



COMUNICADO
TÉCNICO

435

Colombo, PR
Agosto, 2019

Embrapa

Aprimoramento e adaptação de
método prático e rápido para
estimar a quantidade de saponinas
em extratos de polpa de frutos de
erva-mate

Yasmine Sayuri Kassuia
Ana Claudia da Silveira
Rachel Cruz Domahovski
Marcelo Lazzarotto

Aprimoramento e adaptação de método prático e rápido para estimar a quantidade de saponinas em extratos de polpa de frutos de erva-mate

Yasmine Sayuri Kassuia, graduanda em Biotecnologia pela PUC-PR; **Ana Claudia da Silveira**, Farmacêutica, mestrandona UFPR; **Rachel Cruz Domahovski**, graduanda em Farmácia pela UFPR; **Marcelo Lazzarotto**, Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR.

As saponinas são metabólitos secundários caracterizados por formar espuma estável em solução aquosa. Normalmente são encontradas em raízes, tubérculos, cascas, folhas, sementes e frutas de diversos vegetais, estando presentes até mesmo em alguns animais, como o pepino do mar (Wina et al., 2005). Possuem propriedades surfactantes e detergentes, tendo assim grande aplicabilidade nas indústrias alimentícia e cosmética. Sua atividade antifúngica e antibacteriana também a torna interessante para diversas aplicações. Quimicamente, as saponinas apresentam características anfipáticas, ou seja, são constituídas por um núcleo lipossolúvel de estrutura esteroidal ou triterpenóide e apresentam em sua porção hidrossolúvel uma ou mais cadeias de carboidratos (Waller; Yamasaki, 1996).

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae), é uma árvore originária da América do Sul conhecida pelo consumo de suas folhas secas, levemente torradas e moídas em uma bebida semelhante a um chá, popularmente conhecida como chimarrão e

tererê. Além disso, devido à sua composição química, na qual destacam-se fenóis, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, antociáninas, flavonóis e flavonas, terpenóides, esteróis, alcaloides purínicos, aminoácidos, ácidos graxos (no óleo extraído da semente), carboidratos, vitaminas e carotenóides (Alikaridis, 1987), a erva-mate apresenta algumas atividades farmacológicas. Assim, é tradicionalmente empregada na medicina popular para o tratamento de artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, obesidade, fadiga, retenção de líquidos e distúrbios hepáticos (Cogoi et al., 2013). Somente a região Sul do Brasil produz aproximadamente 347 toneladas por ano de folhas de erva-mate (IBGE, 2018), gerando consequentemente toneladas de frutos que são tratados como subprodutos (Cogoi et al., 2013). Taketa et al. (2004) observaram um alto teor de saponinas na composição do fruto, as quais diferem das encontradas nas folhas da erva-mate. Segundo estudo realizado por Borré et al. (2010), os frutos imaturos apresentaram um maior teor de saponina (12,30%) em relação às folhas (4,14%) e aos ramos (0,94%).

Atualmente, diversos métodos são capazes de detectar a presença de saponinas. Dentre os mais utilizados encontram-se os que avaliam o índice de espuma, atividade hemolítica, métodos espectrofotométricos e métodos cromatográficos, como CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e CLUE (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência) (Önning; Asp, 1993). Embora os métodos cromatográficos sejam os mais precisos, o alto custo do equipamento se torna oneroso à sua aplicação. Esse obstáculo vem estimulando a procura por outros métodos que se apresentem mais acessíveis, mas que mantenham a precisão juntamente com simplicidade e praticidade (Vigo et al., 2003).

A Farmacopeia brasileira 5^a edição propõe a metodologia de determinação do índice de espuma (índice afrosimétrico), em que se utiliza 1 g do material vegetal para preparo de 100 mL de extrato. São preparados tubos de 10 mL de volume total contendo de 1 mL a 10 mL do extrato, utilizando água destilada para completar os volumes. Os tubos devem ser agitados por 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos, então é obtido o índice de espuma, dividindo 1.000 pelo volume (mL) do extrato adicionado ao tubo de maior diluição que apresente altura de espuma igual a 1 cm (Brasil, 2010). Essa metodologia é aplicada às drogas vegetais descritas na Farmacopeia, pois, se tratam de materiais utilizados especialmente pela indústria farmacêutica.

O objetivo deste trabalho foi adaptar e aprimorar uma metodologia prática e

rápida para estimar a quantidade de saponinas em extratos de polpas dos frutos da erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

Materiais Necessários:

- Balança analítica.
- Liquidificador doméstico de 1.000 W.
- Chapa aquecedora.
- Pincel.
- Tamis de 35 mesh.
- Becker de 250 mL.
- Kitasato de 2 L.
- Funil.
- Papel filtro.
- Balão volumétrico de 100 mL.
- Tubos de ensaio (15 mm de diâmetro).
- Pipeta automática (P1000 e P5000).
- Régua.

O preparo do extrato da polpa do fruto de erva-mate foi feito de acordo com o método descrito por Silveira et al. (2018). Frutos secos foram triturados e separados das sementes por granulometria, utilizando-se tamis de 18 mesh. Para a preparação dos extratos aquosos, utilizou-se $3,0000 \pm 0,0005$ g de pó das polpas para 100 mL de água tipo II. Os extratos foram preparados em duplicata utilizando maceração a quente, a 55 °C e 85 °C, por 15 minutos e para cada extrato obtido foram realizadas análises em triplicata.

Primeiramente, os extratos foram diluídos na proporção 1:8, com água tipo II. Essa diluição prévia foi preparada para que se obtivesse 1 cm de espuma entre os tubos 3 e 8, na curva de diluição, aumentando a confiabilidade dos

resultados. A partir destes extratos foram preparadas as diluições posteriores, conforme mostra a Tabela 1.

Os tubos preparados conforme a Tabela 1 foram agitados manualmente, durante 15 segundos (2 movimentos verticais por segundo) e, então, deixados em repouso por 15 minutos. A leitura da altura da espuma que persistiu foi realizada com o auxílio de uma régua e utilizada para o cálculo do Índice Afrosimétrico (IA). Para as análises estatísticas foram utilizados teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos dados, Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de confiança de 95% ($P<0,05$) e 99% ($P<0,01$) para verificar diferença significativa entre o conjunto de dados. Os softwares SASM-Agri e Past (Paleontological Statistics software package for education and data analysis) foram usados como ferramentas para essas análises.

A definição do Índice Afrosimétrico (mL g^{-1}) é o volume de água (em mL) necessário para diluir 1 g de material vegetal e formar 1 cm de espuma estável por 15 minutos. Esse é um índice semi-quantitativo que pode estimar a concentração de saponinas na amostra (Brasil, 2010).

O cálculo do IA considerou as concentrações e as alturas das espumas dos dois tubos que apresentam valores adjacentes a 1 cm de altura de espuma. Assim, C1 e C2 serão respectivamente as concentrações dos tubos com alturas de espuma menor e maior que 1 cm. As alturas das espumas desses tubos serão respectivamente A1 e A2. Dessa forma, para o cálculo do IA foi utilizada a Equação 1:

$$IA = \frac{1000 \times (A2 - A1)}{(1 - A1) \times (C2 - C1) + C1 \times (A2 - A1)} \quad (1)$$

Tabela 1. Preparo da curva de diluições dos extratos.

Tubos	Extrato (mL)	Água tipo 2 (mL)	Concentração final de polpa de erva-mate (g/L)
1	0,1	9,9	0,30
2	0,2	9,8	0,60
3	0,3	9,7	0,90
4	0,4	9,6	1,20
5	0,5	9,5	1,50
6	0,6	9,4	1,80
7	0,7	9,3	2,10
8	0,8	9,2	2,40
9	0,9	9,1	2,70
10	1,0	9,0	3,00

Onde:

C1 = Concentração de polpa de erva-mate no tubo com altura de espuma menor que 1 cm, em g L⁻¹.

C2 = Concentração de polpa de erva-mate no tubo com altura de espuma maior que 1 cm, em g L⁻¹.

A1 = Altura de espuma no tubo com altura menor que 1 cm, em cm.

A2 = Altura de espuma no tubo com altura maior que 1 cm, em cm.

No caso de um dos tubos apresentar a altura de espuma igual a 1 cm, a fórmula pode ser reduzida à Equação 2.

$$IA = \frac{1000}{C} \quad (2)$$

Onde:

C = concentração (g/L) de polpa de erva-mate no tubo que apresentou altura de espuma igual a 1 cm.

Os resultados obtidos para os extratos da polpa de erva-mate à temperatura de 55 °C e 85 °C estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Os valores de IA obtidos para as duas temperaturas de extração seguiram a distribuição de dados normal, segundo teste de normalidade Shapiro-Wilk. A média dos IA obtida para os extratos de 55 °C foi 5368 ± 1555. Os valores de A1, A2, C1 e C2 utilizados foram os dos tubos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, considerando que foram os tubos com a altura de espuma adjacente ou igual a 1 cm. Para que a altura de 1 cm de espuma fosse observada entre os tubos 3 e 8, foi realizada diluição prévia do extrato na proporção

1:8. Dessa forma, o resultado final obtido foi multiplicado por 8.

A média dos IA obtida para os extratos 85 °C foi 4836 ± 928. Os valores de A1, A2, C1 e C2 utilizados foram os dos tubos 4, 5, 6 e 7, considerando que foram os tubos com a altura de espuma adjacente ou igual a 1 cm. Pelo mesmo motivo que o extrato de 55 °C, o extrato de 85 °C foi previamente diluído na proporção 1:8. Portanto, o extrato de 55 °C apresenta maior IA quando comparado ao de 85 °C, sugerindo que essa temperatura proporcionou um extrato com maior teor de saponinas.

Observa-se que, nas curvas de diluição de ambos os extratos, existem diferenças significativas de altura de espuma entre os tubos das Tabelas 2 e 3. Isso foi indicado pelo teste de Tukey com níveis e confiança de 99% e 95%, respectivamente. O rigor do teste estatístico proporcionou pouca diferença de agrupamento dos resultados do extrato de 85 °C. Este resultado demonstra a confiabilidade do teste, mostrando a diferença significativa entre as alturas dos tubos da curva obtida. No entanto, trata-se de um teste semi-quantitativo que fornece uma estimativa da concentração de saponinas presente nos extratos, permitindo a comparação entre duas extrações diferentes, nesse caso.

A proposta deste trabalho foi a obtenção de um valor mais preciso do volume de água necessária para diluir 1 g da droga, com o intuito de obter 1 cm de espuma. O aprimoramento matemático realizado permitiu um resultado mais preciso quando comparado ao

Tabela 2. Resultados de altura de espuma (cm) das 6 repetições dos tubos de ensaio com os extratos preparados à temperatura de 55 °C.

Tubos	Extrato 1			Extrato 2			Média
	1	2	3	4	5	6	
1	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	0,1	0,13 ^{f/G} ± 0,10
2	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,38 ^{e/f/FG} ± 0,09
3	0,7	0,8	0,5	0,5	0,6	0,5	0,60 ^{de/EF} ± 0,12
4	1,1	1,1	0,8	0,7	0,8	0,7	0,87 ^{cd/DE} ± 0,18
5	1,4	1,2	1,0	0,9	0,8	0,7	1,00 ^{bcd/CD} ± 0,26
6	1,6	1,4	1,3	1,0	1,1	0,8	1,20 ^{abc/BCD} ± 0,28
7	1,6	1,6	1,5	1,4	1,0	0,8	1,32 ^{ab/ABC} ± 0,33
8	1,7	1,5	2,0	1,2	1,0	1,0	1,40 ^{ab/AB} ± 0,40
9	1,8	1,6	2,1	1,4	1,5	1,1	1,58 ^{a/A} ± 0,34
10	2,0	1,7	1,3	1,4	1,6	0,8	1,47 ^{a/AB} ± 0,40
IA (mL g ⁻¹)	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,7)}{(1 - 0,7)(1,2 - 0,9) + 0,9(1,1 - 0,7)}$	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,8)}{(1 - 0,8)(1,2 - 0,9) + 0,9(1,1 - 0,8)}$	1000 1,5	1000 1,8	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,8)}{(1 - 0,8)(1,8 - 1,5) + 1,5(1,1 - 0,8)}$	1000 2,4	IA médio final =
IA (mL g ⁻¹) considerando a diluição 8x	889	909	667	556	588	417	5368 ± 1555

(*) Os resultados de IA seguem a distribuição normal de dados segundo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. ANOVA foi aplicada como teste estatístico e teste de Tukey como *post test*, sendo que as médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem ao teste com $P < 0,01$ e letras maiúsculas com $P < 0,05$.

Tabela 3. Resultados de altura de espuma (cm) dos tubos de ensaio com os extratos preparados à temperatura de 85 °C.

Tubos	Extrato 1			Extrato 2			Média
	1	2	3	4	5	6	
1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	0,18 ^{f/G} ± 0,09
2	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,42 ^{ef/FG} ± 0,07
3	0,6	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,58 ^{de/EF} ± 0,09
4	0,7	0,9	0,8	0,6	0,6	0,7	0,72 ^{de/DE} ± 0,11
5	1,0	1,1	1,1	0,7	0,6	0,7	0,87 ^{cd/CD} ± 0,22
6	1,3	1,3	1,4	0,9	1,0	0,9	1,13 ^{bc/BC} ± 0,22
7	1,4	1,4	1,5	1,1	1,0	1,0	1,23 ^{ab/B} ± 0,22
8	1,5	1,2	1,5	1,2	1,1	1,1	1,27 ^{ab/AB} ± 0,18
9	1,5	1,5	1,6	0,9	1,2	1,2	1,32 ^{ab/AB} ± 0,26
10	1,6	1,5	2,2	1,4	1,2	1,2	1,52 ^{a/A} ± 0,37
IA (mL g ⁻¹)	$\frac{1000}{1,5}$	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,9)}{(1 - 0,9)(1,5 - 1,2) + 1,2(1,1 - 0,9)}$	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,8)}{(1 - 0,8)(1,5 - 1,2) + 1,2(1,1 - 0,8)}$	$\frac{1000 \times (1,1 - 0,9)}{(1 - 0,9)(2,1 - 1,8) + 1,8(1,1 - 0,9)}$	$\frac{1000}{1,8}$	$\frac{1000}{2,1}$	
IA (mL g ⁻¹) considerando a diluição 8x	667	741	714	513	556	476	IA médio final =
	667	741	714	513	516	476	4836 ± 928

(*) Os resultados de IA seguem a distribuição normal de dados segundo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. ANOVA foi aplicada como teste estatístico e teste de Tukey como post test, sendo que as médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem ao teste com $P < 0,01$ e letras maiúsculas com $P < 0,05$.

método farmacopeico. Na metodologia farmacopeica, utiliza-se o tubo de maior diluição que apresenta 1 cm de espuma, assumindo-se que aquela concentração da droga permite a obtenção desse resultado.

Portanto, o método analítico é prático e rápido. A menor quantidade de extrato utilizado para realizar os ensaios é devida à maior concentração de saponinas presentes nos extratos de polpa de frutos de erva-mate (Taketa et al., 2004; Borré et al. 2010), quando comparada à metodologia proposta na Farmacopeia Brasileira 5^a edição.

Conclusões

O método proposto trata-se de um aprimoramento e adaptação da metodologia de determinação de índice de espuma presente na Farmacopeia brasileira 5^a edição. Este método é capaz de determinar, com maior precisão, o volume de espuma formado a partir de 1 g de droga quando comparado ao método farmacopeico. Também possibilita a adaptação do método existente para o uso em extratos dos frutos da erva-mate. Este subproduto da cultura erva-mate é relevante quando é pensado na produção de saponinas. Esta metodologia pode auxiliar os estudos de melhoramento genético e ao desenvolvimento de processos de preparação de extratos de erva-mate devido à sua simplicidade, eficiência e aplicabilidade.

Referências

- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 20, n. 2, p. 121–144, 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90084-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90084-5).
- BORRÉ, G. L.; KAISER, S.; PAVEI, C.; SILVA, F. A.; BASSANI, V.; ORTEGA, G. G. Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 33, n. 3, p. 362–374, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826070903526055>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia brasileira. 5. ed. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 224, 24 nov. 2010.
- COGOI, L.; GIACOMINO, M. S.; PELLEGRINO, N.; ANESINI, C.; FILIP, R. Nutritional and phytochemical study of *Ilex paraguariensis* fruits. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 1-6, 2013. DOI: <http://doi.org/10.1155/2013/750623>.
- IBGE. **Produção da extração vegetal e silvicultura**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>>. Acesso em: 7 ago. 2019.
- ÖNNING, G.; ASP, N. G. Analysis of saponins in oat kernels. *Food Chemistry*, v. 48, n. 3, 1993. DOI: [http://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90145-6](http://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90145-6).
- SILVEIRA, A. C.; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M.; **Método de DPPH adaptado**: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reproduzível. Colombo: Embrapa Florestas, 2018. 11 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 421). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1101294>>.
- TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0103-50532004000200008>.

- VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MARQUES, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p.46-49, 2003. DOI: <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000400016>.
- WALLER, G. R.; YAMASAKI, K. Saponins used in food and agriculture. In: AMERICAN SOCIETY

OF ANIMAL SCIENCE. **Proceedings**. Nova York: Plenum Press, 1996. v. 405.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005. DOI: <http://doi.org/10.1021/jf048053d>.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Versão digital (2019)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretaria-Executiva

Neide Makiko Furukawa

Membros

Cristiane Aparecida Fioravante Reis,

Krisle da Silva, Marilice Cordeira Garrastazu,

Valderêis Aparecida de Sousa, Annette Bonnet,

Álvaro Figueiredo dos Santos,

Guilherme Schnell e Schühli,

Marcelo Francia Arco-Verde

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa