

UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE LICPODINA A PARTIR DE *Lycopodium clavatum* L.

G. F. SILVA, R. N. ALMEIDA, A. T. ESPIRITO SANTO, E. CASSEL, R. M. F. VARGAS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia
E-mail para contato: cassel@pu.rs.br

RESUMO – O trabalho consistiu em otimizar a extração com dióxido de carbono supercrítico da licopodina, um alcalóide com efeitos antioxidante e anticolinesterásico, a partir de *Lycopodium clavatum* L. Utilizando o método de superfície de resposta com planejamento Box-Behnken, foram investigadas as variáveis pressão e temperatura do fluido supercrítico (CO₂) e o tempo de pré-tratamento da planta em solução alcalina. As faixas de operação estudadas foram as seguintes: pressão de 200 a 300 bar; temperatura de 40 a 60°C; tempo de imersão de zero a 02 horas. Os extratos foram purificados e em seguida analisados por CG/EM. A partir da análise de variância foi possível concluir que a pressão e a temperatura e suas relações quadráticas foram estatisticamente significativas, adotando-se o modelo quadrático para a superfície de resposta. Assim, foi definida a condição ideal para a extração: 300 bar, 40°C, sem o pré-tratamento, o que resultou um teor de 20,29% (m/m) de licopodina no extrato final.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros medicamentos usados pelo ser humano foram à base de plantas, as quais continuam sendo uma importante fonte de novos fármacos (Orhan *et al.*, 2006), propriedade geralmente decorrente de seus metabólitos secundários. O uso de plantas do gênero *Huperzia* durante séculos na medicina tradicional chinesa (Ma *et al.*, 2006) e a capacidade de inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase apresentada por alcaloides encontrados em espécies desse gênero (Liu *et al.*, 1986; Ayer, 1991) desencadearam o interesse por um grupo de metabólitos que ocorrem na família Lycopodiaceae: os alcaloides de *Lycopodium* (Ma & Gang, 2004). O principal alcaloide extraído da *Lycopodium clavatum* L. é a licopodina (C₁₆H₂₅NO), que pode ser útil no tratamento do mal de Alzheimer devido aos efeitos antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase (Konrath *et al.*, 2012). Esse alcaloide também é capaz de inibir o crescimento de células Hela (Mandal *et al.*, 2010), além de diminuir a proliferação e induzir à apoptose de células humanas de câncer de próstata (Bishayee *et al.*, 2013).

Frente às técnicas de extração convencionais com solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico tem se mostrado mais seletiva e é uma tecnologia limpa quando utiliza como solvente o dióxido de carbono (Hawthorne, 1990; Chester *et al.*, 1998). Esse processo tem sido empregado para isolar drogas relevantes de plantas medicinais, por exemplo, ácido artemisinina para o tratamento da malária (Kohler *et al.*, 1997) e alcaloides promissores para inibição do vírus HIV (Ashraf-Khorassani & Taylor, 1997). Entretanto, para que a seletividade e o rendimento da extração sejam apropriados, é

necessário um ajuste adequado de variáveis do processo, entre as quais se destacam pressão, temperatura, co-solvente, vazão de solvente (Cassel *et al.*, 2008; Mukhonopadhyay, 2000). Para avaliação dessas variáveis podem ser aplicadas técnicas matemáticas e estatísticas, destacando-se os planejamentos Taguchi, delineamento composto central e Box-Behnken (Sharif *et al.*, 2014). O planejamento de Box-Behnken foi utilizado em diversos trabalhos como, por exemplo, na extração de xantanas de *Garcinia mangostana* L. (Zarena *et al.*, 2012), de flavonoides da *Pueraria lobata* (Wang *et al.*, 2008) e de antioxidantes de *Crataegus monogyna* (Shortle *et al.*, 2013).

Assim, esse trabalho consistiu na investigação das condições do processo mais adequadas à obtenção de lycopodina na extração de *Lycopodium clavatum* L. com CO₂ supercrítico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Planta

A planta *L. clavatum* foi coletada em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul (29°42 S latitude; 50°58 W longitude) nos meses de novembro de 2012 e novembro de 2013. O material vegetal foi identificado e amostras encontram-se depositadas no Herbário do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MPUC 10478). Todo o material vegetal foi seco em estufa à 40°C por 48 horas e posteriormente triturado em moinho de facas.

2.2. Extração com CO₂ Supercrítico

As extrações foram realizadas em uma unidade piloto de extração supercrítica (Cassel *et al.*, 2011), representada na Figura 1, constituída por um cilindro com CO₂, o qual, no estado líquido, passa por um condensador (C1) e é pressurizado através de uma bomba de alta pressão (P1). Após, o CO₂ segue por um pré-aquecedor (W1) para que atinja o estado supercrítico e, então, o fluido supercrítico é alimentado no vaso de extração (B1) que contém a matriz vegetal a ser extraída. O vaso de extração utilizado tem capacidade de 500 mL e foram utilizados para cada extração 100 g de planta moída com diâmetro médio de 1,29 mm. Em seguida, o produto passa por uma válvula micrométrica (VC1), onde o CO₂ se expande e tem sua vazão mássica determinada por um sensor. A vazão de CO₂ utilizada foi de 800 g.h⁻¹. O extrato, separado do solvente na expansão, é coletado no vaso separador (B2).

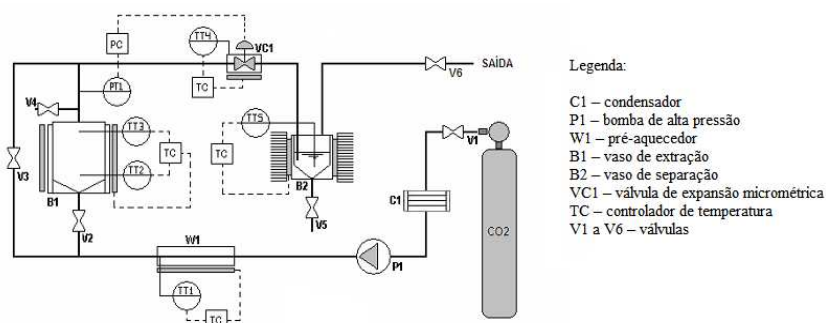


Figura 1 - Fluxograma do processo de extração supercrítica (Cassel *et al.*, 2010; Barroso *et al.*, 2011).

2.3. Planejamento de Experimentos

A metodologia de superfície de resposta foi empregada para otimizar a extração de licopodina a partir da *L. clavatum* utilizando CO₂ supercrítico. Foram selecionados três parâmetros para serem avaliados: pressão e temperatura do fluido supercrítico e tempo de imersão da planta em pré-tratamento com solução alcalina. O tratamento pré-extração foi definido com base na estrutura dos alcaloides, que podem se apresentar na forma de base livre (solúvel em solvente apolar, como o CO₂) ou como sais (solúveis em solventes polares) (Kim Choi *et al.*, 1999; Bahramifar *et al.*, 2005). Assim, foi utilizada solução tampão pH 12 de carbonato e bicarbonato de sódio, na qual a planta era imersa por um período de tempo pré-determinado.

O delineamento de experimentos utilizado foi o de Box-Behnken (Box & Behnken, 1960), método baseado em um planejamento fatorial fracionado em três níveis. O número de experimentos é dado por $N = 2k(k-1) + C_0$, onde k é o número de variáveis e C_0 o número de replicatas no ponto central e ambos equivaleram a três, totalizando 15 experimentos definidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores das variáveis para cada experimento designado pelo método Box-Behnken e respostas observadas

Ordem de ensaio	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo de imersão (h)	Resposta (% de licopodina)	Rendimento total de extrato (% m/m)
1	250	50	1	5,12	0,343
2	200	60	1	7,75	0,248
3	300	40	1	20,37	0,433
4	200	40	1	14,92	0,674
5	250	50	1	3,48	0,793
6	250	60	0	5,49	0,901
7	300	50	0	11,56	1,364
8	200	50	0	6,74	0,242
9	200	50	2	6,53	0,187
10	300	60	1	11,64	1,329
11	300	50	2	7,49	0,274
12	250	40	2	7,67	0,203
13	250	40	0	9,67	0,762
14	250	50	1	6,47	0,346
15	250	60	2	5,65	0,720

A matriz do planejamento foi criada no *software* Minitab[®] com o qual os experimentos foram aleatorizados (base 9) para minimizar os efeitos de variáveis não controladas. A relação entre as variáveis e a resposta é modelada ajustando-se os resultados experimentais a um polinômio de segunda ordem conforme a Equação 1:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

onde Y é o teor de licopodina, X_i são as variáveis independentes (pressão e temperatura do fluido supercrítico e tempo de pré-tratamento da planta imersa em solução alcalina), k é o número de variáveis ($k=3$) e β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes de regressão para os termos de interceptação, linear, quadrático e de interação, respectivamente.

2.4. Análise Química da Licopodina

A otimização das extrações foi realizada em função da licopodina extraída. Para isso, foram comparados os rendimentos de licopodina nos extratos (% m/m), determinados através de cromatografia gasosa pelo método da normalização de área.

O extrato bruto, antes de ser analisado, foi submetido a uma etapa de extração de alcaloides, realizada pelo método ácido-base de Stas-Otto (Kovar *et al.*, 2010; Tsujikawa *et al.*, 2006). O extrato bruto foi ressuspensionado em solução de ácido clorídrico (HCl 5% v/v) e particionado com diclorometano. Em seguida, a fase aquosa, contendo alcaloides na forma de sal, foi alcalinizada com solução de hidróxido de sódio (NaOH 2 mol.L⁻¹) até pH 12 e submetida à partição com diclorometano. Após, a fase aquosa foi descartada e o extrato de alcaloides foi obtido pela evaporação do solvente orgânico. Para ser analisado, o extrato purificado foi solubilizado em metanol.

As análises foram realizadas com um cromatógrafo a gás da marca Agilent modelo 7890A equipado com um espectrômetro de massas da marca Agilent modelo 5975C. A coluna capilar utilizada foi uma HP-5MS revestida com 5% de fenil metil silox, com 30 m x 250 µm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 µm. A programação de temperatura do forno foi de 230°C por 2 minutos; aquecimento de 20°C / min até 250°C, temperatura mantida por 2 minutos. Em seguida, aquecimento de 5°C / min até a temperatura de 280°C, mantida por 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 300 °C; modo de injeção *split* com razão de *split* 1:10; volume injetado igual a 1,0 µL. O gás de arraste utilizado foi hélio com vazão 0,8 mL.min⁻¹; a temperatura da interface foi de 280 °C; modo MS EI com tensão de 70 eV. O intervalo de aquisição de massas analisado, m/z, foi de 30 a 450 u.m.a. Os compostos foram identificados por comparação com a biblioteca de espectros de massas NIST.

3. RESULTADOS

Através da integralização das áreas dos cromatogramas foi expresso o percentual de licopodina presente em cada extrato. Para a planta coletada em novembro de 2012, os rendimentos dos extratos brutos variaram entre 0,187 e 1,364 % (m/m), enquanto o teor de licopodina nos extratos purificados variou entre 3,48 e 20,37%, conforme é apresentado na Tabela 1.

Para avaliar o modelo de superfície de resposta, com esses resultados foi realizada, através do *software* estatístico Minitab[®], a análise da variância (ANOVA) para o teor de licopodina apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de variância para o teor de licopodina

Fator	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Soma dos quadrados ajustada	Médias quadradas ajustadas	Teste F	p
Regressão	9	250,690	250,690	27,854	7,50	0,020
Linear	3	94,310	87,078	29,026	7,81	0,025
P	1	28,577	55,437	55,437	14,92	0,012
T	1	61,051	46,959	46,959	12,64	0,016
C	1	4,682	1,718	1,718	0,46	0,527
Quadrática	3	150,880	150,880	50,293	13,54	0,008
P*P	1	80,848	85,189	85,189	22,93	0,005
T*T	1	58,768	54,540	54,540	14,68	0,012
C*C	1	11,265	11,265	11,265	3,03	0,142
Interação	3	5,500	5,500	1,833	0,49	0,702
P*T	1	0,608	0,608	0,608	0,16	0,702
P*C	1	3,725	3,725	3,725	1,00	0,363
T*C	1	1,166	1,166	1,166	0,31	0,599
Erro residual	5	18,574	18,574	3,715		
Falta de ajuste	3	14,090	14,090	4,697	2,09	0,339
Erro puro	2	4,484	4,484	2,242		
Total	14	269,264				

Conforme os resultados da ANOVA, a pressão (P) e a temperatura (T) e o efeito quadrático dessas variáveis (P*P e T*T) são estatisticamente significativos ($p < 0,05$), considerando um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). O tempo de pré-tratamento da planta (fator A) não interferiu significativamente, sendo rejeitada a hipótese de correlação desse fator com a extração de licopodina. A análise indica também que a regressão é estatisticamente significativa. Com isso, os coeficientes de regressão de superfície de resposta foram estimados pelo modelo quadrático completo de Box-Behnken (1960), resultando a Equação 2 (variáveis não codificadas).

$$\begin{aligned} \% \text{ licopodina} = & 212,696 - 0,856P - 3,979T + 4,853A + 0,002P^2 + 0,038T^2 \\ & - 1,757A^2 - 0,001PT - 0,019PA + 0,054TA \end{aligned} \quad (2)$$

O modelo ajustado representou bem os dados, apresentando coeficiente de determinação R^2 igual a 0,9310 e coeficiente de determinação ajustado de 0,8069. A validade do modelo é confirmada ainda pelo valor não significativo para a falta de ajuste, o que aponta o modelo quadrático como estatisticamente significativo para a resposta. Assim, através da Equação 2, foi possível gerar as superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 2 e 3.

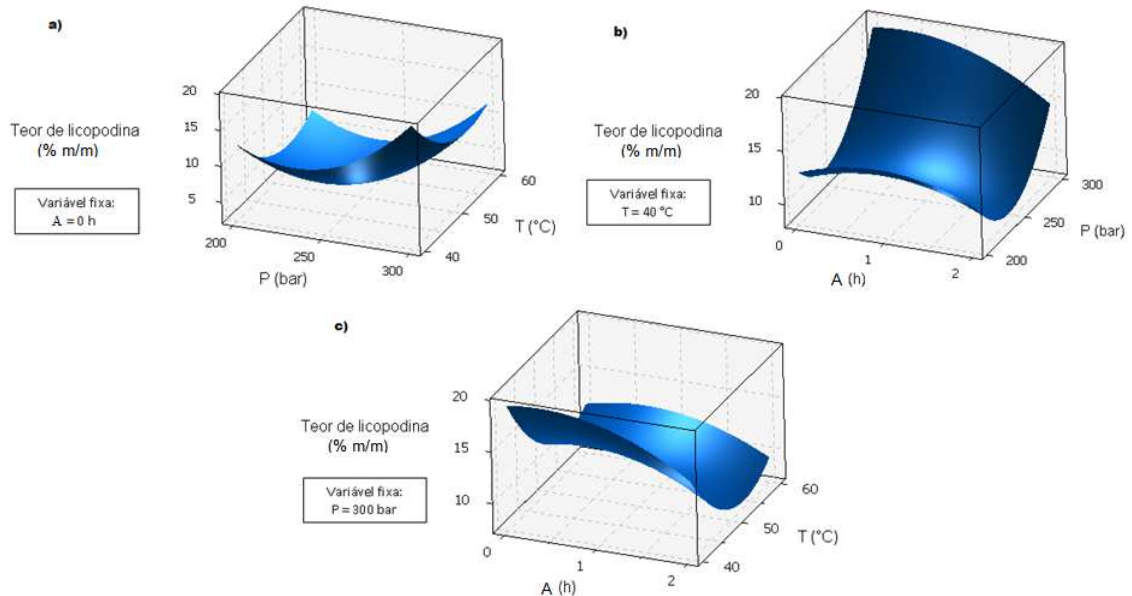


Figura 2 - Superfície de resposta para o teor de licopodina no extrato final como função de duas variáveis independentes: a) pressão e temperatura do CO₂; b) tempo de pré-tratamento e pressão do CO₂; c) tempo de pré-tratamento e temperatura do CO₂.

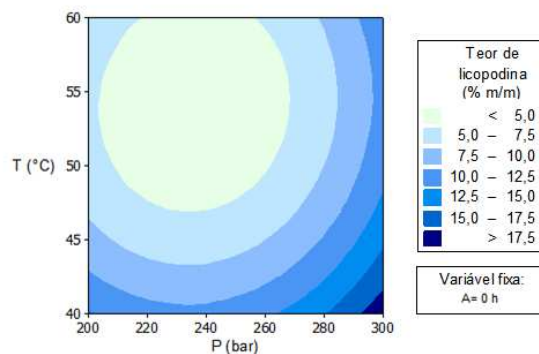


Figura 3 - Curvas de nível da superfície de resposta como função da pressão e temperatura do CO₂ sem o pré-tratamento (A= 0 h).

Os dados representados nas Figuras 2 e 3 evidenciam um crescimento da concentração de licopodina no extrato final com o aumento da pressão e diminuição da temperatura do fluido supercrítico. Com isso, foi definida como melhor condição para a extração da licopodina a partir da *L. clavatum*: pressão de 300 bar, temperatura de 40 °C, sem o pré-tratamento com a solução tampão. Nas superfícies da Figura 2 é possível observar também que a região dos experimentos realizados não atingiu um ponto de máximo em relação ao teor de licopodina, o que é justificado pela limitação do equipamento de extração utilizado, pois não é possível operá-lo com pressão acima de 300 bar.

Para a condição otimizada foi realizada extração em duplicata, com a planta coletada em novembro

de 2013, obtendo-se uma concentração média de licopodina de 20,29% m/m em relação às áreas dos picos eluídos apresentados no cromatograma da Figura 4. Esse valor está de acordo com o valor de 19,24% m/m estimado pela equação obtida com o planejamento de Box-Behnken (erro de 5,43%).

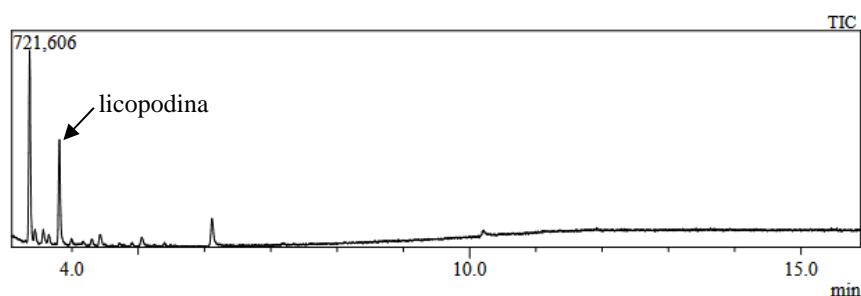


Figura 4 - Cromatograma do extrato obtido com CO₂ a 300 bar e 40°C, sem pré-tratamento da planta.

4. CONCLUSÃO

A utilização do método estatístico metodologia de superfície de resposta foi eficiente na otimização das condições de extração com CO₂ supercrítico da licopodina da *Lycopodium clavatum* L. Assim, através do processo de extração com fluido supercrítico, foi possível obter um produto com teor de licopodina de 20,29 %, valor de acordo com o previsto pelo modelo de superfície de resposta.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FAPERGS.

O presente trabalho foi alcançado em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

6. REFERÊNCIAS

- ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L.T. Supercritical fluid extraction of michellamines A and B from anastrocladus korupensis leaves. *Anal. Chim. Acta*, v. 347, p. 305–311, 1997.
- AYER, W.A. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat. prod. Rep.*, p. 455-463, 1991.
- BAHRAMIFAR, N.; YAMINI, Y.; SHAMSIPUR, M. Investigation on the supercritical carbon dioxide extraction of some polar drugs from spiked matrices and tablets. *J. of Supercrit. Fluids*, v. 35, p. 205–211, 2005.
- BARROSO, M.T.; VILLANUEVA, G.; LUCAS, A.M.; PEREZ, G.P.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W.; CASSEL, E. Supercritical fluid extraction of volatile e non-volatile compounds from *Schinus molle* L. *Braz. J. Chem. Eng.* v. 28, p. 305-312, 2011.
- BISHAYEE, K.; CHAKRABORTY, D.; GHOSH, S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Lycopodine triggers apoptosis by modulating 5-lipoxygenase, and depolarizing mitochondrial membrane potential in androgen sensitive and refractory prostate cancer cells without modulating p53 activity: signaling cascade and drug-DNA interaction. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 698, p. 110-121, 2013.

- BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, v. 2, p. 455-475, No. 4, 1960.
- CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F.; BRUN, G.W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais. In: Eduardo Cassel; Leandro Machado Rocha. (Org.). *Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008. p. 213-228.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W.; ALMEIDA, D.E.; COGOI, L.; FERRARO, G.; FILIP, R. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *J. Food Eng.*, p. 656-661, 2010.
- CASSEL, E.; BEDINOT, C.; VARGAS, R.M.F., *Unidade Piloto de Extração Supercrítica*, 2011 - Privilégio de Inovação PROV020110081175, Equipamento de Extração Supercrítica. 03 de Agosto de 2011(Depósito).
- CHESTER, T.L.; PINKSTON, J.D.; RAYNIE, D.E. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. *Anal. Chem.*, v. 70, p. 301-319, 1998.
- CHOI, Y.H.; CHIN, Y.W.; KIM, J.; JEON, S.H.; YOO, K.P. Strategies for supercritical fluid extraction of hyoscyamine and scopolamine salts using basified modifiers. *J. Chromatogr. A*, v. 863, p. 47-55, 1999.
- HAWTHORNE, S.B. Analytical-scale supercritical fluid extraction. *Anal. Chem.*, v. 62, p. 633-642, 1990.
- KOHLER, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J. Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *J. Chromatogr. A*, v. 785, p. 353-360, 1997.
- KONRATH, E.L.; NEVES, B.M.; LUNARDI, P.S.; PASSOS, C.S.; SIMÕES-PIRES, A.; ORTEGA, M.G.; GONÇALVES, C.A.; CABRERA, J.L.; MOREIRA, J.C.F.; HENRIQUES, A. Investigation of the in vitro and ex vivo acetylcholinesterase and antioxidant activities of traditionally used *Lycopodium* species from South America on alkaloid extracts. *J. Ethnopharmacol.*, v. 139, p. 58-67, 2012.
- KOVAR, K.; RUF, C.O.L.; BEUERLE, G.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; OLIVEIRA, S.Q. DE. *Identificação de fármacos*, São Paulo: Pharmabooks, 2010. p. 33-39.
- LIU, J.S.; ZHU, Y.L.; YU, C.M. The structure of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity. *Can. J. Chem.*, v. 64, p. 837-839, 1986.
- MA, X.; GANG, D. The *Lycopodium* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, v. 21, p. 752-772, 2004.
- MA, X.; TAN, C.; ZHU, D.; GANG, D.R.. A survey of potential huperzine A natural resources in China: the Huperziaceae. *J. Ethnopharmacol.*, v. 104, p. 54-67, 2006.
- MANDAL, SK; BISWAS, R; BHATTACHARYYA, SS; PAUL, S; DUTTA, S; PATHAK, S; KHUDA-BUKHSH, AR. Lycopodine from *Lycopodium clavatum* extract inhibits proliferation of HeLa cells through induction of apoptosis via caspase-3 activation. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 626, p. 115-122, 2010.
- MUKHOPADHYAY, M. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. Boca Raton: CRC, 2000.
- ORHAN, I.; KÜPELİ, E.; SENER, B.; YESILADA, E. Appraisal of anti-inflammatory potential of the clubmoss, *Lycopodium clavatum* L. *J. Ethnopharmacol.*, v. 109, p. 146-150, 2006.
- SHARIF, K.M.; RAHMAN, M.M.; AZMIR, J.; MOHAMED, A.; JAHURUL, M.H.A.; SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M. Experimental design of supercritical fluid extraction - A review. *J. Food Eng.*, v. 124, p. 105-116, 2014.
- SHORTLE, E.; KERRY, J.; FUREY, A.; GILROY, D. Optimisation of process variables for antioxidant components from *Crataegus monogyna* by supercritical fluid extraction (CO₂) using Box-Behnken. *J. Supercrit. Fluids*, v. 81, p. 112-118, 2013.
- TSUJIKAWA, K.; MOHRI, H.; KUWAYAMA, K.; MIYAGUCHI, H.; IWATA, Y.; GOHDA, A.; FUKUSHIMA, S.; INOUE, H.; KISHI, T. Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. *Forensic Sci. Int.*, v. 164, p. 172-178, 2006.
- WANG, L.; YANG, B.; DU, X.; YI, C. Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chem.*, v. 108, p. 737-741. 2008.
- ZARENA, A.; SACHINDRA, N.; UDAYA SANKAR, K. Optimisation of ethanol modified supercritical carbon dioxide on the extract yield and antioxidant activity from *Garcinia mangostana* L. *Food Chem.*, v. 130, p. 203-208, 2012.