

Capítulo 5

Partição de saponina de *Quillaja* em sistema aquoso bifásico

Ana Clara Rocha Caldeira*¹; Jonatas Ferreira Santana dos Santos²; Janaína Teles de Faria³

Resumo

A partição de saponina de *Quillaja* em sistema aquosos bifásico (SAB) composto por isopropanol e sulfato de amônio em diferentes concentrações e temperaturas foi avaliada usando metodologia de superfície de resposta (MRS). Os resultados mostraram que a saponina migrou preferencialmente para a fase superior rica em isopropanol ($k_p > 4,1$), indicando maior afinidade da molécula de surfactante pelo álcool. Um modelo polinomial de segunda ordem foi ajustado aos dados obtidos no delineamento de Box Behnken (p-valor $< 0,05$ e $R^2 = 88,80\%$), sendo verificados os efeitos significativos da composição do SAB, da interação entre concentração de álcool e temperatura e da contribuição quadrática desses dois fatores. A condição ótima para partição de saponina no SAB foi determinada (28,7 %m/m de isopropanol e 15,2 %m/m de sulfato de amônio, a 15,4 °C) e avaliada experimentalmente ($k_p = 10,3$).

Palavras-chave: Composição. Extração líquido-líquido. Temperatura. Superfície de resposta. Surfactante natural.

Introdução

Surfactantes naturais como as saponinas têm atraído atenção de diversos segmentos industriais. As saponinas são constituídas por um núcleo aglicona, triterpênico ou esteroidal, ligado a diferentes unidades de açúcares (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; DA SILVA, 2016). Devido à sua estrutura molecular diversificada, as saponinas possuem diferentes propriedades físico-químicas e biológicas (GOLEMANOV *et al.*, 2012) como atividades antimicrobiana, citotóxica, emulsificante e espumante, o que as tornam atrativas para as indústrias de alimentos, agrícola e farmacêutica (OSBOURN; GOSS; FIELD, 2011).

¹ Estudante de Engenharia Agrícola e Ambiental, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

² Estudante de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

³ Docente do curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

A *Quillaja saponaria* Molina é uma espécie vegetal utilizada comercialmente para extração de saponina, assim como a *Yucca schidigera* e *Saponaria officinalis*. Entretanto, a saponina de *Quillaja* é considerada segura (possui status GRAS) nos Estados Unidos, além de ser a única aprovada pela União Europeia para utilização na indústria alimentícia (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017). O extrato de saponina de *Quillaja* é encontrado comercialmente com diferente grau de pureza (de 20 a mais de 97%), e podendo conter impurezas co-extraídas como os fenóis, taninos, açúcares e proteína (BÖTTCHER; DRUSCH, 2017; HE *et al.*, 2018).

Devido à co-extração de outras substâncias além das saponinas, processos de purificação são realizados para a obtenção de saponina de *Quillaja* mais pura. Diferentes técnicas sofisticadas e de alto custo têm sido utilizadas no processo de purificação de saponinas (HE *et al.*, 2018), o que onera o custo de produção.

O sistema aquoso bifásico (SAB) é uma técnica de extração líquido-líquido que vem ganhando destaque nos processos de extração e purificação de biomoléculas, por apresentar elevados graus de pureza e rendimento, mantendo a atividade biológica. Os SAB compostos por álcool de cadeia curta e sais inorgânicos apresentam vantagens como baixa viscosidade, baixa tensão superficial e menor custo, o que facilita os processos de escalonamento (WU *et al.*, 2011).

No entanto, antes de propor uma metodologia de purificação de saponina de *Quillaja* utilizando SAB é importante conhecer a distribuição dessa molécula no sistema em questão. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a partição de saponina de *Quillaja* em SAB composto por isopropanol e sulfato de amônio em diferentes temperaturas, bem como determinar, por meio da metodologia de superfície de resposta (MRS), as condições ótimas de processo para se obter maior coeficiente de partição de saponina de *Quillaja*.

Material e métodos

Materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes químicos: isopropanol, sulfato de amônio, vanilina, ácido sulfúrico e saponina da casca de *Quillaja*. Água ultrapura foi utilizada em todos os experimentos.

Partição de saponina em sistema aquoso bifásico

SAB (massa total de 8 g) foram preparados com diferentes concentrações de sal e álcool pela pesagem de quantidades apropriadas de isopropanol, solução estoque de sulfato de amônio (25 %m/m) e água em tubos de centrífuga de 15 mL, de acordo com as condições determinadas pelo delineamento experimental (Tabela 1). 100 µL de saponina 30 mg/mL foram adicionados aos tubos, os quais foram homogeneizados e mantidos em repouso por 1 h em estufa BOD sob diferentes temperaturas (15, 25 e 35 °C) de acordo com o delineamento de Box Behnken. As fases superior e inferior foram cuidadosamente separadas e analisadas para determinação da concentração de saponina. O coeficiente de partição (k_p), definido como a razão entre as concentrações de antocianinas na fase superior e inferior, foi avaliado para cada sistema.

Determinação da concentração de saponina

A concentração de saponina foi determinada pelo método colorimétrico de vanilina-ácido sulfúrico, de acordo com o método de Dini, Tenore e Dini, (2009), com modificações. Misturou-se, em banho de gelo, 250 µL de amostra (fase superior ou inferior) e 250 µL de solução alcóolica de vanilina 8 %m/v, com posterior adição de 2 mL de ácido sulfúrico a 73,5 %v/v. A mistura foi homogeneizada, aquecida a 60 °C por 15 min e resfriada em banho de gelo por 10 min. Leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 550 nm. A concentração de saponina nas fases foi estimada a partir de curva padrão previamente realizada.

Delineamento experimental e análise estatística

Delineamento de Box-Behnken composto por 3 fatores (x_1 , concentração de isopropanol; x_2 , concentração de sulfato de amônio; x_3 , temperatura) em 3 níveis (codificados: -1, 0 e +1) e com 5 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 1), foi utilizado para analisar e otimizar o processo de partição de saponina nos SAB. Os dados experimentais foram analisados por meio de regressão polinomial de segunda ordem, representada pela Equação 1, para caracterizar as superfícies de respostas:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i x_i + \sum_{i=1}^3 A_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 A_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq.1})$$

onde Y é a variável resposta (coeficiente de partição), A_0 é a constante, A_i , A_{ii} e A_{ij} são coeficientes linear, quadrático e de interação, respectivamente; e x_i e x_j são as variáveis independentes não codificadas.

O modelo obtido foi avaliado em termos da significância do modelo (p-valor < 0,05), coeficiente de determinação (R^2) e significância dos coeficientes (avaliada pelo teste t de Student, também ao nível de 5% de probabilidade). As análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico SAS University[®]. Gráficos do contorno das superfícies foram gerados no *software* Design Expert (versão *trial*).

Resultados e discussão

A partição de macromoléculas em SAB é normalmente influenciada por diversos parâmetros, os quais podem ser avaliados e otimizados. Os efeitos da composição dos sistemas (concentração de isopropanol e de sulfato de amônio) e da temperatura sobre o coeficiente de partição (k_p) de saponina em SAB foram avaliados segundo delineamento de Box Behnken. As respostas obtidas para as respectivas condições experimentais são apresentadas na Tabela 1.

Observa-se na Tabela 1 que o valor de k_p variou de 4,1 a 12,1, o que indica que a saponina migrou preferencialmente para a fase superior, rica em álcool. A maior concentração de saponina na fase superior pode estar associada à forte interação entre as moléculas de surfactante e isopropanol, que podem estabelecer ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, uma vez que as moléculas de saponina de *Quillaja* são constituídas por triterpeno ligado a cadeias de açúcar contendo glicose, galactose, xilose, raminose, arabinose e ácido glucurônico (KEZWON; WOJCIECHOWSKI, 2014).

Os coeficientes de partição avaliados no presente estudo foram superiores aos valores máximos obtidos no estudo de Liang *et al.* (2019) com sistemas compostos por líquido iônico/sulfato de amônio ($k_p = 1,97$) e líquido iônico/fosfato monossódico ($k_p = 3,04$). Mas foram inferiores aos coeficientes de partição reportados por He *et al.* (2018) em seu estudo sobre extração de saponinas de *Panax ginseng* em SAB constituídos por diferentes líquidos iônicos e sais ($k_p > 100$).

Os dados experimentais foram avaliados por regressão múltipla, sendo obtido o seguinte modelo polinomial de segunda ordem (Equação 2):

$$k_p = 210,110 - 17,951x_1 + 1,467x_2 + 0,892x_3 - 0,056x_1x_3 + 0,369x_1^2 + 0,012x_3^2 \quad (\text{Eq. 2})$$
onde k_p é o coeficiente de partição de saponina, x_1 e x_2 são as concentrações (%m/m) de isopropanol e sulfato de amônio, respectivamente, e x_3 é a temperatura (°C).

Tabela 1 – Design experimental e resultados do delineamento de Box Behnken

| Ensaio | Fatores e níveis codificados | | | Fatores e níveis reais | | | k_p |
|--------|------------------------------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|
| | x_1 | x_2 | x_3 | x_1 | x_2 | x_3 | |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 25,0 | 12,5 | 25 | 4,1 |
| 2 | -1 | 1 | 0 | 25,0 | 15,5 | 25 | 9,5 |
| 3 | 1 | -1 | 0 | 29,0 | 12,5 | 25 | 7,7 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 29,0 | 15,5 | 25 | 12,1 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 25,0 | 14,0 | 15 | 7,0 |
| 6 | -1 | 0 | 1 | 25,0 | 14,0 | 35 | 10,5 |
| 7 | 1 | 0 | -1 | 29,0 | 14,0 | 15 | 10,6 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 29,0 | 14,0 | 35 | 9,7 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 27,0 | 12,5 | 15 | 6,4 |
| 10 | 0 | -1 | 1 | 27,0 | 12,5 | 35 | 5,9 |
| 11 | 0 | 1 | -1 | 27,0 | 15,5 | 15 | 11,6 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 27,0 | 15,5 | 35 | 8,5 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 27,0 | 14,0 | 25 | 7,0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 27,0 | 14,0 | 25 | 6,7 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 27,0 | 14,0 | 25 | 7,0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 27,0 | 14,0 | 25 | 6,7 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 27,0 | 14,0 | 25 | 6,4 |

Fonte: Dos autores, 2019.

Nota: x_1 = %m/m isopropanol; x_2 = %m/m sulfato de amônio; x_3 = temperatura (°C).

A análise de variância do modelo ajustado é apresentada na Tabela 2, juntamente com a avaliação de seus coeficientes. A qualidade do ajuste do modelo foi verificada pela significância (p-valor < 0,05) da regressão e pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8880$), que indica que a maioria das variações na variável resposta (k_p) pode ser explicada pelo modelo. Tal resultado pode também ser verificado pela comparação entre os valores de k_p experimental e predito pelo modelo, na Figura 1A, na qual a reta identidade ($y = x$) corresponde ao ajuste perfeito.

Pela análise dos coeficientes de regressão pelo teste t (Tabela 2), verificou-se que os termos lineares das concentrações de álcool e sal (x_1 e x_2 , respectivamente) foram significativos (p-valor < 0,05), assim como os termos quadráticos de concentração de álcool (x_1^2) e temperatura (x_3^2), e a interação entre concentração de álcool e temperatura ($x_1 \cdot x_3$). De acordo com a significância dos

coeficientes de regressão do modelo ajustado (Eq. 2), o fator com influência mais significativa sobre a partição de saponina em SAB foi a concentração de sal (x_2 , p-valor < 0,0001), seguida pelo termo quadrático da concentração de álcool (x_1^2 , p-valor < 0,01), pela concentração de álcool (x_1), pelo termo quadrático de temperatura (x_3^2) e pela interação entre a concentração de álcool e a temperatura ($x_1 \cdot x_3$). O termo linear de temperatura (x_3) foi não significativo (p-valor > 0,05), embora tenha permanecido na regressão para manter a hierarquia do modelo.

Tabela 2 – ANOVA e resultados do teste de significância para os coeficientes de regressão do modelo ajustado

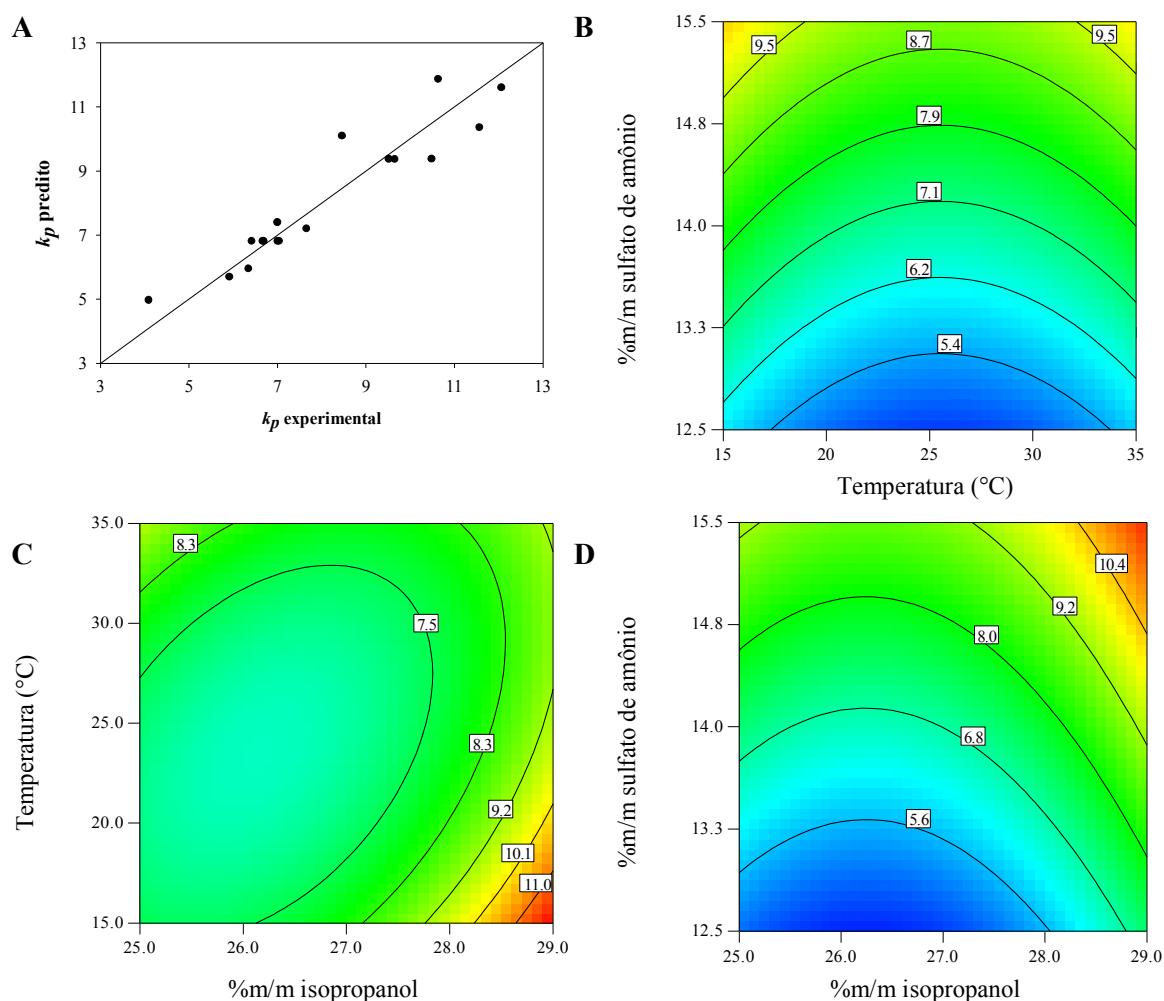
| Fonte de variação | Grau de liberdade | Quadrado médio | F-valor | p-valor |
|-------------------|---------------------------|----------------|----------------|-------------------------------|
| Regressão | 6 | 11,68705 | 13,21 | 0,0003* |
| Resíduo | 10 | 0,88455 | | |
| Total corrigido | 16 | | $R^2 = 0,8880$ | $R^2_{\text{ajust}} = 0,8208$ |
| Coeficientes | Estimativa do coeficiente | Desvio padrão | t-valor | p-valor |
| <i>Intercepto</i> | 210,110 | 84,780 | 2,48 | 0,0326* |
| x_1 | -17,951 | 6,209 | -2,89 | 0,0161* |
| x_2 | 1,467 | 0,222 | 6,62 | <0,0001* |
| x_3 | 0,892 | 0,676 | 1,32 | 0,2164 |
| $x_1 \cdot x_3$ | -0,056 | 0,024 | -2,38 | 0,0385* |
| x_1^2 | 0,369 | 0,114 | 3,22 | 0,0091* |
| x_3^2 | 0,012 | 0,005 | 2,65 | 0,0241* |

Fonte: Dos autores (2019).

Nota: * significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Para melhor ilustrar o efeito combinado dos fatores sobre o coeficiente de partição de saponina, curvas de contorno da superfície gerada a partir do modelo ajustado são apresentadas na Figura 1B-D, na qual observa-se o efeito de um par de fatores, mantendo-se o terceiro fator fixo em seu nível médio (nível 0). Verifica-se que os valores de k_p aumentam significativamente: nos extremos de temperatura (15 e 35 °C) e maior concentração de sulfato de amônio (15,5 %m/m) em concentração média de isopropanol (27 %m/m) (Figura 1B); próximos à maior concentração de isopropanol (29 %m/m) e menor temperatura (15 °C) em concentração média de sulfato de amônio (14 %m/m) (Figura 1C); e próximos às maiores concentrações de isopropanol e de sulfato de amônio (29 e 15,5 %m/m, respectivamente) a temperatura média (25 °C) (Figura 1D).

Figura 1 – Resultados reais versus preditos (A) e curvas de contorno para o modelo ajustado (Eq. 2) a 27% m/m de isopropanol (B), 14 %m/m de sulfato de amônio (C) e 25 ° C (D).



A presença de termos quadráticos e de interação no modelo ajustado (Eq. 2) indica que a influência dos fatores avaliados sobre a partição de saponina em SAB não é uma relação linear simples. O aumento de k_p com aumento da concentração de isopropanol (Figura 1C e D) pode estar associado ao aumento da concentração de álcool na fase superior, que deve ter intensificado as interações atrativas (ligações de hidrogênio e hidrofóbicas) com as moléculas de saponina, favorecido sua distribuição na fase superior. Já o aumento de k_p com aumento da concentração de sulfato de amônio (Figura 1B e D) se deve ao efeito de *salting-out*, uma vez que mais íons competem com o surfactante pelas moléculas de água à medida que a concentração de sal aumenta (HE *et al.*, 2018). Como resultado, moléculas de isopropanol e saponina são transferidas da fase inferior para fase superior.

Com base no modelo ajustado (Eq. 2), a partição de saponina em SAB foi otimizada pela análise de superfície de resposta. A condição experimental ótima predita foi 28,7 %m/m de isopropanol, 15,2 %m/m de sulfato de amônio a 15,4 °C; a qual levaria a um coeficiente de partição de saponina máximo de 12,7. A verificação experimental foi realizada em triplicata sob a condição ótima predita, tendo sido obtido $k_p = 10,3 \pm 0,3$. O experimento de verificação indica que o modelo proposto em função da composição do sistema (concentrações de isopropanol e sulfato de amônio) e da temperatura do processo reflete razoavelmente a otimização desejada.

Conclusão

Saponina de *Quillaja* migrou preferencialmente para fase rica em álcool, resultando em coeficientes de partição superiores a 4,1 nas diferentes condições avaliadas. A partição do surfactante nos sistemas foi influenciada pela composição do sistema e pela interação entre a concentração de álcool e a temperatura. A significância do modelo ajustado e dos coeficientes de regressão (p-valor < 0,05), e o coeficiente de determinação do modelo ($R^2 = 88,80\%$) indicam que a equação ajustada foi adequada para prever o coeficiente de partição de saponina dentro dos intervalos de composição e temperatura avaliados. A validação realizada sob as condições ótimas (28,7 %m/m de isopropanol, 15,2 %m/m de sulfato de amônio a 15,4 °C) resultou em coeficiente de partição experimental igual a $10,3 \pm 0,3$ (média \pm desvio, n = 3), sendo o valor de partição predito pelo modelo matemático igual a 12,6, indicando que o modelo obtido reflete razoavelmente a otimização desejada.

Agradecimentos

À PRPq/UFMG pelo apoio financeiro e à FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica.

Referências

- BÖTTCHER, Sandra; DRUSCH, Stephan. Saponins — Self-assembly and behavior at aqueous interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 105–113, 2017.
- DA SILVA, Caroline Gracia Finkler. **Estudo de técnicas de extração de saponinas do fruto de erva mate** (*Ilex paraguariensis* St. Hill). p. 107, 2016.
- DINI, Irene; TENORE, Gian Carlo; DINI, Antonio. Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 411–419, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.053>. Acesso em: 15 maio.2019.
- GOLEMANOV, Konstantin *et al.* Surface shear rheology of saponin adsorption layers. **Langmuir**, v. 28, n. 33, p. 12071–12084, 2012.

- HE, Ai *et al.* Extraction of bioactive ginseng saponins using aqueous two-phase systems of ionic liquids and salts. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 270–280, 2018.
- KEZWON, Aleksandra; WOJCIECHOWSKI, Kamil. Interaction of Quillaja bark saponins with food-relevant proteins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 185–195, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.005>. Acesso em: 26 maio.2019.
- LIANG, Qing *et al.* Extraction and Separation of Eight Ginsenosides from Flower Buds of Panax Ginseng Using Aqueous Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction Coupled with an Aqueous Biphasic System. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 778, 2019.
- OSBOURN, Anne; GOSS, Rebecca J M; FIELD, Robert A. The saponins-polar isoprenoids with important and diverse biological activities. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1261–1268, 2011.
- WU, Xiangyang *et al.* Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 443–453, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>. Acesso em: 26 maio.2019.