

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE SAPONINAS EM *Ampelozizyphus amazonicus* USANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Fabiane M. dos Santos, Jersika C. Simões e Jefferson R. A. Silva

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Campus Universitário Setor Sul, 69077-000 Manaus – AM, Brasil

Rosângela C. Barthus\*

Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Campus Universitário Setor Sul, 69077-000 Manaus - AM / Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, 29060-900 Vitória – ES, Brasil

Ronei J. Poppi

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Ana C. F. Amaral

Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, 21041-250 Rio de Janeiro – RJ, Brasil

Recebido em 16/7/10; aceito em 18/4/11; publicado na web em 14/6/11

OPTIMIZATION OF SAPONIN EXTRACTION CONDITIONS FROM *Ampelozizyphus amazonicus* BY USING EXPERIMENTAL DESIGN AND SURFACE RESPONSE METHODOLOGY. This work describes the use of experimental design and surface response methodology for optimization of saponin extraction from *Ampelozizyphus amazonicus*. For this purpose, a method employing extraction based on maceration assisted by ultrasound technique was utilized. The following factors were studied: extraction length of time and solvent composition. The total saponin was determined by using a gravimetric method and the results expressed by their relative proportion to total crude extract. For the specific condition, 60% hydro-alcoholic solution and 18 minutes extraction length of time has shown the best results. This method can be useful for extraction of substances with biological importance.

Keywords: saponin; *Ampelozizyphus amazonicus*; surface response methodology.

### INTRODUÇÃO

As saponinas constituem uma importante classe de substâncias químicas, que ocorrem em plantas superiores e alguns organismos marinhos.<sup>1-4</sup> Estas substâncias correspondem a glicosídeos de esteroides ou terpenos policíclicos com uma estrutura anfipática formada por gliconas (triterpênicas ou estereoidal) – porção lipofílica ligada a resíduos hidrofílicos de açúcares. Uma propriedade característica destas substâncias é a formação de espuma em contato com a água. Isto ocorre porque existe uma diminuição da tensão superficial da água, devida à presença de constituintes com diferentes características de polaridade que formam a estrutura das saponinas.<sup>1-4</sup>

A importância destes produtos naturais está baseada em suas inúmeras atividades biológicas, destacando-se as atividades anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, redutora de colesterol, antiviral, antimicrobiana e antifúngica.<sup>5-7</sup> Estas aplicações estão diretamente ligadas aos tipos de saponinas que podem ser encontrados, sendo muitos estudos realizados atualmente no sentido de verificar novos potenciais de usos. Outras aplicações consistem na sua utilização em indústrias farmacêuticas, sendo precursores na síntese de compostos esteroidais como hormônios, contraceptivos, diuréticos, entre outros.

Dentre os tipos de saponinas, tem-se que as saponinas triterpênicas em especial as do tipo damarano são encontradas em quantidades significativas nas raízes da espécie *Ampelozizyphus amazonicus*.<sup>8-10</sup>

Esta espécie pertence à família Rhamnaceae, uma planta nativa da região amazônica, conhecida como “cerveja-de-índio”, “cerveja” e “saracura-mirá”, que é usada popularmente no combate a diversos tipos de doenças e é importante na prevenção à malária.

Devido à importância e às variedades de aplicações de compostos como as saponinas, métodos que otimizem sua extração a partir de plantas medicinais como *A. amazonicus* são essenciais para o melhor aproveitamento deste tipo de produto natural. Neste caso, embora um método particular para a otimização da extração de cada saponina possa ser utilizado, muitas vezes a informação do processo de extração total destas substâncias também é bastante valiosa. Isto porque em alguns casos a atividade biológica pode não depender de uma substância em particular e sim do sinergismo entre estas substâncias.

Neste trabalho foi utilizada a extração baseada em maceração assistida por ultrassom, um método alternativo cuja eficiência consiste na maior interação entre solvente e amostra.<sup>11,12</sup> Dentre as vantagens deste método estão ainda a alta reprodutibilidade, rapidez no processamento da amostra e o baixo custo. Na literatura, alguns estudos descrevem a extração de produtos naturais e especificamente de saponinas usando extração assistida por ultrassom, estes envolvem comparações entre diferentes condições de extração,<sup>13,14</sup> porém, sem o emprego de processo de otimização usando metodologia de superfície de resposta (MSR), objetivo do presente estudo.<sup>15-17</sup>

Na otimização utilizando-se MSR, modelos matemáticos lineares ou quadráticos são ajustados aos dados obtidos segundo um planejamento experimental. Nestes casos, os experimentos são realizados randomicamente e as variáveis analisadas todas de uma vez,

\*e-mail: rbarthus@hotmail.com

permitindo que os efeitos da interação também possam ser avaliados.

Dessa forma, a conjunção desta técnica de extração com métodos de otimização permite uma melhor eficiência na obtenção de substâncias biologicamente importantes. Este é um método simples e rápido que pode ser usado para extração dos produtos naturais a partir de plantas medicinais.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material botânico

As raízes da espécie *A. amazonicus* foram coletadas na reserva Ducke (Manaus-AM), em uma única época do ano (2009), estação chuvosa. A autenticidade do material coletado foi certificada pelo número 191532 tendo suas exsiccatas depositadas no herbário do INPA.

### Processo de extração - variáveis de estudo

A escolha do solvente para a extração foi baseada no fato de que muitos compostos polares biologicamente importantes são extraídos com solução hidroalcoólica (etanólica). Este solvente é também bastante utilizado em preparações farmacêuticas líquidas e, em virtude disso, a composição deste tipo de solução hidroalcoólica foi estudada para a extração de saponinas em *A. amazonicus*. Estudos, no entanto, mostram que a eficiência de extração usando metanol é melhor. No caso da variável tempo, um tempo máximo de 30 min foi adotado para os estudos (esse tempo se mostrou adequado). Para esta variável tem-se que longos tempos de extração não são convenientes porque poderiam ocasionar problemas, como transformações químicas, nas amostras.

Outros fatores foram mantidos constantes, como o tamanho das partículas das amostras e a temperatura. No caso das partículas, considerou-se partículas finas o suficiente para um melhor contato entre solvente e amostra e que, ao mesmo tempo, permitisse uma filtração mais eficiente. Não foi alterada a temperatura, sendo considerada a temperatura ambiente (em torno de 28 °C) como a conveniente para o estudo.

### Planejamento experimental do tipo estrela

Para a otimização dos fatores tempo e composição do solvente, foram realizados experimentos segundo um planejamento experimental do tipo estrela (11 experimentos com 3 replicatas no ponto central). Os resultados das replicatas dos dados do ponto central foram utilizados para cálculos dos erros padrões. Os níveis dos fatores utilizados e seus valores codificados são apresentados na Tabela 1. Depois de estabelecidas estas condições, o material botânico foi preparado para as análises.

**Tabela 1.** Variáveis utilizadas no planejamento experimental do tipo estrela

Variáveis	Níveis				
	-1,4	-1	0	1	1,4
% Solução etanólica	20	30	55	80	90
Tempo (min)	1	5	15	25	29

### Preparação dos extratos

O material botânico previamente limpo foi seco à sombra e em temperatura ambiente. Em seguida as raízes foram raspadas, cortadas em pedaços menores, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração. A extração dos componentes foi baseada no processo de maceração assistida por ultrassom e realizada da seguinte maneira:

aproximadamente 10,000 g de amostras (raízes trituradas) foram colocadas em um erlenmeyer contendo 100,00 mL de solvente. A seguir, as amostras foram submetidas às ondas ultrassônicas, sendo utilizada uma frequência de ultrassom de 40 khz. Depois de finalizado o processo de extração, os extratos foram filtrados, concentrados em um evaporador rotativo e liofilizados. Determinou-se a quantidade de substâncias extraíveis (extrato seco). As amostras foram, então, submetidas às análises para a determinação de saponinas totais usando método gravimétrico. Em todos os experimentos usou-se solvente de grau analítico (Tedia Brazil) e água deionizada (Milli-Q sistema Millipore).

### Determinação gravimétrica de saponinas totais

A determinação de saponinas totais foi realizada usando o método gravimétrico.<sup>18</sup> Brevemente, têm-se que as amostras provenientes dos extratos etanólicos foram pesadas (aproximadamente 0,2000 g). Em seguida, procedeu-se a uma nova extração usando uma solução de butanol saturado com água. Recolheu-se a fração butanólica e o solvente foi evaporado. O extrato resultante foi pesado, obtendo-se assim o teor de saponinas totais.

### Metodologia de superfície de resposta

Os dados obtidos para a determinação de saponinas, segundo os experimentos realizados a partir do planejamento experimental do tipo estrela, foram utilizados para a construção da superfície de resposta. Estes dados foram analisados usando o software Matlab versão 6,0 (The Mathworks, Natick, USA). Dessa forma, foram ajustados a um modelo quadrático, cuja expressão para duas variáveis é mostrada na Equação 1.

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

onde  $x_1$ ,  $x_2$  correspondem às variáveis independentes codificadas e  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ ,  $b_{12}$  são as estimativas dos coeficientes do modelo. Os termos lineares  $b_1x_1$  e  $b_2x_2$  representam os efeitos principais, os termos quadráticos são responsáveis pelos efeitos da curvatura e o produto  $b_{12}x_1x_2$  representa a interação entre duas variáveis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a extração de saponinas da espécie *A. amazonicus*, a composição do solvente estudado variou de 20-90%, de modo a se estudar as diferenças quanto à proporção da solução para uma melhor extração. As saponinas são compostos bastante polares, contudo, para a extração destas substâncias neste estudo, procurou-se evitar condições extremas para que problemas como hidrólise enzimática durante extração aquosa e outros processos como esterificação de saponinas ácidas com tratamento com álcool; hidrólise de grupos estéreis lábeis e transilação fossem evitados.<sup>6</sup>

Outras considerações devem ainda ser ressaltadas: na extração assistida por ultrassom, longos tempos de extração não são convenientes, pois poderiam ocasionar problemas como transformações químicas nas amostras, conforme relatado na literatura e, conseqüentemente, perda do analito. Alguns estudos mostram que um tempo empregado de até 2 h poderia ser utilizado sem a ocorrência de problemas em relação à estas substâncias.<sup>13,14</sup> Neste trabalho, porém, adotou-se um tempo menor (30 min) porque foi verificado para o extrato bruto que com uma condição próxima desse tempo obter-se-ia a máxima extração de substâncias, independente da composição do solvente (resultados não mostrados), não havendo variações significativas após este tempo.

Um outro dado importante a ser enfatizado é que a quantidade de produtos naturais e também o tipo (neste caso tipo de saponina) em

**Tabela 2.** Variáveis e níveis utilizados (valores codificados entre parênteses) para planejamento experimental do tipo estrela e as respostas obtidas para a extração das saponinas

Experimento	%Solução etanólica	Tempo extração (min)	Rendimento mg extrato seco / g amostra	Rendimento mg saponinas / g de extrato seco
1	30 (-1)	5 (-1)	42,91	312,50
2	80 (1)	5 (-1)	35,40	324,30
3	30 (-1)	25 (1)	50,92	340,70
4	80 (1)	25 (1)	49,30	375,00
5	55 (0)	15 (0)	53,41	401,00
6	55(0)	15 (0)	53,60	403,80
7	55 (0)	15 (0)	54,70	405,10
8	20 (-2 <sup>1/2</sup> )	15 (0)	43,80	312,00
9	55 (0)	29 (2 <sup>1/2</sup> )	57,66	370,00
10	90 (2 <sup>1/2</sup> )	15 (0)	38,00	340,00
11	55 (0)	1 (-2 <sup>1/2</sup> )	43,05	320,00

determinada planta medicinal varia de acordo com a época do ano, horário da coleta, as condições do solo e ainda com fatores inerentes à planta.<sup>19</sup> Dessa forma, o presente estudo retrata uma condição específica, sem levar em consideração variações sazonais nem as outras acima mencionadas. Consequentemente, variabilidades quanto a estes resultados podem ser obtidas se realizadas em outras condições. Independentemente disso, o estudo da otimização de extração de produtos naturais envolvendo metodologia de superfície de resposta e os experimentos realizados segundo planejamentos experimentais se mostram relevantes para estes tipos de processos e assim antes de qualquer extração, a otimização deve ser realizada para um melhor aproveitamento dos produtos naturais.

#### Dados utilizados no processo de otimização por metodologia de superfície de resposta

A otimização da extração de saponinas da espécie *A. amazonicus* foi realizada segundo um planejamento experimental do tipo estrela. Os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória para a não introdução de erros sistemáticos à análise de dados. Os níveis dos fatores utilizados, seus valores codificados, bem como as respostas obtidas correspondentes à quantidade total de compostos extraíveis (extrato seco) e de saponinas totais (determinados por gravimetria), para o processo de extração baseada em maceração assistida por ultrassom estão especificados na Tabela 2.

Para a construção do modelo, os dados codificados das variáveis foram utilizados para realizar a regressão e a obtenção do modelo matemático, segundo a Equação 1. As estimativas dos coeficientes do modelo (parâmetros b), seus respectivos erros padrões (calculados a partir de ensaios repetidos no ponto central) estão apresentados na

**Tabela 3.** Estimativas do coeficiente de regressão com seus erros padrões

Coeficiente	Estimativa		Estimativa	
	coeficiente polinômio	Erro padrão	coeficiente polinômio	Erro padrão
	Saponinas		Extrato seco	
b <sub>0</sub>	403,30	± 1,20	53,90	±0,40
b <sub>1</sub>	10,77	± 0,74	-2,18	±0,24
b <sub>2</sub>	18,80	± 0,74	5,35	±0,24
b <sub>11</sub>	-37,99	± 0,88	-6,75	±0,29
b <sub>22</sub>	-28,49	± 0,88	-2,02	±0,29
b <sub>12</sub>	5,62	± 1,05	1,47	±0,35

Tabela 3. Nesta encontram-se também os resultados referentes às substâncias extraíveis (extrato seco).

Para as saponinas, verifica-se que o modelo construído é adequado e, de acordo com um nível de confiança de 95%, todos os parâmetros do modelo se mostraram estatisticamente significativos para a extração, este valor calculado usando os valores de t (2, 0,95) de 4,303 e os valores de erro padrão calculado para os fatores. Enquanto que para o total de substâncias extraíveis (extrato seco), tem-se que a interação entre os dois fatores (termo b<sub>12</sub>) não é significativa, no nível de confiança de 95%, baseado nos mesmos cálculos.

Analisando ainda os coeficientes do modelo para as saponinas verifica-se que os termos quadráticos são negativos, indicando que existe um valor máximo de tempo e % de solução etanólica para a extração destes produtos.

Verificou-se que o modelo obtido estava bem ajustado. A Tabela 4 apresenta os cálculos para a análise de variância (ANOVA) para os resultados da regressão em relação às saponinas e para o extrato seco.

Em relação às saponinas, tem-se que pela análise do valor de F se verificou que a regressão é significativa, sendo o valor F calculado superior ao F tabelado. O coeficiente de regressão foi mais um dos indicativos utilizados para verificar a adequação ao modelo, sendo encontrado um valor para R<sup>2</sup> de 99,59% para as saponinas, onde a variância máxima explicável é de 99,94%. Já a relação MQ<sub>tab</sub>/MQ<sub>ep</sub> não se mostrou significativa, obtendo-se um valor de 3,55.

Todos os parâmetros analisados até aqui, ou seja, variação da composição do solvente e tempo, bem como os cálculos realizados foram necessários para a construção de um modelo adequado e possível de ser utilizado para otimizar as condições de extração das saponinas em *A. amazonicus*. Dessa forma, empregou-se a equação de regressão (Equação 2) obtida para prever os efeitos dos parâmetros estudados (composição do solvente e tempo) sobre a extração.

$$\hat{y} = 403,30 + 10,71x_1 + 18,80x_2 - 37,99x_1^2 - 28,49x_2^2 + 5,62x_1x_2 \quad (2)$$

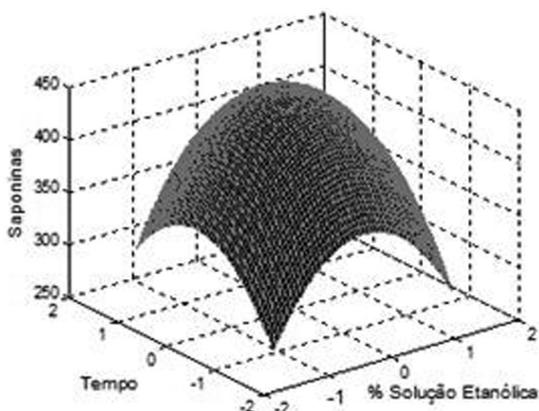
Para as saponinas verifica-se que a máxima extração é obtida numa porcentagem correspondente de solução hidroalcoólica de 60% e num tempo médio, correspondendo a 18 min de extração, obtendo-se uma máxima extração de 407,20 mg saponinas/g de extrato seco (ou bruto). Esta condição foi encontrada por meio de cálculos de derivadas parciais da Equação 2 e resolução de sistemas simples. Alguns estudos mostram que condições ótimas de extração de saponinas podem ser realizadas com até 77% de solução etanólica, porém tem-se que levar em consideração que estes dados são de outras espécies vegetais e, mais ainda, analisados em outras condições.<sup>20</sup> O teor e a quantidade de determinado tipo de saponina variam no decorrer do

**Tabela 4.** Análise de ANOVA para os modelos (saponinas e extrato seco)

	Fonte de variação	Soma quadrática	G.L.	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Saponinas	Regressão	13.648,00	5	2.729,60	247,02	5,05
	Resíduo	55,25	5	11,05		
	Falta de Ajuste	46,76	3	15,59	3,55	19,16
	Erro puro	8,78	2	4,39		
	Total	13.703,25	10			
Extrato seco	Regressão	522,03	4	130,51	318,32	5,05
	Resíduo	2,43	6	0,41		
	Falta de Ajuste	1,46	4	0,37	0,76	9,28
	Erro puro	0,97	2	0,49		
	Total	524,46	10			

G.L.- Graus de Liberdade.

ano, em virtude das situações climáticas. Dessa forma, uma mesma planta pode exigir condições diferentes de extração dependendo das variações sazonais, como já explicitado anteriormente. A relação entre as variáveis dependentes e independentes é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta gerada pelo modelo (Figura 1), neste caso os valores codificados das variáveis foram utilizados no gráfico apresentado, assim como para o de extrato seco (bruto).

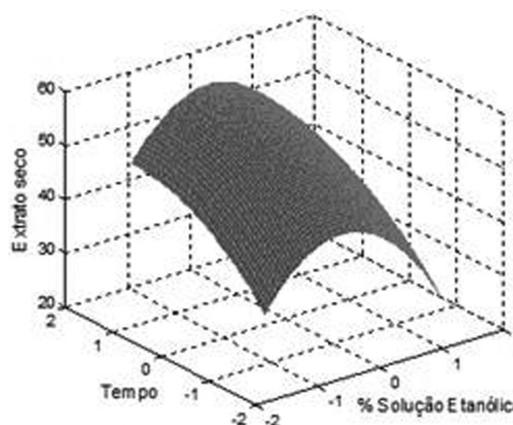


**Figura 1.** Superfície de resposta na determinação da máxima extração de saponinas da espécie de *Ampelozizyphus amazonicus* em função da composição do solvente e tempo de extração

Para o caso do extrato seco, realizando-se os mesmos estudos apresentados até aqui, o modelo construído também foi adequado, com um valor de  $R^2$  de 99,53%, sendo a extração máxima explicável de 99,81%. Da mesma forma, os valores obtidos de F indicam que o modelo tem uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Verificou-se que a máxima extração é obtida com a seguinte condição: 53% de solução etanólica e um tempo de 29 min (obtendo-se uma extração máxima de 58,95 mg de extrato seco/g de amostra), sendo a superfície de resposta gerada segundo a Equação 3 e apresentada na Figura 2.

$$\hat{y} = 53,90 - 2,18x_1 + 5,35x_2 - 6,75x_1^2 - 2,02x_2^2 \quad (3)$$

A otimização aplicada à extração de produtos naturais mostrou-se bastante adequada para que uma condição máxima de obtenção dos compostos (no caso saponinas) fosse obtida. Deve-se salientar, entretanto, que a obtenção máxima de compostos não está diretamente ligada ao máximo de uma determinada atividade biológica. Para isso, novos estudos devem ser realizados, testando-se para cada extração o nível de atividade biológica.



**Figura 2.** Superfície de resposta na determinação da máxima extração de substâncias extraíveis (extrato seco) da espécie de *Ampelozizyphus amazonicus* em função da composição do solvente e tempo de extração

## CONCLUSÕES

A extração de produtos naturais, como as saponinas, usando a técnica de maceração assistida por ultrassom mostrou-se um processo bastante simples e rápido. Neste estudo verificou-se ainda que a extração é dependente do tempo e, também, da composição da solução de solvente. Dessa forma, os resultados levam a concluir que para uma maior obtenção de material é necessário que métodos de otimização como a de metodologia de superfície de resposta sejam utilizados.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEAM e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto e bolsas concedidas à R. C. Barthus, F. M. Santos e J. C. Simões vinculados ao Programa de Desenvolvimento Científico Regional (DCR). Ao técnico A. F. L. Sousa e ao Prof. Dr. A. J. I. Silva, da UFAM, pelas facilidades na utilização do liofilizador.

## REFERÊNCIAS

- Oleszek, W. A.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *967*, 147.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Palazzo de Mello, J. C.; Ment, L. A.; Petrovick, P.; *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, 1ª ed., Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre - Florianópolis, 1999.
- Prado Martins, E. L.; Brandão, M. G. L.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 224.

4. Vigo, C. L. S.; Narita, E.; Marques L. C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, *14*, 137.
5. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219.
6. Guterres, S. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2005.
7. Jacnezo, Z.; Janson, P. E.; Sendra, J.; *Planta Med.* **1987**, *53*, 52.
8. Diniz, L. R. L.; Santana, P. C.; Ribeiro, A. P. A. F.; Portella, V. J.; Pacheco, L. F.; Meyer, N. B.; Cesar, I. C.; Cosenza, G. P.; Brandão, M. G. L.; Viera, M. A. R.; *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *123*, 275.
9. Andrade-Neto, V. F.; Brandão, M. G. L.; Nogueira, F.; Rosario, V.; Krettli, A. U.; *Int. J. Parasitol.* **2008**, *38*, 1505.
10. Brandão, M. G. L.; Lacailledubois, M. A.; Teixeira, M. A.; Krettli, A. U.; Wagner, H.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1123.
11. Chung, H.; Ji, X. M.; Canning, C.; Sun, S.; Zhou, K. Q.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4508.
12. Korn, M.; De Andrade, M. V. A. S.; Borges, S. S.; *Revista Analytica* **2003**, *2*, 34.
13. Lin, L.; Wu, J.; Ho, K.; Qi, S.; *Ultrasound in Med & Biol.* **2001**, *8*, 1147.
14. Wu, J.; Lin, L.; Chau, F.; *Ultrason. Sonochem.* **2001**, *8*, 347.
15. Box, G. E. P.; Hunter, J. S.; Hunter, H. G.; *Statistics for experimenters*, John Wiley: New York, 1978.
16. Barros Neto, B.; Scarmínio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2ªed., Educamp: Campinas, 1995.
17. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.
18. Namba, T.; Yoshizaki, M.; Tomomori, T.; *Planta Med.* **1974**, *25*, 28.
19. Noldin, V. F.; Cechinel Filho, V.; Monache, F. D.; Benassi, J. C.; Christmann, I. L.; Pedrosa, R. C.; Yunes, R. A.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 331.
20. Kwon, J.; Bélanger, J. M. R.; Paré, J. R.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1807.