45,82	triacontanol		X					MS	89
36	45,88	triacontano		X					padrão/MS	88
37	47,87	untriacontano		X	X	X			padrão/MS	87
38	48,7	vitamina E					X		padrão/MS	89
39	54,15	estigmat-5-en-3-ol (3-beta)		X	X	X			padrão/MS	85

(*) identificado sob a forma de éster trimetil silil (TMS)

Como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 23**, os extratos de hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol permitiram a identificação dos principais compostos extraídos das amostras de erva-mate.

Pelo método de extração por maceração foram tentativamente identificados 39 compostos, como metilxantinas, ácidos graxos, ésteres, álcoois, fitoesteróis e hidrocarbonetos. Pode-se destacar a cafeína, teobromina, fitol, esqualeno, ácido palmítico, esqualeno, vitamina E e fitoesteróis característicos desse tipo de amostra [27,28], sendo a cafeína, o ácido palmítico (ácido hexadecanóico) e o esqualeno os compostos majoritários. Comparando-se esses cromatogramas, constata-se que a cafeína, ácido hexadecanóico, ácido esteárico e o esqualeno são identificados em todos os extratos, não se podendo diferenciar os solventes extratores, segundo a eficiência de extração. Também podemos observar que alguns compostos foram identificados em uma única fração, como é o caso do ácido undecanóico, ácido tetradecanóico, pentadecanoato de metila, docosano, ácido nonadecanóico, octacosanol, estigmast-5-en-3-ol e vitamina E, devido à maior seletividade destes compostos relativamente ao solvente extrator.

2.2.2 Extração por ultra-som

A **Figura 24** apresenta os cromatogramas das frações de hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, dos extratos obtidos por ultra-som das folhas de erva-mate.

A **Tabela XXV** apresenta os principais compostos identificados nestes extratos, o tempo de retenção médio dos compostos e o método de identificação utilizado.

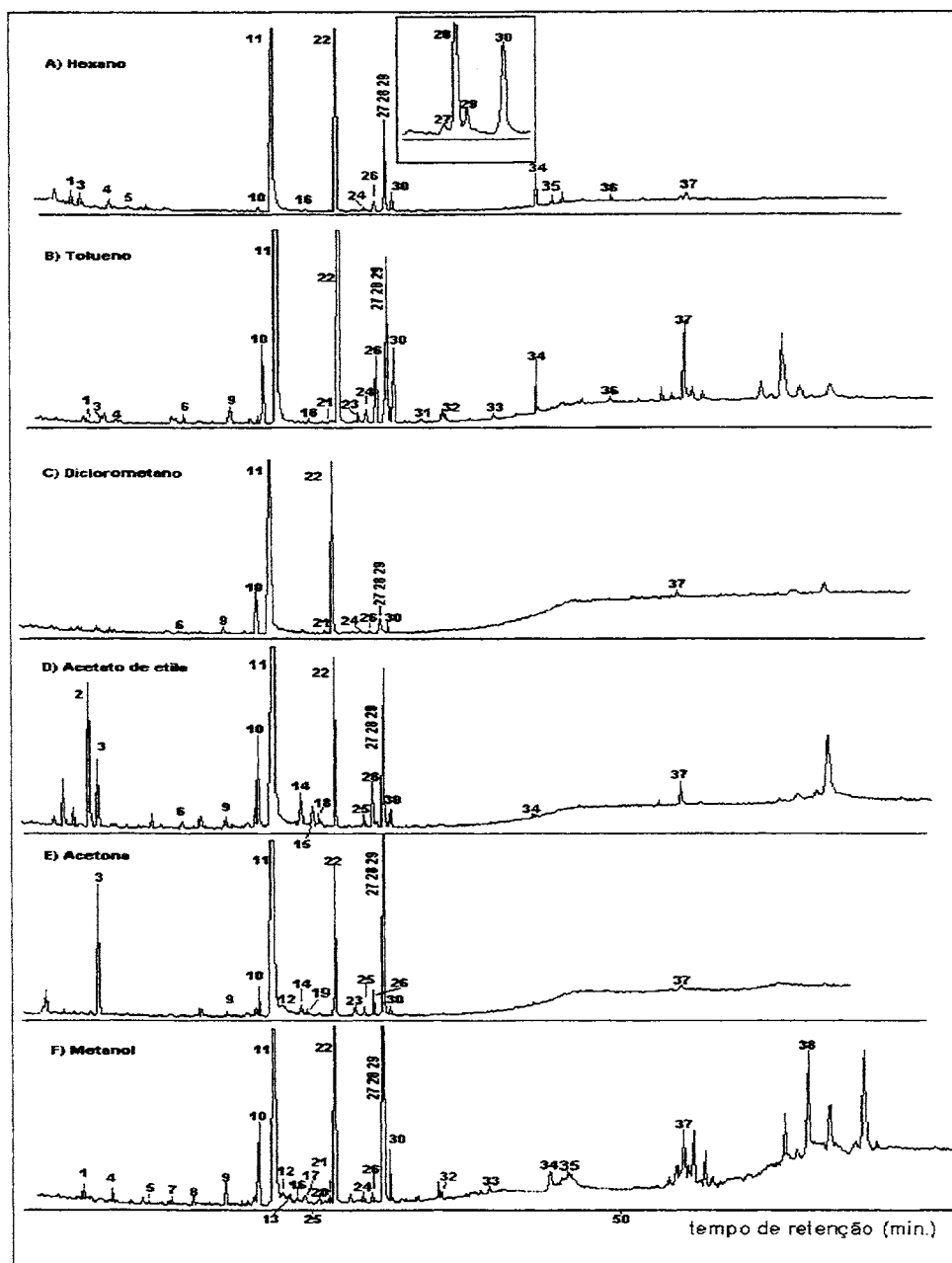


Figura 24: Cromatogramas do íon total dos extratos obtidos por extração com ultra-som com hexano (A) tolueno (B), diclorometano (C), acetato de etila (D), acetona (E), metanol (F) das amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio. Os picos identificados estão na **Tabela XXV**. As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**.

Tabela XXV: Principais compostos identificados nos extratos obtidos por extração com ultra-som com hexano(H), tolueno(T), diclorometano(D), acetato de etila (AE), acetona (A) e metanol(M) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.

N°	t _R médio	compostos identificados	H	T	D	AE	A	M	Identificação (*)	prob. (%)
1	6,54	ácido octanóico (*)	X	X				X	MS	85
2	6,99	glicerol(*)				X			MS	89
3	7,67	ácido butanodióico(*)	X	X		X	X		MS	89
4	8,80	ácido nonanóico (*)	X	X				X	MS	88
5	11,36	ácido decanóico(*)	X					X	MS	85
6	14,3	ácido undecanóico(*)			X	X	X		MS	88
7	15,48	ácido heptanodióico(*)						X	MS	87
8	16,74	ácido dodecanóico (*)						X	MS	87
9	18,10	ácido octanodióico (*)		X	X	X	X	X	MS	90
10	20,74	ácido nonanodióico(*)	X	X	X	X	X	X	MS	90
11	21,81	cafeína	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
12	22,82	teobromina					X	X	padrão/MS	90
13	23,86	hexadecanoato de metila						X	padrão/MS	88
14	24,11	linoleato de etila				X	X		padrão/MS	89
15	24,45	gama-delactona				X			padrão/MS	91
16	24,47	ácido pentadecanóico (*)	X	X				X	MS	87
17	24,87	ácido hexadecanóico						X	padrão/MS	89
18	25,55	eicosano				X			MS	87
19	25,57	hexadecanoato de etila					X		padrão/MS	89
20	25,70	ácido undecanodióico(*)						X	MS	88
21	26,40	ácido palmitoleico(*)		X	X				MS	88
22	26,94	ácido hexadecanóico (*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
23	28,56	fitol		X			X		padrão/MS	93
24	29,22	ácido heptadecanóico (*)	X	X	X			X	padrão/MS	90
25	29,25	ácido cafeico(*)				X	X		MS	88
26	29,99	fitol (*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	93
27	30,63	ácido linoleico(*)	X	X	X	X	X	X	MS	92
28	30,80	ácido linolênico(*)	X	X	X	X	X	X	MS	90
29	30,91	ácido oleico	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	90
30	31,38	ácido esteárico(*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	92
31	33,69	ácido nonadecanóico (*)		X					MS	87
32	35,62	ácido eicosanóico(*)		X				X	MS	85
33	39,52	ácido docosanóico(*)		X				X	MS	85
34	42,92	esqualeno	X	X		X		X	padrão/MS	92
35	44,18	nonacosano	X					X	padrão/MS	90
36	48,7	vitamina E	X	X					padrão/MS	89
37	54,15	estigmaterol (éter-TMS)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	85
38	62,89	agnosterol (éter -TMS)						X	padrão/MS	85

(*) identificado sob a forma de éster trimetil siliil (TMS)

Analisando os cromatogramas da **Figura 24**, podemos observar que as frações de hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol permitiram a identificação dos principais compostos extraídos das folhas de erva-mate. Na técnica de extração por ultra-som foram identificados praticamente os mesmos compostos presentes nos extratos obtidos por maceração. Além destes compostos, podemos destacar o ácido cafeico, que é um ácido fenólico conhecido como ácido clorogênico, com propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas [40,172]. Também foram tentativamente identificados os compostos glicerol, linoleato de etila e gama-delactona.

2.2.3 Extração com líquido pressurizado

A **Figura 25** apresenta os cromatogramas das frações de hexano, tolueno, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, dos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado. A **Tabela XXVI** apresenta a identificação destes compostos.

No presente estudo, os extratos obtidos por PLE apresentaram em sua composição metilxantinas, hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, ácidos graxos, vitamina E e fitoesteróis, característicos das folhas de erva-mate como apresentado nos capítulos anteriores. Como pode ser observado na **Figura 25**, nos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado, foi tentativamente identificado um maior número de compostos comparados aos métodos de extração por maceração e ultra-som.

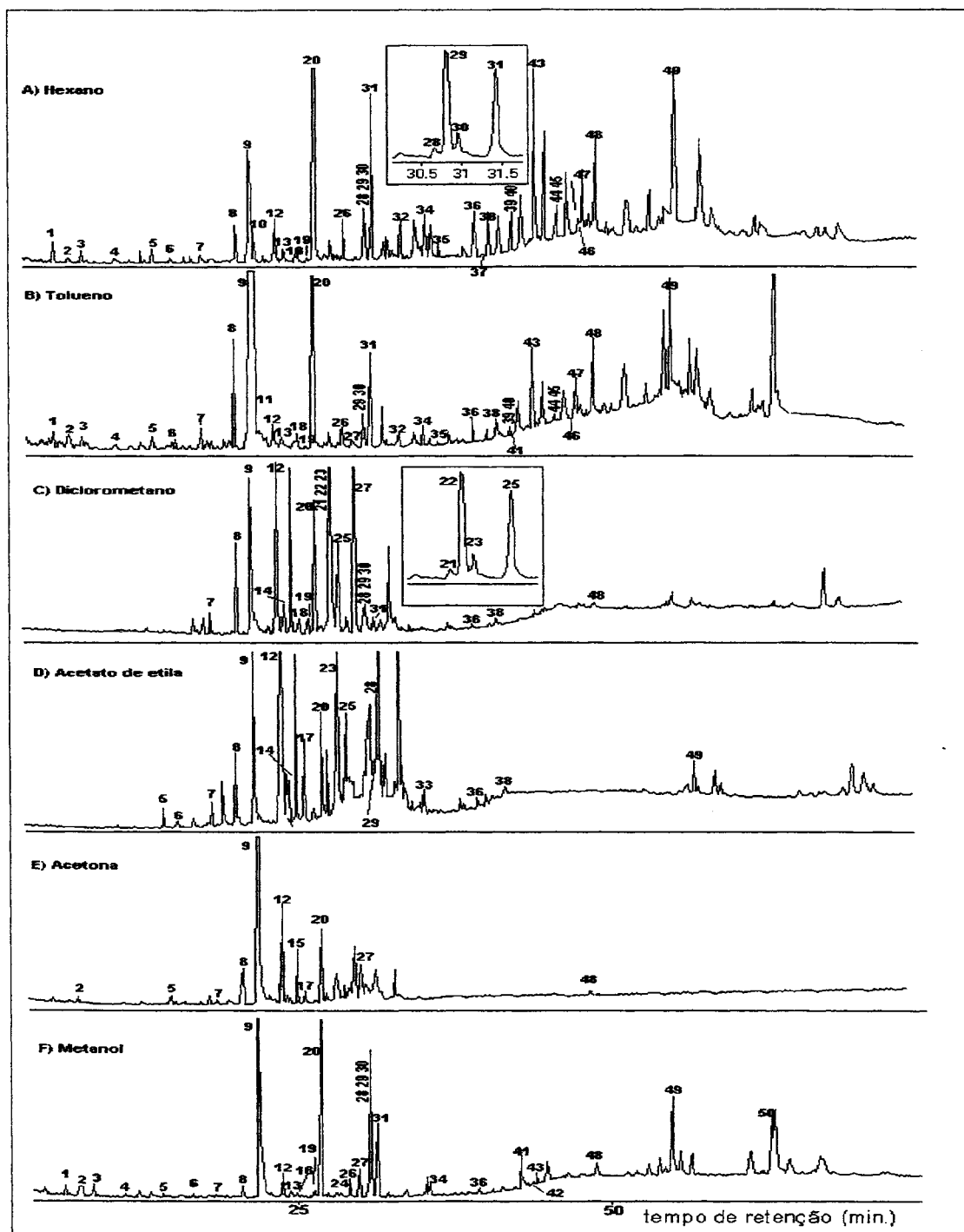


Figura 25: Cromatogramas do íon total dos extratos das folhas de erva-mate obtidos por extração com líquido pressurizado (PLE) com hexano (A), tolueno (B), diclorometano (C), acetato de etila (D), acetona (E) e metanol (F). As condições cromatográficas estão descritas na **Tabela XII**. Os picos identificados estão na **Tabela XXVI**.

Tabela XXVI: Principais compostos identificados nos extratos obtidos por extração com líquido pressurizado com hexano (H), tolueno(T), diclorometano(D), acetato de etila (AE), acetona (A) e metanol(M) nas amostras de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio.

Nº	t _R médio	compostos identificados	H	T	D	AE	A	M	Identificação (*)	prob. (%)
1	6,54	ácido octanóico (*)	X	X				X	MS	85
2	7,67	ácido butanodióico(*)	X	X			X	X	MS	89
3	8,80	ácido nonanóico (*)	X	X				X	MS	88
4	11,36	ácido decanóico(*)	X	X				X	MS	85
5	14,3	ácido undecanóico(*)	X	X		X	X	X	MS	88
6	16,74	ácido dodecanóico (*)	X	X		X		X	MS	87
7	18,10	ácido octanodióico (*)	X	X	X	X	X	X	MS	90
8	20,74	ácido nonanodióico(*)	X	X	X	X	X	X	MS	90
9	21,81	cafeína	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
10	22,0	ácido tetradecanóico(*)	X						padrão/MS	90
11	22,82	teobromina	X					X	padrão/MS	90
12	23,86	hexadecanoato de metila	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	88
13	24,44	Iso-fitol			X	X			MS	89
14	24,45	gama-delactona					X		padrão/MS	91
15	24,47	ácido pentadecanóico (*)	X	X				X	MS	87
16	24,87	ácido hexadecanóico						X	padrão/MS	89
17	25,55	eicosano				X	X		MS	87
18	25,57	hexadecanoato de etila	X	X	X				padrão/MS	89
19	26,40	ácido palmitoleico(*)	X	X	X				MS	88
20	26,94	ácido hexadecanóico (*)	X	X	X	X	X	X	padrão/MS	96
21	27,98	linoleato de metila			X				padrão/MS	89
22	28,15	linolenato de metila			X				padrão/MS	90
23	20,28	oleato de metila			X	X			padrão/MS	90
24	28,56	fitol						X	padrão/MS	93
25	28,78	estearato de metila			X	X			padrão/MS	90
26	29,22	ácido heptadecanóico (*)	X	X				X	padrão/MS	90
27	29,99	fitol (éter-TMS derivado)		X	X		X	X	padrão/MS	93
28	30,63	ácido linoleico(*)	X	X	X	X	X		MS	92
29	30,80	ácido linolênico(*)	X	X	X	X	X		MS	90
30	30,91	ácido oleico(*)	X	X	X			X	padrão/MS	90
31	31,38	ácido esteárico(*)	X	X	X			X	padrão/MS	92
32	33,69	ácido nonadecanóico (*)	X	X					MS	87
33	34,58	tetracosanol				X			padrão/MS	86
34	35,62	ácido eicosanóico(*)	X	X				X	MS	85
35	36,72	pentacosano	X	X					padrão/MS	88
36	39,52	ácido docosanóico	X	X	X	X		X	MS	85
37	40,48	heptacosanol	X						MS	87
38	40,50	heptacosano	X	X	X	X			padrão/MS	88
39	42,43	octacosanol	X	X					MS	87
40	42,55	octacosano	X	X					padrão/MS	89

Continuação da Tabela **XXVI**.

N°	t _R médio	compostos identificados	H	T	D	AE	A	M	Identificação (*)	prob. (%)
41	42,92	esqualeno	X	X				X	padrão/MS	92
42	43,02	estigmast-5-en-ol						X	padrão/MS	85
43	44,18	nonacosano	X	X				X	padrão/MS	90
44	45,82	triacontanol	X	X					MS	88
45	45,88	triacontano	X	X					padrão/MS	89
46	47,69	estigmasta-5,22-dien-ol acetato	X	X					padrão/MS	85
47	47,87	untriaconatano	X	X					padrão/MS	88
48	48,7	vitamina E	X	X	X		X	X	padrão/MS	89
49	54,15	estigmast-5-em-ol (3-beta)	X	X		X		X	padrão/MS	86
50	62,89	agnosterol (éter-TMS)(*)						X	padrão/MS	87

(*) compostos identificados como derivados TMS

2.2.4. Análise quantitativa comparativa dos extratos de erva-mate

A **Tabela XXVII** apresenta as concentrações dos compostos quantificados nos extratos das folhas de erva-mate utilizando as técnicas de extração por maceração, ultra-som e extração com líquido pressurizado expressos em mg/kg, em base seca, calculadas usando-se como padrão interno a bifenila.

A **Tabela XXVIII** apresenta os resultados da análise estatística dos efeitos das técnicas de extração e da polaridade dos solventes utilizados na concentração dos compostos das folhas de erva-mate. Os valores apresentados nesta tabela são a média dos valores das concentrações dos compostos para cada condição. Letras iguais entre dois níveis da média de um fator, não tem diferença significativa a 5% (teste de Tukey). Analisando a **Tabela XXVIII** pode-se observar que as técnicas de extração utilizadas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) sobre a concentração dos compostos analisados.

Tabela XXVII: Concentração dos compostos quantificados nos extratos obtidos nas diferentes técnicas de extração (maceração, ultra-som e extração com líquido pressurizado) das folhas de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio, expressos em mg/kg.

composto	mg/kg \pm desvio padrão (*)					
	extração por maceração					
	hexano	tolueno	diclorometano	acetato de etila	acetona	metanol
cafeína	458,8 \pm 15,5	4271,9 \pm 95	2977,9 \pm 45	1047,6 \pm 32,4	2786,7 \pm 76	950,2 \pm 23,5
ácido palmítico.	228,1 \pm 10,5	216,8 \pm 8,7	114,5 \pm 5,5	29,5 \pm 0,8	45,1 \pm 2,3	13,4 \pm 0,6
fitol	2,1 \pm 0,14	4,4 \pm 0,3	2,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,9 \pm 0,08	0,35 \pm 0,01
ácido esteárico	2,0 \pm 0,1	0,07 \pm 0,001	5,2 \pm 0,7	0,5 \pm 0,05	0,8 \pm 0,07	0,05 \pm 0,001
esqualeno	1157,4 \pm 40,1	121,8 \pm 5,5	33,6 \pm 1,9	104,3 \pm 4,4	389,1 \pm 10,0	309,9 \pm 10,5
vitamina E	131,3 \pm 6,5	280,4 \pm 13	115,5 \pm 4,0	57,4 \pm 2,0	111,9 \pm 4,5	83,1 \pm 3,0
extração por ultra-som						
cafeína	574,9 \pm 25	3878,5 \pm 86,5	4184,1 \pm 65,3	1057,8 \pm 11,9	932,6 \pm 16,6	568,3 \pm 17,8
ácido palmítico.	256,4 \pm 10,1	137,2 \pm 5,0	31,8 \pm 2,3	8,9 \pm 0,4	4,4 \pm 0,2	12,5 \pm 0,3
fitol	3,4 \pm 0,3	0,33 \pm 0,01	0,34 \pm 0,01	ND	2,5 \pm 0,07	0,035 \pm 0,001
ácido esteárico	9,9 \pm 0,3	0,34 \pm 0,07	15,8 \pm 0,5	ND	2,3 \pm 0,14	0,05 \pm 0,001
esqualeno	841,3 \pm 24,8	893,2 \pm 15,1	1416,3 \pm 50,9	520,6 \pm 14	60,1 \pm 2,8	151 \pm 7,0
vitamina E	279,3 \pm 16,3	514,3 \pm 8,3	366 \pm 7,7	120,3 \pm 6,6	27,8 \pm 1,3	55,0 \pm 1,4
extração com líquido pressurizado						
cafeína	1895,2 \pm 55	6358,5 \pm 80	4805,2 \pm 65	1040,4 \pm 45	4724,6 \pm 85	848,9 \pm 36
ácido palmítico.	744,3 \pm 20,1	52,3 \pm 3,1	13,2 \pm 0,5	473,8 \pm 17,5	42,9 \pm 1,8	34,3 \pm 1,0
fitol	4,7 \pm 0,2	0,84 \pm 0,08	1,2 \pm 0,14	11,2 \pm 1,0	1,3 \pm 0,2	0,44 \pm 0,0
ácido esteárico	7,3 \pm 0,4	0,4 \pm 0,02	0,37 \pm 0,01	8,3 \pm 0,08	0,9 \pm 0,05	1,4 \pm 0,1
esqualeno	1187,5 \pm 83,1	120,2 \pm 3,2	34,2 \pm 2,0	105,8 \pm 6,5	389,1 \pm 10	313,4 \pm 5,7
vitamina E	76,1 \pm 1,2	64,3 \pm 1,8	6,85 \pm 0,5	27 \pm 1,6	91,8 \pm 2,9	90,9 \pm 1,6

ND = NÃO DETECTADO

(*) Os resultados referem-se à média de três determinações

Tabela XXVIII: Análise estatística (ANOVA com teste de Tukey a 5%) referente à concentração dos compostos das folhas de erva-mate com idade de poda de 18 meses, cultivada a pleno sol e adubada com fonte de nitrogênio (mg/kg de amostra) obtidos por maceração, ultra-som e extração com líquido pressurizado.

composto	mg/kg de erva-mate (base seca)								
	técnica			solventes					
	maceração	US	ASE	hexano	tolueno	diclorometano	acetato de etila	acetona	metanol
cafeína	2082,2 ^b	1866 ^c	3278,8 ^a	976,3 ^e	4836,3 ^a	3989,1 ^b	1048,6 ^d	2814,6 ^c	789,1 ^f
ácido palmítico	107,9 ^b	75,2 ^c	226,8 ^a	409,6 ^a	135,4 ^c	53,2 ^d	170,7 ^b	30,8 ^e	20,1 ^e
fitol	2,0 ^b	1,1 ^c	3,3 ^a	3,4 ^b	1,9 ^c	1,2 ^e	4,2 ^a	1,9 ^c	0,27 ^f
ácido esteárico	1,4 ^c	4,7 ^a	4,8 ^a	9,7 ^a	0,3 ^e	7,1 ^b	3,0 ^c	1,3 ^d	0,5 ^e
esqualeno	352,7 ^b	647,1 ^a	358,4 ^b	1062,1 ^a	378,4 ^c	494,7 ^b	243,6 ^d	279,5 ^d	258,1 ^d
vitamina E	129,9 ^b	227,1 ^a	59,5 ^c	162,2 ^b	286,3 ^a	162,8 ^b	68,2 ^f	77,1 ^d	76,3 ^e

Através da análise quantitativa dos extratos da erva-mate, pode-se observar que as concentrações de cafeína, ácido palmítico e fitol apresentaram maiores valores utilizando-se como técnica a extração com líquido pressurizado. Também se observa na **Tabela XXII** que os extratos brutos obtidos por esta técnica de extração apresentaram maior rendimento.

Analisando a **Tabela XXVII** pode-se verificar que a polaridade do solvente extrator influencia na concentração dos compostos estudados. Para obter maiores concentrações de cafeína devemos utilizar como solvente o tolueno. O hexano é eficiente na extração do ácido hexadecanóico, ácido esteárico e esqualeno. Na extração por fluído supercrítico, utilizando-se o dióxido de carbono como solvente, foram extraídas maiores quantidades de esqualeno (**Tabela XVI, Capítulo 4**). Como este composto é mais apolar, o mesmo será mais eficientemente extraído em compostos apolares. O fitol é extraído mais eficientemente no solvente acetona.

Dawidowicz e Dorota [85] compararam as técnicas de extração por maceração, extração assistida por microondas, dispersão da matriz em fase sólida, ultra-som e extração com líquido pressurizado para extração e isolamento de cafeína em amostras de chá e café. Os resultados obtidos por estes autores revelaram que o método de extração acelerada por solvente é mais efetivo na extração de cafeína do que os outros métodos utilizados. A temperatura e a pressão são fatores importantes na extração da cafeína, e após 10 minutos de extração o efeito do tempo é insignificante no processo. Em outro trabalho, os mesmos autores mostraram que a quantidade total de cafeína em amostras de café e chá é extraída no primeiro ciclo. A condição de extração utilizada por estes pesquisadores foi de 100°C, 60 bar e de 10 minutos de extração[86]. A técnica de PLE foi menos eficiente para a extração da vitamina E (talvez pela sua possível degradação nesta temperatura) e do esqualeno.

Delgado-Zamarreño [90] e colaboradores utilizaram a técnica de extração com líquido pressurizado para a extração de vitamina E de girassol, utilizando temperaturas mais baixas (50°C), acetonitrila como solvente extrator, 10 minutos de extração e 2 ciclos. Foram obtidas recuperações entre 82 e 110 % do analito.

3.0 CONCLUSÕES PARCIAIS

A comparação das técnicas de extração utilizando solventes orgânicos na extração das folhas de erva-mate permitiu concluir que:

- A extração acelerada por solventes possibilitou a identificação de um maior número de compostos, comparados com as técnicas de ultra-som e maceração. Esta técnica também apresentou o maior rendimento de extrato.
- Na extração com ultra-som utilizando como solvente extrator o acetato de etila e acetona foi identificado o ácido cafeico, que é um ácido clorogênico que apresenta propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas.
- Na extração com líquido pressurizado utilizando como solvente extrator o diclorometano foram identificados os ésteres oleato de metila, linoleato de metila, linolenato de metila e estearato de metila.
- As concentrações de cafeína, ácido palmítico e fitol apresentaram maiores valores utilizando-se a extração com líquido pressurizado.
- A polaridade do solvente extrator influencia na concentração dos compostos estudados.

CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES

CONCLUSÕES GERAIS

Considerando que a erva-mate é uma matriz complexa, as técnicas de extração estudadas mostraram-se eficientes para a extração, separação e caracterização das amostras.

A composição química dos extratos mostrou-se dependente das variáveis agrônômicas, da polaridade do solvente e da técnica de extração utilizada.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Quanto à extração por fluido supercrítico (SFE):

- As variáveis temperatura e pressão exercem efeito pronunciado sobre a quantidade de extrato produzido. Pressões maiores (250atm) levam a maiores rendimentos, uma vez que a elevação da pressão (aumento da densidade) incrementa o poder de solubilização do solvente.
- Foi observado um maior rendimento de extrato das folhas de erva-mate na pressão de 250 atm e 40 °C.
- O fracionamento dos extratos obtido por SFE permitiu a identificação de 51 compostos presentes nas folhas de erva-mate.

Quanto à extração com ultra-som:

- A utilização de um planejamento experimental possibilitou a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate utilizando a técnica de ultra-som. A condição ótima ocorreu com metanol, 180 minutos de extração, a 75 °C e usando-se 7,5 g de amostra em 225 mL de solvente.
- As condições mais favoráveis, entre as estudadas para a extração por ultra-som, são: maior quantidade de solvente, solvente polar e maior tempo de extração.

- É uma técnica rápida, bastante reprodutiva, fácil de ser operada e barata.

Quanto à extração com líquido pressurizado (PLE):

- A utilização de um planejamento experimental possibilitou a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da erva-mate utilizando a técnica de extração com líquido pressurizado. A condição ótima ocorreu com metanol, 7,5 g de erva-mate, 100% de “flushing”, 10 minutos de extração a 100 °C e 1 ciclo.
- Temperatura, pressão e massa de amostra são variáveis que afetam o processo da extração.
- Apesar da fração metanólica apresentar um maior rendimento, esta exibe um menor número de compostos, mas com massa molecular mais elevada do que os compostos da fração hexânica.
- A PLE é uma técnica rápida, bastante reprodutiva, fácil de ser operada, totalmente automatizada e não requer filtração.

Quanto à comparação entre os métodos de extração usando solventes orgânicos:

- O método de extração com líquido pressurizado apresentou maior rendimento, especialmente quando se utiliza o solvente mais polar, no caso o metanol.
- A extração acelerada por solventes possibilitou a identificação de um maior número de compostos, comparados com as técnicas de ultra-som e maceração.
- As concentrações de cafeína, ácido palmítico e fitol apresentaram maiores valores utilizando-se a extração com líquido pressurizado.
- A eficiência da extração utilizando-se a técnica de ultra-som é comparável à obtida por maceração e tem ainda como vantagens a alta reprodutibilidade, a possibilidade de utilização de vários tamanhos de amostra, a rapidez de processamento da amostra e o baixo custo.

Quanto às técnicas analíticas utilizadas:

- A cromatografia líquida preparativa serviu como um fracionamento do extrato, permitindo um melhor isolamento dos compostos de interesse.
- A cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas mostrou-se eficiente para análise orgânica dos extratos das folhas de erva-mate, independente do método de extração, especialmente pela possibilidade de utilizar os modos SCAN e SIM na identificação e quantificação dos mesmos.
- A espectrometria de absorção atômica (FAAS) permitiu determinar com segurança a composição mineral das amostras estudadas.

Quanto à composição química das amostras:

- As folhas de erva-mate apresentaram altas quantidades dos metais K, Ca, Mn e Mg estando de acordo com os níveis encontrados para as plantas.
- A constituição orgânica da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresentou-se muito diversificada. Nas folhas de erva-mate foram identificadas as metilxantinas (cafeína e teobromina), ésteres, ácidos orgânicos, álcoois, hidrocarbonetos, vitamina E, aldeídos e fitosteróis.

Quanto à importância dos compostos identificados:

- Entre os compostos identificados foram encontradas substâncias de elevado valor agregado tais como: cafeína (responsável pelas propriedades estimulantes da erva-mate), fitosteróis (reconhecidos pelas suas características antioxidantes), vitamina E (com reconhecidas propriedades medicinais e utilizada pela indústria alimentícia, nos óleos comestíveis, contra a peroxidação lipídica), ácido cafeico (antioxidante e anticarcinogênico) e esqualeno (bactericida natural, empregado amplamente na indústria cosmética, na fabricação de cremes e emulsões).

Quanto às variáveis agronômicas investigadas:

- Em relação a intensidade de luz , observou-se que plantas a pleno sol produzem maior quantidade de extratos orgânicos do que plantas sombreadas, utilizando a técnica de SFE.
- A idade de poda das folhas também afeta notadamente o rendimento da extração. Até os 18 meses, o acréscimo na idade de poda proporciona um aumento significativo no rendimento da extração. Após os 18 meses a quantidade de compostos voláteis passíveis de extração diminui consideravelmente, chegando aos 24 meses com rendimentos semelhantes aos das plantas de 6 meses de idade de poda.
- Quando as plantas são adubadas somente com fontes de nitrogênio, obtém-se maiores rendimentos em massa de extrato quando comparados com plantas sem adubação. O mesmo efeito acontece quando se aduba as plantas com fonte de potássio (cloreto de potássio). Quando as plantas são adubadas simultaneamente com fontes de nitrogênio e potássio, o rendimento da extração não apresenta mudanças significativas em relação aquele obtido a partir de plantas não adubadas.
- Analisando a influência da idade de poda das folhas de erva-mate, pode-se observar que o teor de minerais é mais alto em folhas jovens. Plantas cultivadas em áreas sombreadas apresentam maior quantidade de nutrientes do que aquelas plantadas ao sol. O metabolismo da planta de erva-mate é fortemente influenciado pelas condições agronômicas de plantio, que se reflete diretamente na composição mineral das folhas. As variáveis agronômicas que mais influenciaram foram a idade de poda das folhas e a intensidade de luz.
- A partir dos resultados alcançados pode-se concluir que a intensidade de luz tem um efeito negativo sobre a concentração da cafeína, fitol, ácido hexadecanóico e vitamina E. A concentração do esqualeno é aumentada sob intensidade de luz, ou seja, em plantas cultivadas a pleno sol.

CAPÍTULO 9:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, CD ROM Censo Agropecuário, N° 22, RS, **1995-1996**.
- [2] INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, CD ROM Censo Agropecuário, N°23, **1997-2000**.
- [3] Mosele, S.H. *A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio-Grandense*. Tese de Mestrado em Administração, Porto Alegre, Ed. UFRGS, **2002**.
- [4] Gosmann, G. *Saponinas de Ilex paraguariensis de St. Hil.* Tese de Mestrado em Farmácia. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **1989**, 108p.
- [5] Simões, C.M.O., Spitzer, V., In *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento - Óleos Voláteis*; Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/ Florianópolis/SC, **1999**, p 733-749.
- [6] Gilberti, G.C. Dominguezia., **1989**, v.7, n°1, p.1-22
- [7] Valduga, E. *Caracterização Estrutural e Química da Erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) e de Espécies Utilizadas na Adulteração*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná., UFPR, Curitiba, PR, Brasil, **1994**, 119 p.
- [8] Zampier, A. C. *Avaliação de Níveis de Nutrientes, Cafeína, e Taninos em Erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná., UFPR, Curitiba, PR, Brasil, **2001**
- [9] Carvalho, P. E. R. *Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira*. Curitiba: EMBRAPA/CNPFFlorestas, **1994**.
- [10] Gilberti, G.C. *Darwiniana*, **1979**, v.22 n°1-3, p. 217-240.
- [11] Kraemer, K. H., Taketa, A. T.C., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Guillaume, D. *Phytochemistry*, **1996**, v.42, n°4, 1119-1122.
- [12] Azzolini, M., Maccari J.R, A. *Produtos Alternativos e Desenvolvimento da Tecnologia Industrial na Cadeia Produtiva da Erva-Mate*. MCT/CNPq/PADCT, Curitiba, PR, **2000**.
- [13] Athayde, M. L. *Saponinas e triterpenos em algumas espécies do Gênero Ilex*, Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, **1993**.

- [14] Athayde, M. L. *Metilxantinas e saponinas em quatro populações de Ilex paraguariensis A. St. Hil; Triterpenos e saponinas em outras espécies do gênero Ilex*. Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre, **2000**.
- [15] Cansian, R. *Variabilidade Genética e de Compostos Voláteis e Semi-Voláteis em Populações Nativas de Ilex paraguariensis (St. Hil.) do Brasil, Visando a Conservação da Espécie*, Tese de Doutorado, São Carlos, SP, **2003**.
- [16] Montanha, J. A. *Estudo químico e biológico das saponinas de Ilex paraguariensis St. Hil-Aquifoliaceae*. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, **1990**.
- [17] Gosmann, G, Schenkel, E.P., Seligmann, O. *Journal of Natural Products*, **1989**, v. 52, 1367-1370.
- [18] Kraemer, K.H. *Ilex paraguariensis St. Hill (Erva-mate): distribuição de saponinas em estudos iniciais em culturas de células em suspensão*, Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, **1997**.
- [19] Kraemer, K.H., Taketa, A.T.C., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Guillaume, D. *Phytochemistry*, **1999**, v.42, n°4, 1119-1122.
- [20] Alikaridis, F. *J.Ethno-pharmacol.*, **1987**, 20 : 121-144.
- [21] Athayde, M. L., Coelho, G.C., Schenkel, E.P., *Phytochemistry*, **2000**, v.55, 853-857.
- [22] Reginatto, F.H., Athayde, M. L., Schenkel, E.P. *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, v. 10, n°6, 443-446.
- [23] Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J. R. *Food Chemistry*, **1990**, v.35, 13-21.
- [24] De Lacerda, M.E., Filho, H. C. A. *Brazilian Journal of food Technology*, **2000**, v.3, 17-21.
- [25] Saldaña, M. D.A., Mohamed, R. S., Mazzafera, P. *Braz. J. Chem. Eng.* **2000**, v.17, n°3, 1-13.
- [26] Saldaña, M. D.A., Mohamed, R. S., Baer, M.G., Mazzafera, P. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, v.47, 3804-3808.
- [27] Saldaña, M. D.A., Zetzi, C., Mohamed, R. S, Brunner, G. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, v.50-4820-4826.
- [28] Esmelindro, M.C., Toniazzo, G., Lopes, D., Oliveira, D., Dariva, C. *Journal of Food Engineering*, **2005**, v. 70, 588-592.
- [29] James, J.E., *Caffeine and health*; Academic Press Inc.: San Diego, CA, **1991**.

- [30] Kawakami, M., Kobayashi, A. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, v.39, 1275-1279
- [31] Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M.J. *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, v.41, 107-111.
- [32] Campos, A.M, Escobar, J., Lisi, E.A. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **1986**, v. 7, n°1. p. 43-49.
- [33] Filip, R., López, P., Gilberti, G., Coussio, J., Ferraro, G. *Fitoterapia*, **2001**, v.72, 774-778.
- [34] Schinella, G.R., Troiani, G., Dávila, V., Buschiazzo, P.M. de, Tournier, H.A. *Biochem. and Biophys. Research Communications*, **2000**, v.269, 357-360.
- [35] Filip, R., Lotito, S.B., Fraga, C.G., Ferraro, G. *Nutrition Research*, **2000**, v.20, n°10, 1437-1446.
- [36] Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A., Nunes, E. *J. Altern. Complement. Med.*, **2003**, v.9, 379-387.
- [37] Chandra, S. Mejjia, E.G. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, v.52, 3583-3589.
- [38] Ohem, N., Holz J. *Planta Medica*, **1988**, v. 54, n. 6, p. 576.
- [39] Ramirez-Mares, M.V., Chandra, S., Mejjia, E. G. *Mutation Research*, **2004**, v.554, 53-65.
- [40] Mejjia, E. G., Ramirez-Mares, M.V., Song, Y.S., Kobayashi, H. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, v.53, 1966-1973.
- [41] Paredes, A.M.; Valdez, E.C.; Kanzig, R. "Variación de los hidratos de carbono durante el secado de la yerba mate." *II Congresso Sul-Americano da Erva-mate*, **2000**, v.1, n.1, pp.182-185.
- [42] Sanz, M. D. T; Isasa, M. E. T. *Arch. Lat. de Nut.*, **1991**, v. 41, n. 3, . 441 – 454.
- [43] Garcia, R. V., Basualdo, I., Paralta, Herebia, I. M. de, Caballero, S. *Arch. Lat. Nutr.* , **1997**, v. 47, 77-80.
- [44] Heinrichs, R., Malavolta, E. *Ciência Rural*, **2001**, v. 31, n°5, 781-785.
- [45] Reissmann, C.B., Radomski, M.I., Quadros, R.M.B. *Archives of biology and technology*, **1999**, v.42, n°2, 187-194.
- [46] Malavolta, E. *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. São Paulo: Ceres, **1980**.
- [47] Camargo, P. N., Silva, O. *Manual de adubação foliar*, São Paulo, **1975**.
- [48] Cardellina, J. H. *J. Nat. Prod.*, **2002**, v.65, 1073-1084.

- [49] Vinatoru, M. *Ultrasonics sonochemistry*, **2001**, v.8, 303-313.
- [50] Huie, C. W. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, v. 373, 23-30.
- [51] Priego-Capote, F. Luque de Castro, M.D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, v.23, n°9, 644-653.
- [52] Camel, V. *Analyst*, **2001**, v. 126, 1182-1193.
- [53] Luque de Castro, M.D., Jiménez-Carmona, Fernández-Pérez, V. *Trends in Analytical chemistry*, **1999**, v.18, n°11,708-716.
- [54] Augusto, F.; Lopes, A. L. E. ; Zini, C. A. *Trends in Analytical chemistry*, **2003**, v. 22, n. 3, p. 160-168.
- [55] Lang, Q., Wai, C.M. *Talanta*, **2001**, v.53, 771-782.
- [56] Ferri, P.H.; In *Química de produtos naturais: métodos gerais – Plantas Medicinais: Arte e Ciências*; Stasi, L.C. di, organizador, Editora UNESP, SP: **1996**, p 129.
- [57] Luque-García, J.L., Duque de Castro, M. D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, v.22, n°1, 41-47.
- [58] Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T. J. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, v. 8, 137-142.
- [59] Vinatoru, M., Toma, M., Mason, T. J, Radu, O., Filip, P.I. Lazurca, D. *Ultrasonic. Sonochem*, **1997**, v.4 , 135-139.
- [60] Da Luz, L.P. *Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos*, Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, **1998**.
- [61] Valachovic, P., Pechova, A., Mason, T.J. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, v.8, 111-117.
- [62] Luque de Castro, M.D., da Silva, M.P. *Trends in Analytical Chemistry*, **1997**, v.16, n°1, 16-24.
- [63] Fransson, B., Ragnarsson, U., *J. Chromatogr.A*, **1998**, 827, 31-35.
- [64] Melecchi, M. I. S., Martinez, M. M., Abad, M.I., Zini, P., Caramão, E. B. *Sep. Sci*, **2002**, v.25, 86-90.
- [65] Shotipruk, A., Kaufman, P. B., Wang, H. Y. *Biotechnol. Prog.* **2001**, v.17, 924-928.
- [66] Hromádková, Z., Ebringerová, A. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2003**, v.10, 127-133.

- [67] Schinor, E.C., Salvador, M.J., Turatti, I.C.C., Zucchi, O.L.A.D., Dias, D.A. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2004**, v.11, 415-421.
- [68] Zhang, F., Chen, B., Xiao, S., Yao, S. *Separation and Purification Technology*, **2005**, v.42, 283-290.
- [69] Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P., Mason, T.J. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, v.8, 299-301.
- [70] Rodrigues, M.R.A. *Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano*, Tese de Doutorado, UFRGS, **2002**, 143 p.
- [71] Wu, J., Lin, L., Chau, F. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2001**, v.8, 347-352.
- [72] Luque-Garcia, J.L., Luque de Castro, M.D., *J. of Chromatogr. A*, **2004**, v. 1034, 237-242.
- [73] Pappas C., Tarantilis, P.A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., Polissiou, M. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2002**, v.9, 19-23.
- [74] Torre, J., Lorenzo, M.P., Martínez-Alcázar, M.P., Barbas, C. *J. of Chromatogr. A*, **2001**, v. 919, 305-311.
- [75] Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. *J. of Cromatogr. A*, **2003**, v.1012,nº2, 119-128.
- [76] Waksmundzka-Hajnos, M., Petruczynik, A., Dragan, A., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Sowa, I. *J. of Cromatogr. B*, **2004**,v.800, 181-187.
- [77] Alissandrakis, E., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Polissiou, M., Harizanis, P.C. *Food Chemistry*, **2003**, v.82, 575-582.
- [78] Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. *Food Chemistry*, **2005**, v.92, 521-525.
- [79] Chemat, F., Grondin, I., Sing, A.S.C., Smadja, J. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2004**, v.11, 13-15.
- [80] Li, H., Chen, B., Yao, S. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2005**, v.12, 295-300.
- [81] Björklund, E., Nilsson, T. *Trends in Analytical Chemistry*, **2000**, v.19, nº7, 434-445.
- [82] Abrha, Y., Raghavan, D. *Journal of Hazardous Materials*, **2000**, v. B 80, 147-157.
- [83] Mozajska, H. G., Da Browski, L., Namiésnik, J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2001**, v.31, nº3, 149-165.
- [84] Luque-Garcia, J.L., Luque de Castro, M.D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, v.23, nº2, 102-108.

- [85] Dawidowicz, A. L., Wianowska, D. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, v.37, n°5, 1155-1159.
- [86] Dawidowicz, A. L., Wianowska, D. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, v.37, n°5, 1161-1165.
- [87] Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns J., Cifuentes, A. *J. of Chromatogr. A*, **2004**, v.1047, 195–203
- [88] Herrero, M., Martín- Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. *Food Chemistry*, **2005**, v. 93, 417-423.
- [89] Alonso-Salces, R.M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. *J. of Chromatogr. A*, **2001**,v. 933,37-43.
- [90] Delgado-Zamarreño, M.M., Bustamante-Rangel, M., Sánchez-Pérez, A., Carabias-Martínez, R. *J. of Chromatogr. A*, **2004**, v.1056, 249–252.
- [91] Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, v.522, 169–177.
- [92] Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. A. Ibáñez, E., Cifuentes, A. *J. of Chromatogr. A*, **2005**, v.1084, 54-62
- [93] Yang, F.Q., Li, S.P., Chen, Y., Lao, S.C., Wang, Y.T., Dong, T.T.X., Tsim, K.W.K. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2005**, v.39, 552-558.
- [94] Choi, M. P.K. , Chan, K. K.C. , Leung, H. W. , Huie, C. W. *J. of Chromatogr. A*, **2003**, v.983 153–162.
- [95] Ong, E., Woo, S., Yong, Y., *J. of Chromatogr. A*, **2000**, v.313, 57–64.
- [96] Klejdus, B., Mikelová, R., Adam, V., Zehnálek, J., Vacek, J., Kizek, R., Kubán, V. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, v.517,1–11.
- [97] Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M., *J. of Chromatogr. A*, **1999**, v.837, 211-219.
- [98] Piñeiro, Z., Palma, M., Barroso, C.G. *J. of Chromatogr. A*, **2004**, 1026, 19-23.
- [99] Eller, F.J., Taylor, S.L. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, v.52, 2335-2338.
- [100] Lao, S.C., Li, S.P., Kan, K. K.W., Li, P., Wan, J.B., Wang, Y.T., Dong, T.T.X., Tsim, K. W.K. *Analytica Chimica Acta*, **2004**,v. 526, 131–137.
- [101] Alonso-Salces, R. M., Barranco, A., Corta E. Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F. *Talanta*, **2005**, v. 65, 654–662.

- [102] Carrilho, E., Tavares, M. C. H., Lanças, F. M. *Química Nova*, **2001**, v.24, nº 4, 509-515.
- [103] Zougagh, M., Valcárcel, M., Rios, A. *Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, v.23, nº5, 1-7.
- [104] Motohashi, N., Nagashima, H., Párkányi, J. *Biochem. Biophys. Methods*, **2000**, 313-318.
- [105] Tuner, C., Eskilsson, C.S., Björklund, E. *J. of Chromatogr. A*, **2000**, v.947, 1-22.
- [106] Turner, C., King, J.W., Mathiasson, L. *J. of Chromatogr. A*, **2001**, v.936, 215-237.
- [107] Reverchon, E. *J. of Supercritical*, **1997**, v.10, 1-37.
- [108] Luque de Castro, M.D., Jiménez-Carmona, Fernández-Pérez, V. *Trends in Analytical chemistry*, **1999**, v.18, nº11.
- [109] Lang, Q., Wai, C.M. *Talanta*, **2001**, v.53, 771-782.
- [110] Vági E., Simándi B., Suhajda A., Héthelyi E. *Food Research International*, **2005**, 38, 51-57
- [111] Roth, M. *J. of Cromatogr. A*, **2004**, v.1037, 369-391.
- [112] King, J.W. *Trends in Analytical Chemistry*, **1995**, v.14, nº10, 474-481.
- [113] Westwood, S. A., Ed., *Supercritical Fluid Extraction and Its Use in Chromatographic Sample Preparation*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, **1993**
- [114] Silva, F.P.T, Liberal, E.M. & Pessoa, F.L.P. *Bol. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1997**, v.31, nº1, 48-61.
- [115] M. D. Luque de Castro, M. T. Tena, M. Valcarcel, *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer-Verlag, Berlin, **1994**.
- [116] Lameira, C.P., Coello, G.L.V., Mothe, C.G. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1997**, v.17, 405-407.
- [117] Lucien, F.P., Foster, N.R. *J. of Supercritical*, **2000**, v.17, 111-134.
- [118] Taylor L. T. *Supercritical Fluid Extraction*, John Wiley & Sons, New York, **1996**.
- [119] Bøwadt, S., Hawthorne, S.B., *J. of Cromatogr. A*, **1995**, v.703, 549-571.
- [120] Beckman, J. E. *J. of Supercritical Fluids*, **2004**, v.28, 121-191.
- [121] Mohamed, R.S. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1997**, v.17, 344-353.

- [122] Saldaña, M. D.A., Mohamed, R. S., Mazzafera, P. *Braz. J. Chem. Eng.* **2000**, v.17,n°3,1-13.
- [123] Saldaña, M. D.A., Mohamed, R. S., Baer, M.G., Mazzafera, P. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, v.47, 3804-3808.
- [124] Esmelindro, M.C., Toniazzo, G., Lopes, D., Oliveira, D., Dariva, C. *J. of Food Engineering*, **2005**, v. 70, 588-592.
- [125] Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Soro, C., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, v. 50, 1492-1496.
- [126] Nossack, A. C., Vilegas, J. H. Y., Baer, D. V., Lanças, F.M. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2000**, v.11, n°5, 495-501.
- [127] Khajeh, M., Yamini, Y., Sefidkon, F., Bahramifar, N. *Food Chemistry*, **2004**, v.86, n°4, 587-591.
- [128] Aghel, N., Yamini, Y., Hadjiakhoondi, A., Pourmortazavi, S. M. *Talanta*, **2004**, v.62, 407-411.
- [129] Ebrahimzadeh, H., Yamini, Y., Sefidkon, F., Chaloosi, M., Pourmortazavi, S. M. *Food Chemistry*, **2003**, v. 83, 357-361.
- [130] Seger, C., Römpf, H., Sturm, S., Haslinger, E., Schmidt, P.C., Hadacek, F. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2004**, v.21, n°4, 453-463.
- [131] Yang, C., Xu, Y., Yao, W., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, v.50, 846-849.
- [132] Rodrigues M. R. A, Caramão, E. B., Santos, J. G., Dariva, C. e Oliveira, J. V. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 453-456.
- [133] Rodrigues M. R. A, Kräuse, L.C., Caramão, E. B., Santos, J. G., Dariva, C. e Oliveira, J. V. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 3042-3047.
- [134] Özcan, A., Özcan, A. S. *Talanta*, **2004**, v.64, 491-495.
- [135] Pereira, C.G., Marques M.O.M., Barreto, A.de S., Siani, A. C., Fernandes, E. C., Meireles, M. A. A. *J. of Supercritical Fluids*, **2004**, v.30, n°1, 51-61.
- [136] Goli, A. H., Barzegar, M., Sahari, M. A. *Food Chemistry*, **2005**, v.92, 521-525.
- [137] Lanças, F. M., Vilegas, J. H. Y., Nossack, A.C., Vasconcelos, E.C., Celeghini, R.M.S., Cappelaro, E.A., Von Baer, D., Escalona, A., Hasegawa, M. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **1997**, v.17, 418-422.
- [138] Chang, C. J., Chiu, K., Chen, Y., Chang, C. Y. *Food Chemistry*, **2000**, v. 68, 109-113.

- [139] Khajeh, M. , Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F. , Pirmoradei, M. R. *Food Chemistry*, **2005**, v.86, 587-591.
- [140] Damjanović, B., Lepojević, Ž., Zivković, V. , Tolić, A. *Food Chemistry*, **2005**, v.92, 143-149.
- [141] Amaral, J. S., Seabra, R. M., Andrade, P. B. , Valentão, P. , Pereira, J.A., Ferreres F. *Food Chemistry*, **2004**, v. 88, 373–379.
- [142] Stuart, G.R. *Extração de Óleo Essencial de Ocimum basilicum L Utilizando Dióxido de Carbono à Altas Pressões*, Dissertação de Mestrado, **1995**, Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 83 p.
- [143] Linden, Rafael *Desenho estatístico de experimentos e metodologia de superfície de resposta aplicados à obtenção de formas farmacêuticas derivadas de Passiflora edulis*. **1998**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em ciências farmacêuticas. UFRGS. Porto Alegre.
- [144] Wehrlé, P.; Stamm, A. *Science Technologie Pharmaceutique*. **1989**, 5(6/7), 471-489.
- [145] Huisman, R.; Van Kamp, H.V.; Weyland , J.W.; Doornbos, D.A.; Bolhuis, G.K.; Lerk, C.F. *Development and optimization of pharmaceutical formulations using a simplex lattice design*. **1984**. *Pharmaceutish Weekblad, Scientific Edition*.6, 185-194.
- [146] Neto, B., Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. **2001**. Campinas: Editora da Unicamp.
- [147] Dariva, C. *Extração Supercrítica de Compostos Voláteis do Carvão Mineral Utilizando Solventes Doadores de Hidrogênio*, Dissertação de Mestrado, **1995**, Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 144 p.
- [148] Montgomery, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, **1991**.
- [149] Cecchi, H. M. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*, Editora UNICAMP: Campinas, SP, **1999**.
- [150] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. *Introdução a Métodos Cromatográficos*: Editora da UNICAMP: Campinas, SP, 6 ed., **1995**

- [151] Lanças, F.M., *Validação de Métodos Cromatográficos de Análise*, Editora RIMA, **2004**.
- [152] Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Antolovich, M. *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, v.18, nº5.
- [153] Skoog, D.A., West, D .M., Holler, F.J. *Analytical Chemistry An Introduction*, Editora Saunders College, 6 Ed, **1994**.
- [154] Christian, G.D. *Analytical Chemistry*, Editora Wiley, 5 Ed., **1994**.
- [155] Holme, J. D., Peck, H. *Analytical Biochemistry*, Editora Longman, 3 Ed., **1998**.
- [156] R. Kaspary *Efeitos de diferentes graus de sombreamento sobre o desenvolvimento e trocas gasosas de plantas jovens de erva-mate*. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Porto Alegre, **2002**, 231 p.
- [157] Ajasa, A. M. O., Bello, M. O., Ibrahim, A.O., Ogunwande, I.A., Olawore, N.O. *Food Chemistry*, **2004**, 85: 67-71.
- [158] Fernández-Cáceres, P.L., Martín, M.J., Pablos, F., González, A.G. *J. Agric. Food Chem.* , **2001**, 49: 4775-4779.
- [159] Camacho M., Bellefleur P. *Revista de Biología Tropical*, **1996**, 44, 71-79.
- [160] Coelho G. C., Mariath J. E. A. *Feddes Repertorium*, 1996, v. 107, 19-30.
- [161] Molnár-Perl, I. Füzfai, Z. *J. Chromatogr.*, **2005**, v.1073, 201-227.
- [162] Angus S, Armstrong B, Reuck K.M. *Inter. Intenational Thermodynamic Tables of the Fluid State Carbon Dioxide*. Oxford, New York: Pergamon Press. Cap.2, v. 3, **1976**.
- [163] He H., Cai Y., Sun M., Corke H. *J. Agric. Food Chem*, **2002**, 50, 368-372.
- [164] Smith T. J. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **2000**, v.9, 1841-1848.
- [165] Holser, R.A., Bost, G., Van Boven, M., *J. Agric. Food Chem*, **2004**, v.52, 2546.
- [166] Duke, J.A., *Handbook of Biologically Active Phytochemicals and Their Activities*, CRC, Press, London, **1992**.
- [167] Ching L.C., Mohamed S. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49: 3101-3105.
- [168] Brigelius-Flohe R, Salonen J.T. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2002**, 76: 703 - 716.
- [169] Siqueira, D. S. de, Pereira A. S., Aquino F. R. N., Cabral, J. A., Ferreira, C. A. C., Simoneit B. R. T., Elias V. *Química Nova*, **2003**, v.26, nº5, 633-640.

- [170] Wierbicki, A.S. *Molecular genetics and metabolism*, **2004**, v.83, 347.
- [171] Mazzafera, P. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **1994**, v.60, 149-151.
- [172] Mazzafera, P. *Bragantia*, **1999**, v.58, 387-391.
- [173] Choi, Y.H., Sertic, S., Kim, H.K., Wilson, E. G., Michopoulos, F., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C., Kricun, S.D.P., Verpoorte, R. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, v.53, 1237-1245.

**CAPÍTULO 10:
SUGESTÕES PARA TRABALHOS
FUTUROS**

A partir dos resultados constatados durante o desenvolvimento deste trabalho, pode-se propor as seguintes pesquisas nesta área:

- Estudar a presença de antioxidantes nos extratos: determinar sua ação e identificar os principais compostos responsáveis por esta ação.
- Estudar a extração “sub-crítica” com água operando o equipamento ASE 300™.
- Estudar a extração com fluido supercrítico (SFE) mediante a utilização de co-solvente, com a avaliação do co-solvente adequado e da proporção necessária de adição ao solvente principal.
- Estudar os compostos voláteis da erva-mate usando microextração em fase sólida (SPME).
- Estudar a composição química das flores e frutos da erva-mate.

**CAPÍTULO 11:
PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA**

11.1. Trabalhos Publicados

-Influence of agronomic variables on the composition of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) extracts obtained from CO₂ extraction at 30°C and 175 bar, Jacques, Rosângela Assis, Esmelindro, Ângela Aquino; Santos, Jonathan G. dos; Dariva, Cláudio; Mossi, Altemir, *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1990-1995, 2004.

- Comparison of accelerated solvent extraction, Soxhlet extraction and ultrasound-assisted extractions of nerolidol, fatty acids, phytosterols and vitamin E from leaves of *Piper gaudichaudianum* Kunth, Péres, Valéria Flores; Jacques, Rosângela Assis; Melecchi, Maria Inês Soares; Abad, Fernanda Contieri; Martinez, Migdalia Miranda, Oliveira, Eniz Conceição; Caramão, Elina Bastos, *J. of Chromatogr. A*, 2005, *in press* (disponível on line).

- Optimization of Accelerated Solvent Extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves, Péres, Valéria Flores; Jacques, Rosângela Assis; Melecchi, Maria Inês Soares; Abad, Fernanda Contieri; Martinez, Migdalia Miranda, Oliveira, Eniz Conceição; Caramão, Elina Bastos, *J. of Chromatogr. A*, 2005, *in press* (disponível on line).

-The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration, Jacques, Rosângela Assis; Freitas, Lisiane dos Santos; Dariva, Cláudio; Oliveira, Ana Paula; Oliveira, José Vladimir. and Caramão, Elina Bastos, paper aceito para publicação na revista *Ultrasonics Sonochemistry*.

11.2 Trabalhos completos em anais de eventos

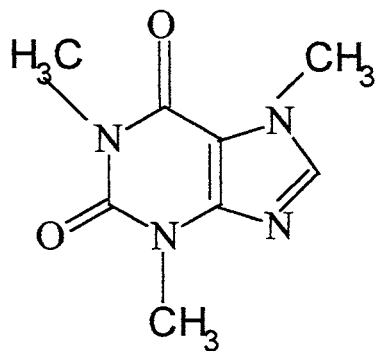
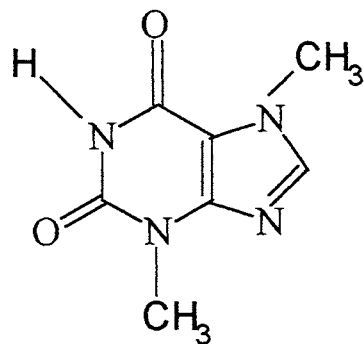
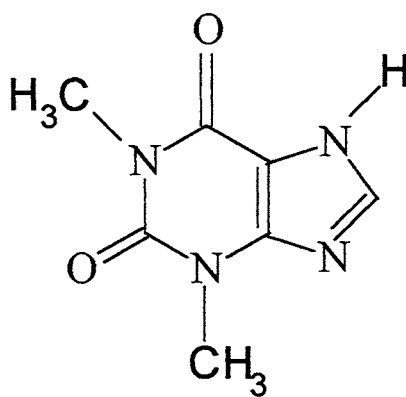
Influência das variáveis agrônômicas na composição mineral da erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Jacques, Rosângela Assis; Oliveira, Ana Paula de; Dariva, Cláudio; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de. In: **XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2004**, Recife.

11.3 Resumos em anais de eventos

- Preliminary studies of accelerated solvent extracts (ASE) of *Ilex paraguariensis*. Jacques, Rosângela Assis; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de; Caovilla, Marcela. **X COLACRO, 2004**, Campos do Jordão, SP.
- Determinação da composição química mineral da erva-mate de 6,12,18 e 24 meses. Jacques, Rosângela Assis; Oliveira, Ana Paula de; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de, **12° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2003**, São Luis-MA.
- Estudo preliminar da composição dos extratos de erva-mate obtidos por SFE. Jacques, Rosângela Assis; Dariva, Cláudio; Vecchia, Rafael Dalla; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de. **12° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2003**, v. 12, p. SE-73; São Luis-MA.
- Avaliação do conteúdo mineral da folha de erva-mate Jacques, Rosângela Assis; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de; Oliveira, Ana Paula **IX CONGRESSO CATARINENSE DE FARMACÊUTICOS E BIOQUÍMICOS**, Florianópolis 2002.
- Comparação de técnicas de extração (maceração, ultra-som e extração acelerada com solvente) no estudo dos compostos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*), Jacques, Rosângela Assis; Caramão, Elina Bastos; Oliveira, José Vladimir de; Oliveira, Ana Paula, Dariva, Cláudio; Freitas, Lisiane Santos **13° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 2005**, Niterói, RJ.

CAPÍTULO 12:

ANEXOS

ESTRUTURAS QUÍMICAS**12.1 - Estruturas das Metilxantinas****Cafeína****Teobromina****Teofilina**

12.2 - Derivatização

