

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

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

GIZELE SCOTTI DO CANTO

PORTO ALEGRE, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

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

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

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

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

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

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

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

CATÁLOGO NA PUBLICAÇÃO

C232a Canto, Gizele Scotti do

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

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

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

CDU: 615.4:547.9

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

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

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

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

**À minha filha Débora,
pelo amor.**

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

Eclesiástico, 38:5

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sobretudo.

Ao meu pai, pela presença de amor.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

LISTA DE ANEXOS

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

1. INTRODUÇÃO GERAL E RELEVÂNCIA DO TEMA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

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

Objetivos Específicos:

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

Capítulo 1

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

1.1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

1.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

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

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

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

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

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

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

1.2.1.1.1. Aspectos agronômicos e botânicos

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

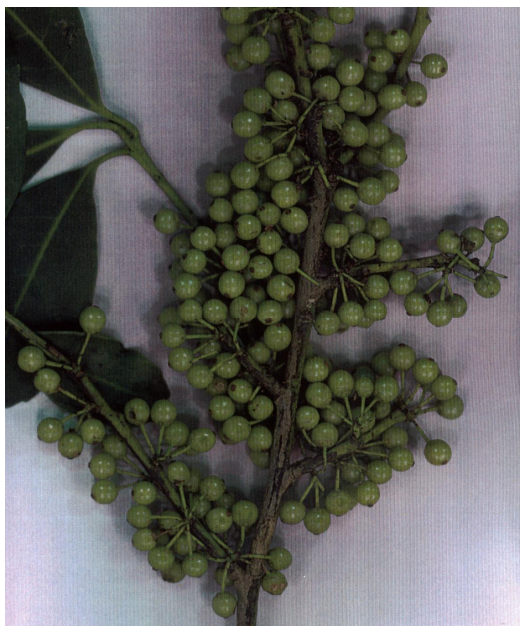


Figura 1. Frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

1.2.1.1.2. Aspectos fitoquímicos

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

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

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

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

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

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

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

1.2.1.1.2.1. Saponinas

1.2.1.1.2.1.1. Saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*

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

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

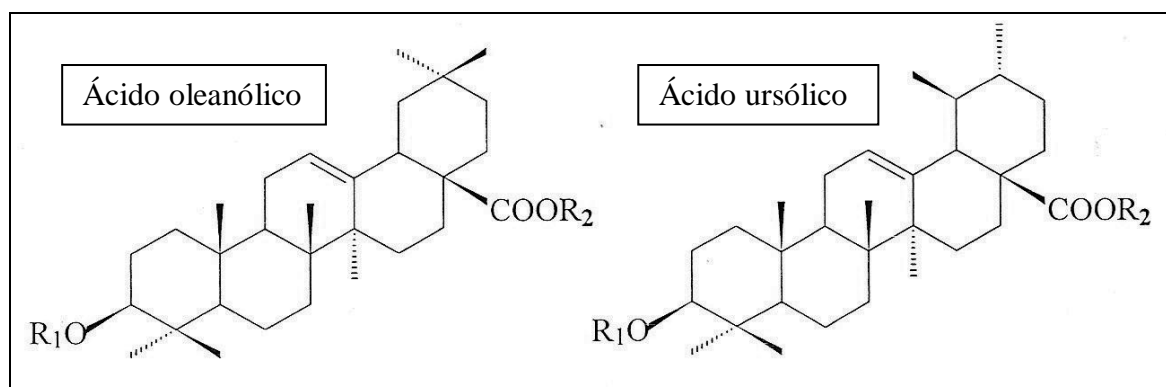


Figura 2. Agliconas das saponinas de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997).

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

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

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

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

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

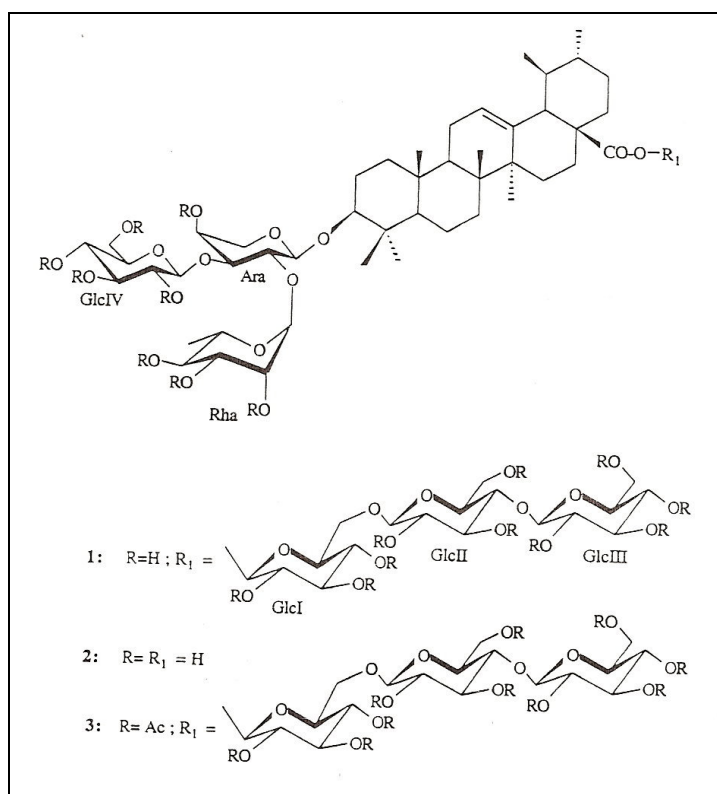


Figura 3. Estrutura da matessaponina-5 (KRAEMER, 1997).

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

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

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

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

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

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

1.2.1.1.2.1.2. Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis*

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

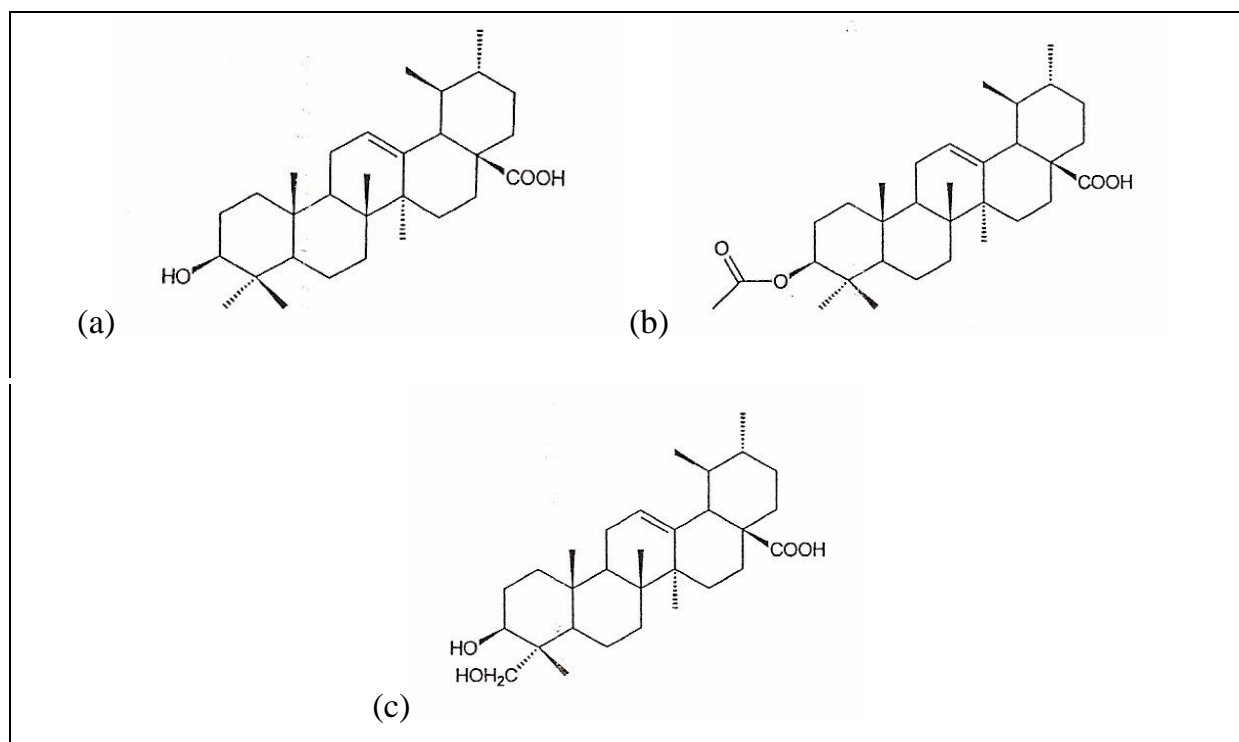


Figura 4. Estrutura química dos ácidos: (a) ursólico, (b) acetoxiursólico e (c) 23-hidroxursólico (TAKETA, 2001).

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

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

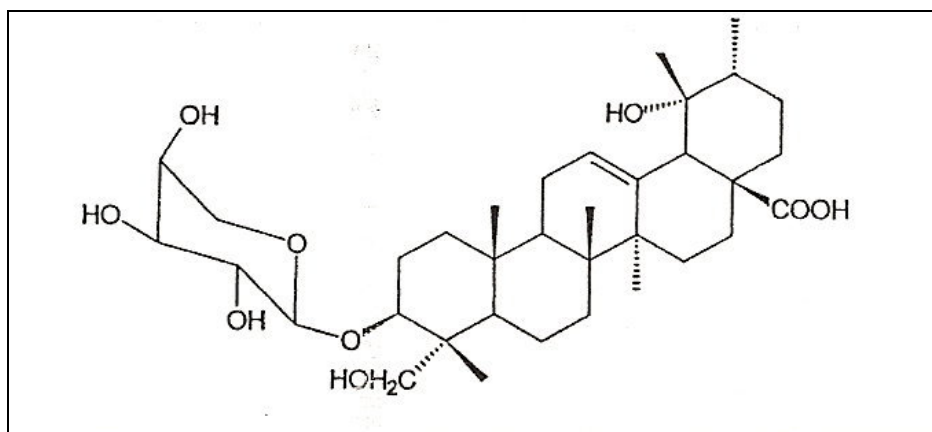


Figura 5. Estrutura do glicosídeo triterpênico matesídeo (TAKETA, 2001).

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

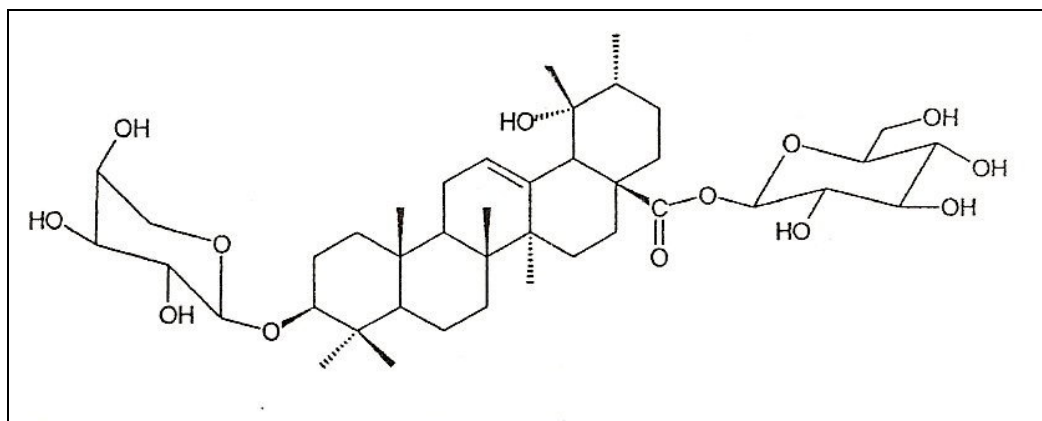


Figura 6. Estrutura do glicosídeo I-Ziyu dos frutos de *I. paraguariensis* (TAKETA, 2001).

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

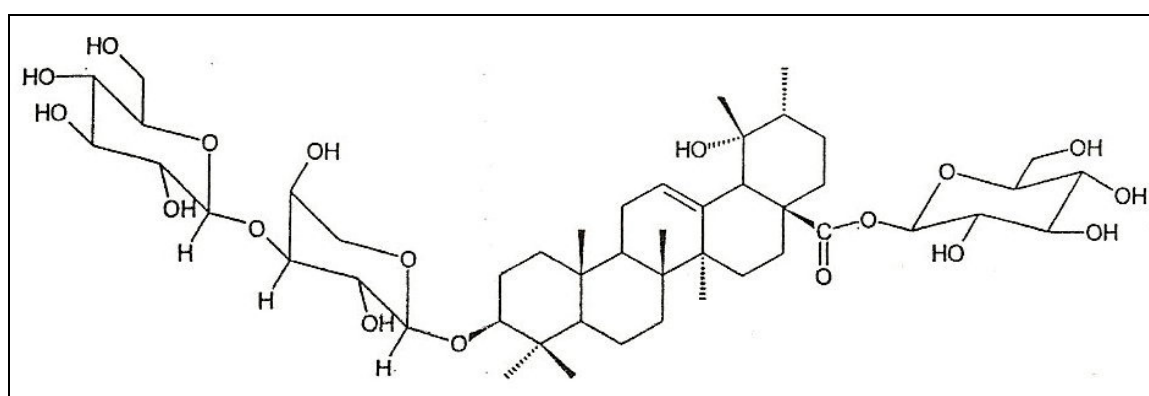


Figura 7. Estrutura do Ilexosídeo II dos frutos de *I. paraguariensis* (TAKETA, 2001)

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

1.2.1.1.3. Aspectos farmacológicos e toxicológicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

FARMACOPÉIA Brasileira, 2ª edição, 1959

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo 5

Avaliação do potencial de irritação cutânea das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

5.1. INTRODUÇÃO

Devido ao elevado número de produtos desenvolvidos para uso com o homem, muitos métodos *in vitro* têm sido desenvolvidos para a predição do potencial de irritação ocular e cutânea dos tensoativos (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

A irritação cutânea induzida por tensoativos apresenta várias manifestações, como *rash*-cutâneo, referido como eritema, descamação à formação de bolhas ou simplesmente a sensação de aspereza na pele, como também outras desordens cutâneas (MOORE *et al.*, 2003).

O interesse por tensoativos bio-compatíveis, visa minimizar as propriedades irritantes que os tensoativos sintéticos exercem na pele e tecidos. Deste modo, tensoativos suaves tendo açúcares ou unidades do tipo betaína como grupos polares, têm sido extensivamente usados em formulações dérmicas. Assim, os estudos orientados para otimizar o comportamento dos tensoativos obtidos de origem natural, demonstram, que as saponinas, são, extremamente promissoras (SARNTHEIN-GRAF e LA MESA, 2004).

5.2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os tensoativos aniônicos são extensivamente usados em medicamentos, formulações para a agricultura, em biotecnologia, cosméticos e em outros processos industriais, entretanto, o seu emprego está associado à presença de sintomas tóxicos nos organismos humano e animal, devido à modificações das estruturas protéicas e disfunção das enzimas, bem como alterações nas membranas fosfolipídicas. Estas

modificações estão associadas às interações por forças eletrostáticas entre o grupo polar carregado negativamente do tensoativo às subestruturas moleculares carregadas positivamente, como também, por forças hidrofóbicas com as partes apolares dos órgãos alvos, podendo, ocasionar, modificações da função biológica (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

A citotoxicidade dos tensoativos determinada sobre células epiteliais da córnea de coelhos, seguiu a seguinte ordem: catiônico > aniônico = anfotérico > não-iônico. Interessantemente, tensoativos não-iônicos foram capazes de reduzir o efeito danoso dos tensoativos aniônicos, no entanto, as bases moleculares deste fenômeno ainda não foram elucidadas (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

Para a avaliação do potencial de irritação cutânea, vários testes *in vivo* têm sido estabelecidos em testes de segurança (ZUANG *et al.*, 2000). O teste de irritação primária de Draize é um estudo de “*patch test*”, utilizado para prever se uma substância é capaz de fazer surgir uma reação inflamatória, após contato imediato ou prolongado, em pele intacta e escarificada de coelhos albinos (CHUDKOVSKI, 1980).

Em resposta à necessidade de alternativas para o teste de Draize, numerosos testes *in vitro* e *in vivo* têm sido empregados para a avaliação do grau de irritação cutânea de sistemas tensoativos. Entre os modelos *in vitro*, está o do tecido cutâneo EpiDermTM baseado em células da pele humana. Apesar destes sistemas apresentarem vantagens, não se tornam acessíveis devido ao alto custo. Testes de irritação cutânea *in vitro* têm sido desenvolvidos para medir o potencial de desnaturação proteica provocada por tensoativos, como o teste envolvendo medidas da quantidade de zeína, uma proteína do milho, insolúvel em água, a qual pode ser solubilizada pela adição de diferentes tipos de tensoativos, sendo o potencial de irritação cutânea correlacionado à capacidade destes tensoativos em dissolvê-la (MOORE *et al.*, 2003).

O método de solubilização da zeína é particularmente apropriado para classificar o potencial de irritação cutânea dos tensoativos aniônicos, uma vez que estes tensoativos são fortemente solubilizadores da zeína, enquanto que os tensoativos anfotéricos (zwitteriônicos) e não-iônicos dissolvem pouco ou não dissolvem a zeína. Isto também é consistente com a baixa capacidade de desnaturação proteica dos

tensoativos anfotéricos e não-iônicos para vários outros sistemas proteicos, como a proteína sérica bovina, ovalbumina, lisósima, citocromo C e a enzima lisolecitina fosfolipidase (MOORE *et al.*, 2003).

Técnicas não-invasivas também têm sido usadas para a avaliação do potencial de irritação cutânea, como a velocimetria por Laser Doppler, evaporimetria, cromametria e corneometria. Entre estas, apenas a velocimetria por Laser Doppler e evaporimetria têm sido bons discriminadores entre as substâncias irritantes e não-irritantes, pois detectam estágios iniciais no desenvolvimento de uma reação irritante, antes de se tornarem visíveis. Assim, as medidas não-invasivas podem melhorar a qualidade e relevância dos dados obtidos pelos testes de irritação em pele humana, uma vez que os resultados são objetivos, quantitativos e algumas vezes sub-clínicos (ZUANG *et al.*, 2000). Entretanto, apesar do emprego de outros modelos de avaliação do grau de irritação cutânea aplicado à tensoativos, o epicutâneo *patch test*, incluindo o tradicional *score* clínico das reações cutâneas, ainda permanece como padrão-ouro para determinar a segurança dos produtos de uso pessoal (HALL-MANNING, *et al.*, 1998, ZUANG *et al.*, 2000).

Assim, este Capítulo tem como objetivo, avaliar o potencial de irritação cutânea das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis*, através do teste de irritação primária dérmica de Draize. Para esta avaliação, será utilizado o extrato bruto e produtos purificados, representados pela fração 70 (Fr. 70) e pelo extrato P6, frente a um controle positivo.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. MATERIAL

5.3.1.1. Substâncias e Reagentes

Laurilsulfato de sódio (Merck®); Extrato bruto liofilizado (EXL), Fração purificada (Fr. 70) e Extrato purificado P6 (P6) dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.

5.3.1.2. Equipamentos e materiais diversos

Balança analítica SARTORIUS, agulhas hipodérmicas, depilador GILLETTE, algodão hidrófilo, tesoura, seringa plástica, gaze estéril, esparadrapo, tricotomizador, gaiolas.

5.3.1.3. Animais de laboratório

Coelhos albinos machos, pesando entre 200 e 300 g.

5.3.2. MÉTODOS

5.3.2.1 Avaliação do grau de irritação primária dérmica (Draize, 1944)

5.3.2.1.1. Preparo da amostra

Para a avaliação da irritação dérmica primária foram preparadas soluções a 1,0% de extrato bruto liofilizado (EXL), Fração 70 (Fr. 70), extrato purificado (P6) e como controle positivo, o tensoativo aniônico, laurilsulfato de sódio (LSS).

5.3.2.1.2. Descrição do método

Para cada amostra foram utilizados seis coelhos machos albinos, pesando entre 2 e 3 kg, mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso à ração e água, à temperatura entre 18 e 24 °C e umidade relativa na faixa de 40 a 60%.

O grau de irritação foi avaliado pela técnica do *patches test*, em pele íntegra e escarificada. No dorso de cada animal foi delimitada uma área em torno de 36 cm², as quais foram depiladas e divididas em quatro áreas. Após 24 horas, duas destas áreas foram escarificadas e aplicado imediatamente a seguir, 0,5 ml da solução teste em uma área íntegra e em outra escarificada, mantendo as restantes como controle. A seguir, as áreas foram cobertas com gaze estéril e cobertas com gaze e esparadrapo. Após 24 horas de contato com o produto, os *patches* foram removidos e as reações de eritema e edema foram avaliadas primeiro qualitativamente e após quantitativamente segundo um sistema de escala pré-definido. Os animais permaneceram sem os *patches* por mais 48 horas, sendo realizada nova avaliação das reações de eritema e edema. O tempo total de contato do produto com a pele foi, portanto, de 72 horas. Os resultados foram expressos pela média de 6 determinações.

5.3.2.1.3. Avaliação das reações da pele

Para a avaliação do grau da irritação dérmica, foi determinado individualmente o grau de formação de eritema, de crosta e de edema nas peles íntegra e escarificada dos animais, 24 e 72 horas após a aplicação da amostra.

A escala numérica do grau de eritema e formação de crostas, para o teste de irritação primária de Draize, bem como a classificação do grau de formação de edema estão apresentadas nas Tabelas 27 e 28, respectivamente.

Tabela 27. Classificação do grau de eritema e formação de crosta do ensaio de irritação primária dérmica de Draize

Eritema e Formação de crosta	
Sem eritema.....	0
Eritema muito escasso (claramente perceptível)	1
Eritema moderado (bem definido)	2
Eritema moderadamente severo.....	3
Eritema severo (rubor roxo) formação de crostas	

(lesões profundas)	4
Escore Edema, possibilidade total	4

Tabela 28. Classificação do grau de formação de edema para avaliação do grau de irritação primária dérmica de Draize.

Formação de Edema	
Edema ausente.....	0
Edema leve (0,25 mm e 0,49 mm).....	1
Edema moderado (0,5 mm e 0,74 mm).....	2
Edema definido (0,75 mm e 1mm).....	3
Edema severo (> 1 mm).....	4
Escore Edema, possibilidade total.....	4

5.3.2.1.4. Determinação do Índice de irritação primária dérmica

O valor médio para o grau de eritema e formação de crostas nas 24 e 72 horas nas peles intacta e escarificada, foram somados aos valores médios para a formação de edema nas 24 e 72 horas para pele intacta e escarificada. A soma das médias (SM) foi dividido por 4 (SM/4) para termos, então, o escore da irritação primária.

Os critérios de classificação, conforme o valor do índice de irritação, estão demonstrados na Tabela 29.

Tabela 29. Índice de irritação primária dérmica para o teste de Draize.

Índice de irritação primária	Avaliação
0	Não irritante
0,042 – 2,0	Suave
2,01 – 5,0	Moderado
> 5,01	Severo

5.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1. Determinação do grau de reação cutânea das soluções tensoativas

Os resultados do grau de eritema, formação de crostas e edema, desenvolvidos em 24 e 72 horas, nas peles íntegra e escarificada para o LSS, EXL, Fr. 70 e extrato P6, estão apresentados nas Tabelas 30 a 37.

Tabela 30. Grau de eritema e formação de crosta, para a solução de LSS a 1,0%

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	1	0	0	0	0	0	0,166
	72	1	0	1	0	0	0	0,333
Escarificada	24	1	1	1	0	0	1	0,666
	72	1	0	1	0	0	0	0,333
Sub-total								1,498

Tabela 31. Grau de formação edema para a solução de LSS a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n°)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								1,498
Índice de irritação (SM/4)								0,3745

Tabela 32. Grau de eritema e formação de crosta para a solução EXL a 1,0%

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	1	0,166
Sub-total								0,166

Tabela 33. Grau de formação de edema para a solução de EXL a 1,0%

Edema			
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n°)	

	(horas)	1	2	3	4	5	6	Média
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0,166
Índice de Irritação (SM/4)								0,0415

Tabela 34. Grau de eritema e formação de crosta da solução da Fr. 70 a 1,0%.

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0

Tabela 35. Grau de formação de edema para a solução da Fr. 70 a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0

Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0
Índice de Irritação (SM/4)								0

Tabela 36. Grau de eritema e formação de crosta da solução de extrato P6 a 1,0%.

Eritema e Formação de crosta								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (n)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Escarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0

Tabela 37. Grau de formação de edema para a solução de extrato P6 a 1,0%

Edema								
Pele	Leitura (horas)	Coelho (nº)						Média
		1	2	3	4	5	6	
Íntegra	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0

Éscarificada	24	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0
Sub-total								0
Soma das médias (SM)								0
Índice de irritação (SM/4)								0

A avaliação visual após 72 horas da aplicação de 0,5 ml das soluções tensoativas de LSS, EXL, Fr. 70 e extrato P6 à 1,0% nas peles íntegra e escarificada, estão demonstradas na Figura 60.

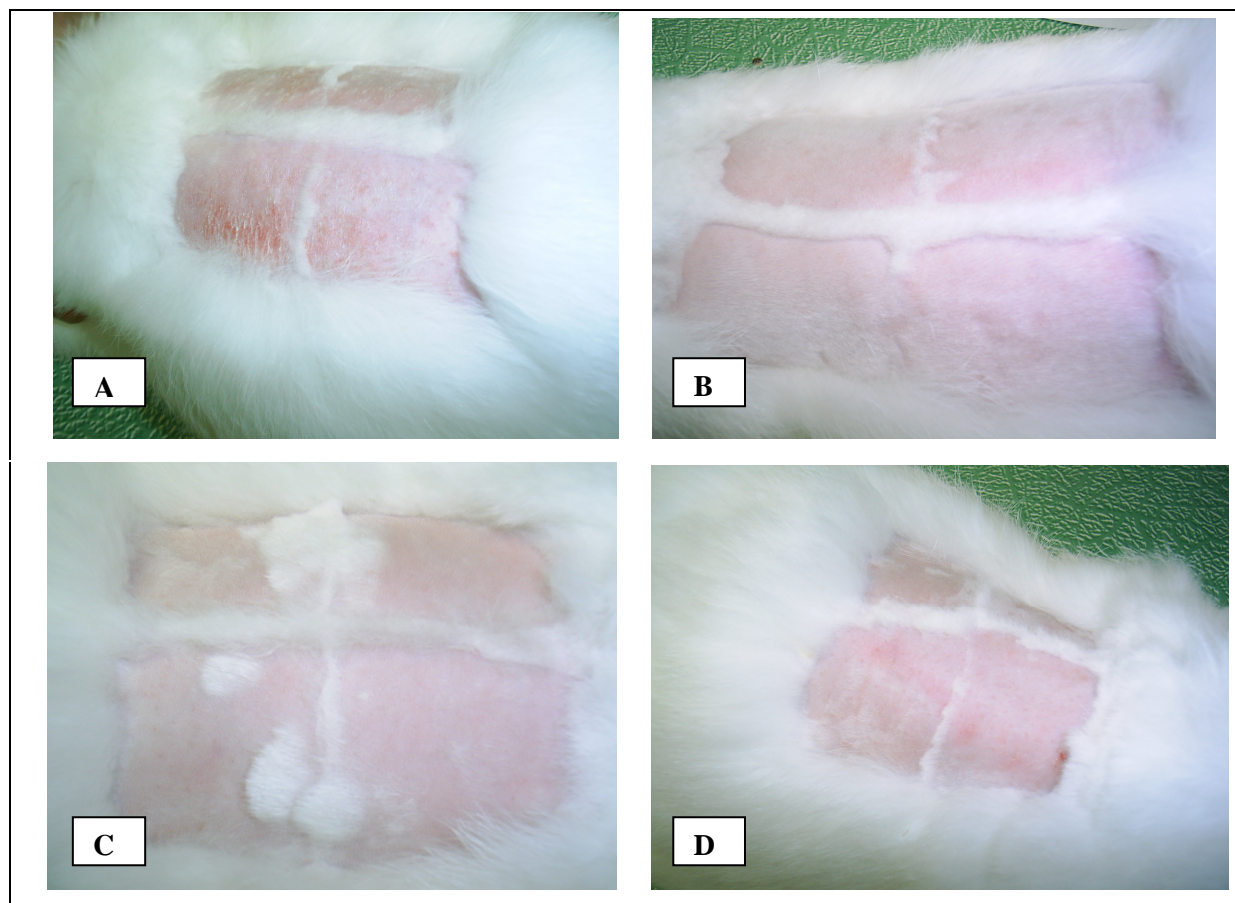


Figura 60. Aspecto das peles íntegra e escarificada após 72 horas da aplicação das soluções tensoativas de LSS (A), EXL (B), Fr. 70 (C) e extrato P6 (D).

O resultado do índice de irritação primária dérmica apresentado pelos tensoativos, está demonstrado na Tabela 38.

Tabela 38. Índices de irritação primária dérmica de Draize para as soluções de LSS, EXL, Fr. 70 e P6 a 1,0%.

Solução tensoativa (1,0%)	Índice de irritação primária dérmica	Avaliação
LSS	0,3745	Suave
EXL	0,0415	Não irritante
Fr. 70	0	Não irritante
P6	0	Não irritante

A escolha da concentração de 1,0% para a preparação das soluções tensoativas, foi baseada nos respectivos valores da concentração micelar crítica das substâncias a serem analisados, a fim de trabalhar com valores dentro de uma faixa de segurança acima da CMC dos tensoativos, bem como ter uma concentração mais elevada de substância em contato com a pele, passível de desenvolver alguma reação cutânea.

Pela análise dos resultados, observou-se que o laurilsulfato de sódio, desenvolveu um leve eritema observado nas primeiras 24 horas de exposição ao

produto, porém, somente na pele escarificada. No entanto, 48 horas após, observou-se uma evolução do processo de irritação cutânea, representado pela formação de crostas.

Para o EXL, após 24 horas de contato com a solução, observou-se um levíssimo grau de eritema, mas somente na pele escarificada, o qual desapareceu totalmente em 48 horas. Este leve eritema foi detectado em apenas um dos seis animais expostos ao produto.

Quanto aos produtos purificados não foi observado qualitativamente nenhum grau de interação cutânea. A Fr, 70 como o extrato P6, tanto em 24 e 72 horas, nas peles íntegra e escarificada, não apresentaram após a retirada dos *patches*, nenhuma manifestação visual de alteração cutânea, representado pela ausência de eritema, formação de crostas e edema. Observou-se, também, que as peles tanto íntegra como escarificada, apresentaram uma melhor textura e aspecto nas 72 horas após a aplicação das amostras em relação aos controles.

Com o processo de escarificação, partes do estrato córneo são removidas, o que potencializa a ação em relação à pele intacta. Este fato, foi observado experimentalmente com o laurilsulfato de sódio, o qual é considerado um tensoativo severo em termos de irritação cutânea, sendo, por isso, empregado como controle positivo nas avaliações do potencial de irritação cutânea aguda provocada por tensoativos (HALL-MANNING *et al.*, 1998).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a irritação cutânea induzida por tensoativos, incluindo a solubilização dos lipídeos da pele, o rompimento das bicamadas lipídicas do estrato córneo e a desnaturação proteica (MOORE *et al.*, 2003). Entre estes, observou-se que o evento crítico, resulta da ligação dos tensoativos às proteínas cutâneas como a queratina dos corneócitos no estrato córneo, seguido pela desnaturação destas, existindo freqüentemente, uma correlação direta entre a habilidade de um tensoativo para desnaturar a proteína com o seu potencial de irritação cutânea. Assim, o grau de desnaturação proteica está relacionado à diferentes manifestações de irritação cutânea *in vivo*, incluindo eritema (vermelhidão e inflamação na pele), alterações nas propriedades barreira do estrato córneo, o que ocasiona um aumento da taxa da perda de água transepidérmica (TWEL), levando ao ressecamento e rachadura na pele (MOORE *et al.*, 2003).

A dependência do potencial de irritação cutânea dos tensoativos aniônicos sobre a estrutura molecular é bem estabelecida. Os resultados indicam que o comprimento da cadeia alquila dos alquil sulfatos de sódio têm um considerável impacto no seu potencial de irritação cutânea. Assim, os compostos com C₁₈ causam dano celular, enquanto os compostos com C₁₀ e C₁₆ causam mais severa destruição da membrana e desnaturação proteica. O lauril sulfato de sódio (LSS) causa mais severa desidratação cutânea que o brometo de dodecil trimetil amônio, sendo o completo restabelecimento da reação irritante foi obtida 17 dias após a exposição do tensoativo (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

O teste de toxicidade cutânea dos tensoativos em queratinócitos normais humanos, avaliado pela citotoxicidade, liberação de ácido araquidônico e regulação da interleucina-1 α mRNA, revelou que o efeito do SDS foi maior que dos tensoativos não-iônicos Triton X-100 e Tween-20. Um estudo quantitativo da relação estrutura-atividade (QSAR), revelou que a capacidade de hidratação dos *n*-alquil sulfatos foi estreitamente correlacionada com o potencial irritacional, sendo um máximo encontrado em análogo do C₁₂ (CSERHÁTI *et al.*, 2002).

O grau de interação do LSS com o extrato córneo, foi avaliado através de medidas da condutividade da pele *in vitro*, demonstrando que o aumento da concentração de LSS, produz um aumento da condutividade da pele, uma vez que os íons atravessam a pele por canais similares aos da água (MOORE *et al.*, 2003), e que em misturas de sistemas tensoativos, o tensoativo individual exibe menos afinidade para esta proteína. As micelas dos tensoativo interagem com os lipídeos, os quais formam um empacotamento entre as escamas, proporcionando um sítio de entrada para mais tensoativo, os quais, iniciarão então, o processo de desnaturação proteica. Este estágio, parece requerer um determinado tipo de micela de tensoativo para possibilitar os lipídeos à formarem uma micela mista com o(s) tensoativo(s), sendo esta provavelmente, a área onde diferenças em relação a irritação são manifestadas para as misturas de tensoativos (HALL-MANNING *et al.*, 1998). Neste sentido, a investigação da adição de tensoativos não-iônicos (C₁₂E₈) à soluções de LSS, revelaram uma diminuição na habilidade do LSS para solubilizar a proteína zeína, devido à uma repulsão estérica entre a proteína e as micelas mistas de LSS/ C₁₂E₈ que

complexam com a proteína, reduzindo, assim as forças de interação do complexo proteína-tensoativo, levando à uma diminuição na capacidade de solubilização da proteína pela solução tensoativa, com consequente redução do potencial de irritação cutânea (MOORE *et al.*, 2003).

Quanto ao extrato bruto e os produtos purificados não foi observado qualitativamente nenhum grau de interação cutânea. Apesar do extrato bruto apresentar uma composição mais complexa, contendo além de saponinas, outros compostos de forma associada, poderia explicar um maior potencial de interação à nível cutâneo, em relação aos produtos purificados, representados pela Fr. 70 e o extrato P6. No entanto, através do processo de fracionamento do extrato bruto, obteve-se produtos com uma maior concentração em saponinas, e um menor índice de interferentes em relação ao extrato bruto. Neste sentido, à aplicação das soluções da Fr. 70 e do extrato P6, apresentam, teores muito mais elevados em saponinas, comparado ao extrato bruto à mesma concentração.

Devido a semelhança de composição química em termos de saponinas entre os extratos de folhas e de frutos de *Ilex paraguariensis* (KRAEMER, 1997; ATHAYDE, 2000), sugere-se, também, para as saponinas dos frutos, um comportamento semelhante ao atribuído à uma fração de saponinas obtida das folhas de *Ilex paraguariensis* em relação a presença de atividade antiedematogênica como descrito por MONTANHA (1990).

A ausência de propriedades hemolíticas, para as saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis*, verificado por GOSMANN (1989), contribuem, também, para uma menor citotoxicidade destes glicosídeos.

Deste modo, pelos resultados da avaliação do grau de irritação primária dérmica de Draize, podemos concluir, que a associação de teores mais elevados de saponinas presentes nos produtos purificados e a ausência de manifestações de interação à nível cutâneo, confere às saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, a possibilidade de emprego em formulações de uso tópico.

5.5. REFERÊNCIAS:

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

CHUDKOVSKI, M. The Draize Primary Irritation Test. **BPSOP**, 13, p. 1-13, 1980.

Division of Chemistry and Chemical Technology, National Academy of Sciences – National Research Council, Publication 1138, p.9, 26-27, 1964.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; OROS, G. – Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. **Environment International**, v. 28, p. 337-348, 2002.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. – Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmac. Exp. Therapy**. 82: 377 –390, 1944.

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

HALL-MANNING, T. J.; HOLLAND, G. H.; RENNIE, G.; REVELL, P.; HINES, J.; BARRATT, M. D.; BASKETTER, D. A. Skin irritation potential of mixed surfactant systems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 233-238, 1998.

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

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

MOORE, P. N.; PUVVADA, S.; BLANKSCHTEIN, D. Role of the surfactant polar head structure in protein-surfactant complexation: zein protein solubilization by SDS/C₁₂E_n surfactant solutions. **Langmuir**, v. 19, p. 1009-1016, 2003.

SARNTHEIN-GRAF, C.; LA MESA, C. Association of saponins in water and water-gelatine mixtures. **Thermochemica Acta**, v. 418, p. 79-84, 2004.

WIGGER-ALBERTI, W.; KESKIN, M.; FEISTKORN, G.; WILHELM, K. P. Non-invasive assessment of patch test reactins due to hair dyes with the laser Doppler perfusion scanning technique. **6th Congress of the European Society of Contact dermatitis, Rome, Italy, 2002**.

ZUANG, V.; RONA, C.; ARCHER, G.; BERADESCA, E. Detection of skin irritation potential of cosmetics by non-invasive measurements. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 13, p. 358-371, 2000.

Conclusões Finais

- O método cromatográfico proposto por CLAE em sistema gradiente, permitiu a obtenção de um perfil cromatográfico para o EXL dos frutos imaturos, abrangendo uma faixa de polaridade, na qual se encontram as algumas das principais saponinas descritas para *Ilex paraguariensis*.
- As etapas de transformação tecnológica da matéria-prima vegetal, como o processo de extração e liofilização do extrato bruto, não produziram alterações detectáveis na composição química das saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* avaliada através dos perfis cromatográficos por CCD e CLAE.
- Os métodos de purificação do EXL se mostraram eficientes e reprodutíveis na obtenção de produtos ricos em saponinas e sem alterações químicas detectáveis
- O método I (fracionamento em coluna) apresentou a vantagem do fracionamento do EXL, permitindo a obtenção concomitante de uma fração polifenólica e de uma fração saponosídica bem caracterizadas.

- O método II (contato direto com polímero), desenvolvido neste trabalho, permitiu a obtenção de um único produto purificado rico em saponinas, com a vantagem em relação ao método I, da rapidez do processo, menor custo e exclusão total de solventes orgânicos, o que o torna um método viável do ponto de vista tecnológico e ambiental.
- As espumas produzidas pelo EXL e Fr. 7090 apresentaram um processo de drenagem mais lento comparado aos tensoativos sintéticos, sendo atribuído à maior viscosidade de cisalhamento superficial dos filmes superficiais das saponinas.
- A Fr. 7090 apresentou um potencial de espumabilidade semelhante ao tensoativo aniônico.
- As espumas das saponinas apresentaram um perfil de estabilidade semelhante aos tensoativos não-iônicos, porém com uma maior tendência a estabilização do processo com o tempo.
- A adição de eletrólitos influenciou negativamente os perfis espumógenos e de estabilidade das espumas das saponinas.
- O diâmetro das micelas não apresentou influência sobre o comportamento espumógeno das saponinas, contudo apresentaram característica nos testes de espalhamento da luz que sugerem a formação de estruturas supra-micelares.
- As espumas das saponinas apresentaram uma resistência superior à observada para tensoativos sintéticos, porém, somente à 25 CMC.
- A espuma obtida com EXL apresentou pela análise bidimensional uma menor alteração da forma e número de bolhas de ar com o tempo, comparado à espuma de LSS. A concordância dos valores obtidos com os testes de espumabilidade e estabilidade das espumas indica tratar-se de um teste capaz de proporcionar informações autênticas da evolução estrutural das espumas

- O EXL, Fr. 70 e P6 foram classificados como produtos não-irritantes mediante o teste *in vivo* de irritação dérmica primária de Draize.
- O elevado potencial espumógeno das saponinas, aliado ao seu caráter não-iônico e de baixa toxicidade cutânea, fazem das saponinas dos frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*, uma alternativa promissora como agente espumógeno de origem natural e renovável.

Anexos

Tabela A1. Distribuição granulométrica geral da matéria-prima vegetal, frutos imaturos de *Ilex paraguariensis*.

FG (mm)	AM (MM)	F (%)	FR (%)	FP (%)
1,000 – 0,800	0,900	10,5	10,5	89,5
0,800 – 0,635	0,717	20,3	30,8	69,2
0,635 – 0,315	0,475	45,5	76,3	23,7
0,315 – 0,200	0,257	17,5	93,8	6,2
0,200 – 0,125	0,162	3,2	97,0	3,0
0,125 – 0,063	0,094	2,8	99,8	0,2
0,063 – 0,0	0,0315	0,2	100	0
Total		100,0		

FG = faixa granulométrica; AM = abertura média de malha; F = frequência relativa
FR = fração retida; FP = fração de passagem.

Tabelas A2: Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração de LSS.

Concentração [g/L]	Concentração Molar [mM]	Ln C [mM]	γ [mN m⁻¹] ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,0173	-4,0570	70,0 \pm 0,0
0,01	0,0346	-3,3639	70,0 \pm 0,0
0,02	0,0693	-2,66930	70,0 \pm 0,0
0,05	0,1733	-1,7527	70,0 \pm 0,0
0,1	0,3467	-1,0592	66,6 \pm 0,57
0,2	0,6935	-0,3660	64,0 \pm 1,0
0,3	1,0402	0,0394	60,0 \pm 0,28
0,5	0,7338	0,5503	52,1 \pm 0,28
1,0	3,4676	1,2434	46,5 \pm 0,86
5,0	17,3382	2,8529	39,4 \pm 1,60
10,0	34,6764	3,5460	36,8 \pm 0,78
20,0	69,3529	4,2392	37,8 \pm 0,76

Tabelas A3: Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração
 Poli. 80

Concentração [g/L]	Concentração Molar [mM]	Ln C [mM]	γ [mN m⁻¹] ($\bar{X} \pm s$)
0,001	0,0007	-7,2644	65,60 \pm 1,52
0,005	0,0038	-5,5727	58,00 \pm 1,0
0,01	0,0076	-4,8796	52,30 \pm 1,25
0,02	0,0152	-4,1864	51,16 \pm 1,25
0,05	0,0381	-3,2675	47,43 \pm 1,52
0,1	0,0763	-2,5730	46,50 \pm 1,32
0,2	0,1526	-1,8799	44,33 \pm 0,57
0,3	0,2290	-1,4740	43,16 \pm 1,89
1,0	0,7633	-0,2701	43,33 \pm 2,08

Tabela A4. Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração
 para o Extrato bruto.

--	--	--	--

Concentração (g/L)	Concentração Molar [mM]	Ln [mM]	γ (mN/m) ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,0051	-5,2785	69,5 \pm 0,50
0,01	0,0103	-4,5756	65,3 \pm 0,57
0,02	0,0206	-3,8824	63,6 \pm 1,52
0,05	0,0517	-2,9622	57,8 \pm 1,60
0,1	0,1034	-2,2691	56,5 \pm 1,80
0,2	0,2069	-1,5755	53,3 \pm 0,70
0,5	0,5173	-0,6591	55,3 \pm 0,57
1,0	1,0347	0,0341	55,5 \pm 0,50

* Concentração molar expressa como matessaponina-1 (MM 996,45)

Tabela A5. Valores do abaixamento da tensão superficial em função da concentração para a Fração 7090.

Concentração (g/L)	Concentração Molar [mM]	Ln [Mm]	γ (mN/m) ($\bar{X} \pm s$)
0,005	0,005017	-5,2949	63,90 \pm 0,17
0,01	0,010035	-4,6016	63,73 \pm 0,25
0,02	0,020071	-3,9084	58,33 \pm 0,57
0,05	0,050178	-2,9921	55,36 \pm 0,28
0,1	0,100356	-2,2990	52,50 \pm 0,50
0,2	0,200712	-1,6058	48,66 \pm 0,28
1,0	1,003562	0,0035	49,16 \pm 2,75

* Concentração molar expressa como matessaponina-1 (MM 996,45)

Tabela A6. Perfil de drenagem da solução de Polissorbato 80 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Poli. 80	0	0,90 ± 0,06	8,57	42,85	57,15
	1	1,70 ± 0,05	16,19	80,95	19,05
	5	1,88 ± 0,02	17,90	89,5	10,5
	10	1,88 ± 0,02	17,90	89,5	10,5
	30	1,90 ± 0,0	18,0	90,0	10,0
	60	1,92 ± 0,04	18,28	91,40	8,6
Poli.80/ NaCl	0	0,9 ± 0,14	8,57	42,85	57,15
	1	1,65 ± 0,07	15,71	78,55	21,45
	5	1,82 ± 0,03	17,33	86,65	13,35
	10	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	30	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15

Poli.80/ KBr	0	0,8 ± 0,56	7,61	38,05	61,95
	1	1,60 ± 0,14	15,23	76,15	23,85
	5	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95
	10	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	30	1,87 ± 0,03	17,80	89,00	11,0
	60	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
I Poli. 80/ KNO₃	0	0,7 ± 0,49	6,66	33,3	66,7
	1	1,60 ± 0,07	15,23	76,15	23,85
	5	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	10	1,85 ± 0,10	17,61	88,05	11,95
	30	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,55
	60	1,95 ± 0,03	18,57	92,85	7,15
P Poli. 80/ MgCl₂	0	1,4 ± 0,96	13,33	66,65	33,35
	1	1,85 ± 0,20	17,61	88,05	11,95
	5	1,92 ± 0,10	18,28	91,4	8,6
	10	1,92 ± 0,10	18,28	91,4	8,6
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
Poli. 80/ Na₂HPO₄	0	0,95 ± 0,5	9,04	45,2	54,8
	1	1,67 ± 0,17	15,90	79,5	20,5

Poli.80 /Na₂HPO₄	5	1,90 ± 0,1	18,09	90,45	9,55
	10	1,92 ± 0,07	18,28	91,40	8,6
	30	1,92 ± 0,05	18,28	91,40	8,6
	60	1,97 ± 0,05	18,76	93,8	6,2

- 20 ml solução tensoativa = 2,1 cm na coluna = 100% de drenagem

Tabela A7. Perfil de drenagem da solução de Lauril sulfato de sódio (10 CMC) e à presença de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL(%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
LSS	0	0,9 ± 0,56	8,57	42,85	57,15
	1	1,6 ± 0,14	15,23	76,15	23,85
	5	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	10	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
LSS/ NaCl	0	0,77 ± 0,05	7,33	36,65	63,35
	1	1,55 ± 0,057	14,76	73,75	26,25
	5	1,87 ± 0,044	17,80	89,00	11,0
	10	1,89 ± 0,054	18,00	90,00	10,0
	30	1,93 ± 0,067	18,38	91,90	8,10
	60	1,97 ± 0,044	18,76	93,80	6,20

LSS/ KBr	0	0,50 ± 0,17	4,76	23,8	76,20
	1	1,53 ± 0,057	14,57	72,85	27,15
	5	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	10	1,91 ± 0,028	18,19	90,95	9,05
	30	1,98 ± 0,028	18,85	94,25	5,75
	60	2,03 ± 0,057	19,33	96,65	3,35

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm) (X ± s)	Volume de líquido na coluna (VL) (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
1 LSS/ 3 KNO ₃	0	0,95 ± 0,21	9,04	45,2	54,80
	1	1,60 ± 0,07	15,23	76,15	23,85
	5	1,9 ± 0,035	18,28	91,40	8,60
	10	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	30	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,20
	60	2,00 ± 0,0	19,04	95,20	4,80
1 LSS/ 2 MgCl ₂	0	1,00 ± 0,14	9,52	47,6	52,40
	1	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	5	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	10	1,92 ± 0,03	18,28	91,40	8,60
	30	1,95 ± 0,07	18,57	92,85	7,15
	60	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,20
	0	0,10 ± 0,28	0,95	4,75	95,25
	1	1,40 ± 0,14	13,33	66,65	33,35

LSS/Na₂HPO₄	5	1,80 ± 0,03	17,14	85,70	14,3
	10	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95
	30	1,85 ± 0,0	17,61	88,05	11,95

Tabela A8. Perfil de drenagem da solução do Extrato bruto (10 CMC) e à presença de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
EXL	0	0,15 ± 0,21	1,42	7,1	92,90
	1	1,1 ± 0,14	10,47	52,35	47,65
	5	1,67 ± 0,03	15,9	79,5	20,5
	10	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	30	1,82 ± 0,03	17,33	86,65	13,35
	60	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	12,00
EXL/ NaCl	0	0,0 ± 0,0	0,0	0,0	100,0
	1	1,05 ± 0,07	10,0	50,0	50,0
	5	1,67 ± 0,03	15,90	79,5	20,5
	10	1,80 ± 0,0	17,14	85,7	14,3
	30	1,87 ± 0,02	17,0	89,0	11,0
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

EXL/ KBr	0	0,4 ± 0,14	3,80	19,0	81,0
	1	1,35 ± 0,21	12,85	64,25	35,75
	5	1,80 ± 0,14	17,14	85,7	14,3
	10	1,82 ± 0,10	17,33	86,65	13,35
	30	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
EXB/KNO₃ EXL/ KNO₃	0	0,1 ± 0,28	0,95	4,75	95,25
	1	0,95 ± 0,21	9,04	45,2	54,8
	5	1,50 ± 0,07	14,28	71,4	28,6
	10	1,70 ± 0,03	16,19	80,95	19,05
	30	1,82 ± 0,0	17,33	86,65	13,35
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
EXB/MgCl₂ EXL/ MgCl₂	0	0,75 ± 0,07	7,14	35,7	64,3
	1	1,5 ± 0,0	14,28	71,4	28,6
	5	1,92 ± 0,03	18,28	91,4	8,6
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	30	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8

EXB/Na₂HPO₄ EXL/Na₂HPO₄	0	0,35 ± 0,28	3,33	16,65	83,3
	1	1,45 ± 0,14	13,8	69,0	31,0
	5	1,90 ± 0,03	18,09	90,45	9,5
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,15
	30	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	60	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

Tabela A9. Perfil de drenagem da Fração 7090 (10 CMC) e sob a influência de eletrólitos.

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Fr. 7090	0	0,08 ± 0,13	0,76	3,80	96,2
	1	1,06 ± 0,08	10,09	50,45	49,5
	5	1,61 ± 0,06	15,33	76,65	23,3
	10	1,65 ± 0,05	15,71	78,55	21,4
	30	1,72 ± 0,06	16,38	81,9	18,1
	60	1,78 ± 0,08	16,95	84,75	15,2
Fr.7090/ I NaCl	0	0,1 ± 0,0	0,95	4,75	95,2
	1	1,2 ± 0,0	11,42	57,1	42,9
	5	1,79 ± 0,01	17,04	85,20	14,8
	10	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,5
	30	1,97 ± 0,03	18,76	93,80	6,2
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
	0	0 ± 0,0	0,0	0,0	100,0

Fr. 7090/ KBr 1	1	1,0 ± 0,0	9,52	47,60	52,40
	5	1,75 ± 0,0	16,66	83,30	16,70
	10	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	30	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55
	60	1,90 ± 0,0	18,09	90,45	9,55

Sol. tensoativa / eletrólitos	Tempo (min)	Altura do líquido na coluna (cm)	Volume de líquido na coluna VL (ml)	Σ VL (%)	Volume de líquido na espuma (VLE) (%)
Fr. 7090/ F KNO₃ 3	0	0,05 ± 0,07	0,47	2,35	97,65
	1	1,27 ± 0,03	12,09	60,45	39,55
	5	1,70 ± 0,0	16,19	80,95	19,05
	10	1,85 ± 0,07	17,61	88,05	11,95
	30	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,20	4,8
Fr. 7090/ 1 MgCl₂ 2	0	0,35 ± 0,07	3,33	16,65	83,3
	1	1,25 ± 0,07	11,9	59,5	40,5
	5	1,90 ± 0,07	18,09	90,45	9,5
	10	1,95 ± 0,0	18,57	92,85	7,1
	30	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8
	60	2,0 ± 0,0	19,04	95,2	4,8
Fr. 7090/ Na₂HPO₄	0	0,2 ± 0,28	1,90	9,5	90,5
	1	1,37 ± 0,24	13,04	65,2	34,8
	5	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

FR7090/Na₂HPO₄	10	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	30	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4
	60	2,05 ± 0,0	19,52	97,6	2,4

Biografia

- 1981 - 1983 Farmácia e Bioquímica com
Habilitação Farmacêutico na Universidade
Federal de Santa Maria – RS
- 1984 - 1985 Curso de Farmácia e Bioquímica com
Habilitação em Tecnologia dos Alimentos na
Universidade Federal de Santa Maria – RS
- 1985 - 1987 Farmacêutico Responsável Técnico -
Farmácia Menezes – Sobradinho/RS
- 1987 - 1988 Professora substituta da disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM
- 1988 - 1997 Professora Auxiliar da Disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM
- 1992 - 1997 Pós-Graduação no Curso de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas da
UFSM, nível Mestrado, sob orientação do
Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira –
UNESP

1997 - atual

Professora Assistente da Disciplina de
Farmacotécnica do Curso de Farmácia e
Bioquímica da UFSM

Pareceres

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)