

## Capítulo 8

### Avaliação preliminar da partição de surfactante natural em sistema aquoso bifásico

Jonatas Ferreira Santana dos Santos \*<sup>1</sup>; Ana Clara Rocha Caldeira<sup>2</sup>; Janaína Teles de Faria<sup>3</sup>

#### Resumo

Este trabalho objetivou realizar uma avaliação preliminar da partição da saponina de *Quillaja* em sistema aquoso bifásico (SAB) composto por isopropanol e sulfato de magnésio em diferentes temperaturas. O efeito da composição e da temperatura sobre o coeficiente de partição do biossurfactante foi avaliado por meio da metodologia de superfície de resposta segundo delineamento de Box-Behnken. Coeficientes de partição entre 4,9 a 12,9 foram obtidos, indicando maior afinidade do biossurfactante pelo álcool. Verificou-se o efeito significativo da composição do SAB e temperatura sobre esse parâmetro de partição. A análise de superfície de resposta a partir do modelo obtido indicou que as melhores condições para partição de saponina são 21 a 22 %m/m de isopropanol, 13,5 a 14 %m/m de sulfato de magnésio e 27 a 35 °C de temperatura.

**Palavras-chave:** Biossurfactante. Box-Behnken. Extração líquido-líquido. Saponina de *Quillaja*. Superfície de resposta.

#### Introdução

Um surfactante natural que vem sendo bastante estudado nos últimos anos devido a sua ampla gama de atividades biológica e funcional é a saponina (YENDO *et al.*, 2010), as quais são encontradas em uma grande variedade de plantas e algumas espécies de animais marinhos (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2014). Uma das principais fontes de saponina para uso industrial e biotecnológico é a casca da *Quillaja saponaria* Molina, espécie nativa do Chile (RUIZ *et al.*, 2017).

A saponina da casca de *Quillaja* tem sido utilizada na indústria de alimentos como agente espumante em bebidas e agente emulsificante em produtos emulsionados, sendo sua utilização facilitada pela aprovação para consumo humano em países como EUA e Japão e pela União Europeia (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2014).

---

<sup>1</sup> Estudante de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>2</sup> Estudante de Engenharia Agrícola e Ambiental, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup> Docente do curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

Os extratos comercializados da saponina de *Quillaja* geralmente contêm uma grande variedade de outras substâncias que são coextraídas juntamente com as saponinas, como oligossacarídeos, vitaminas, proteínas, peptídeos e aminoácidos. A coextração de outras substâncias diferentes da saponina leva à necessidade de processos de purificação a fim de se obterem extratos dessa saponina com maior índice de pureza. Diferentes técnicas cromatográficas e de adsorção em leito expandido e resina macro porosa têm sido aplicadas para separar as saponinas dos contaminantes (HE *et al.*, 2018). No entanto, alguns processos/métodos inevitavelmente acabam onerando os custos de produção por consumirem grande quantidade de solventes orgânicos e necessitarem de equipamentos sofisticados.

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB) têm se destacado como uma importante tecnologia emergente nos processos de extração e purificação de biomoléculas (WU *et al.*, 2011). SAB compostos por álcoois de cadeia curta e sais inorgânicos apresentam uma série de vantagens como baixa tensão interfacial, baixa viscosidade das fases, facilidade de escalonamento e baixo consumo de energia (WU *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2012; LIU; FENG; ZHAO, 2013). Além da possibilidade de reciclagem de seus componentes por meio de processos de evaporação e de cristalização (GUO *et al.*, 2012; SHOW *et al.*, 2013).

No entanto, antes de propor uma metodologia de purificação de saponina de *Quillaja* utilizando-se SAB é essencial conhecer a sua distribuição nesses sistemas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação preliminar da partição da saponina de *Quillaja* em SAB composto por isopropanol e sulfato de magnésio em diferentes temperaturas. O efeito da composição e da temperatura sobre o coeficiente de partição do biossurfactante foi avaliado por meio da metodologia de superfície de resposta.

## **Material e métodos**

### *Materiais*

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

### *Partição de saponina em sistema aquoso bifásico*

Os experimentos de partição foram conduzidos em tubos graduados de 15 mL, nos quais sistemas de 8,0 g foram preparados pela adição de massas adequadas de água, isopropanol e sal (solução estoque 20% m/m) de acordo com as concentrações pré-definidas pelo delineamento experimental. A todos os sistemas foram adicionados 100 µL de solução de saponina (30 mg/mL). Os tubos foram homogeneizados em vortex e deixados em repouso por 1 h em estufa BOD, na temperatura de trabalho, para que atingissem o equilíbrio. Em seguida as fases foram cuidadosamente separadas para posterior determinação da concentração de saponina.

### *Determinação da concentração de saponina*

A concentração de saponina total foi determinada pelo método colorimétrico de vanilina-ácido sulfúrico com modificações (HIAI; OURA; NAKAJIMA, 1976). Uma alíquota de 250 µL de amostra (fase superior e inferior) foi misturada a 250 µL de vanilina (8 % m/v) e 2 mL de ácido sulfúrico (73,5 % m/v), em banho de gelo. Em seguida a mistura foi aquecida a 60 °C por 15 minutos e resfriada em banho de gelo por 10 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 550 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. A concentração de saponina total foi determinada a partir de uma curva padrão obtida previamente.

### *Delineamento experimental e análise estatística*

O modelo obtido foi avaliado em termos da significância do modelo ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e significância dos coeficientes ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no *software* estatístico gratuito SAS University®.

## **Resultados e discussão**

O coeficiente de partição de saponina de *Quillaja* foi determinado em sistemas com diferentes composições (isto é, diferentes concentrações dos componentes formadores de fase) e temperaturas, conforme matriz experimental do delineamento de Box Behnken (Tabela 1). Como pode ser observado na Tabela 1, o biossurfactante concentrou-se na fase superior ( $k_p > 1$ ), fase rica em isopropanol. Tal resultado pode estar associado às interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio

entre as hidroxilas das moléculas de álcool e saponina de *Quillaja*, uma vez que é composta por cadeias de açúcares, como glicose, galactose, xilose, raminose, arabinose e ácido glucurônico (KEZWON; WOJCIECHOWSKI, 2014).

Tabela 1 – Condições experimentais do delineamento de Box Behnken com pontos axiais para partição de saponina e respostas (coeficiente de partição) experimental e estimada pela Eq. 1

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente		
	Concentração	Concentração	Temperatura (°C)	$k_p$ experimental	$k_p$ estimado	Módulo de erro relativo (%)
	de álcool (%m/m) $x_1$	de sal (%m/m) $x_2$				
1	18,0	12,0	25	5,4	5,8	8,3
2	18,0	14,0	25	8,1	7,9	2,3
3	22,0	12,0	25	7,3	7,7	5,8
4	22,0	14,0	25	12,9	12,6	2,0
5	18,0	13,0	15	5,2	5,0	4,0
6	18,0	13,0	35	6,7	7,1	5,5
7	22,0	13,0	15	7,1	7,0	1,2
8	22,0	13,0	35	11,1	11,7	5,0
9	20,0	12,0	15	4,9	5,1	3,6
10	20,0	12,0	35	7,7	7,2	6,8
11	20,0	14,0	15	6,5	7,3	12,4
12	20,0	14,0	35	11,7	11,9	1,9
13	20,0	13,0	25	6,7	7,0	4,7
14	20,0	13,0	25	6,7	7,0	4,7
15	20,0	13,0	25	7,0	7,0	0,3
16	20,0	13,0	25	7,2	7,0	2,5
17	20,0	13,0	25	6,9	7,0	1,7

Fonte: dos autores (2019).

O SAB composto por isopropanol e sulfato de magnésio nas condições de composição e temperatura avaliadas apresentou coeficiente de partição bastante inferior aos valores reportados por

He *et al.* (2018), que, ao avaliaram o processo de extração de saponinas de *Panax ginseng* em SAB constituídos por diferentes líquidos iônicos e sais, obtiveram valores de  $k_p > 100$ . Por outro lado, os valores de  $k_p$  obtidos no presente estudo foram mais promissores do que os valores obtidos por Liang *et al.* (2019), que avaliaram SAB constituídos por líquido iônico/sulfato de amônio ( $k_p = 1,97$ ) e líquido iônico/fosfato monossódico ( $k_p = 3,04$ ).

A partir da Tabela 1, verifica-se que alterações na temperatura e na composição do sistema afetaram o coeficiente de partição de saponina, o qual variou no intervalo de 4,9 a 12,9. Regressões lineares múltiplas foram aplicadas aos valores de  $k_p$  em função dos fatores experimentais (composição do SAB e temperatura), sendo obtido o seguinte modelo de 2ª ordem, apresentado na Equação 1:

$$k_p = 303,439 - 11,254 x_1 - 29,146 x_2 - 1,291 x_3 + 0,032 x_1 \cdot x_3 + 0,063 x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Eq. 1}) \\ + 0,357 x_1 \cdot x_2 + 0,166 x_1^2 + 0,853 x_2^2$$

sendo  $x_1$  a concentração de isopropanol (% m/m),  $x_2$  a concentração de sulfato de magnésio (% m/m) e  $x_3$  a temperatura (°C).

A análise de variância (Tabela 2) revelou que o modelo ajustado (Eq. 1) foi altamente significativo (p-valor < 0,0001) e o coeficiente de determinação foi elevado (97,77%), demonstrando que o modelo ajustado pode ser adequado para explicar os efeitos dos fatores avaliados (composição dos sistemas e temperatura) sobre a variável resposta (coeficiente de partição). Ao nível de 95% de confiança, todos os coeficientes de regressão do modelo ajustado foram estatisticamente significativos (p-valor < 0,05), sendo, portanto, verificado efeito dos termos lineares das variáveis concentração de isopropanol ( $x_1$ ), concentração de sulfato de magnésio ( $x_2$ ) e temperatura ( $x_3$ ), dos termos quadráticos da composição do sistema (ou seja,  $x_1$  e  $x_2$ ) e das interações dupla dos três fatores experimentais avaliados.

Para melhor avaliação do modelo proposto, apresentam-se na Tabela 1 os valores de coeficiente de partição estimado bem como o erro relativo. Nota-se que não houve uma dispersão acentuada entre os valores experimentais e estimados pelo modelo, exceto para o ensaio 11 (SAB composto por 20 e 14 %m/m de isopropanol e sulfato de magnésio, respectivamente, a 15 °C), o qual apresenta um erro relativo (absoluto) maior (12,4 %). O erro relativo médio dos ensaios foi inferior a 5%.

Com base no modelo proposto (Eq. 1) foram construídas superfícies de resposta e de contornos apresentadas na Figura 1, na qual é possível visualizar a relação entre as variáveis avaliadas

(temperatura, concentração de isopropanol e concentração de sulfato de magnésio) e a variável resposta ( $k_p$ ).

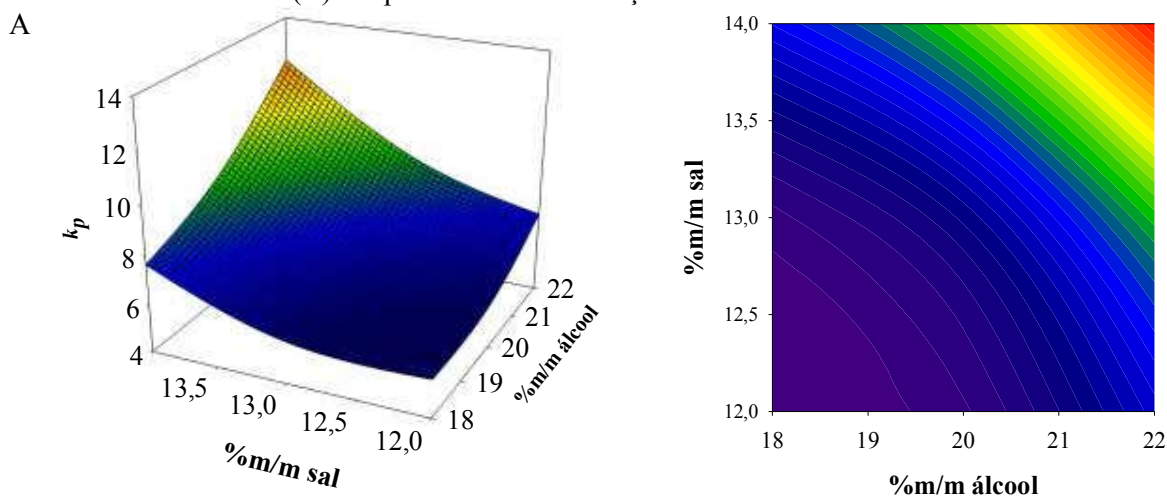
Tabela 2 – ANOVA e resultados do teste de significância para os coeficientes de regressão do modelo ajustado

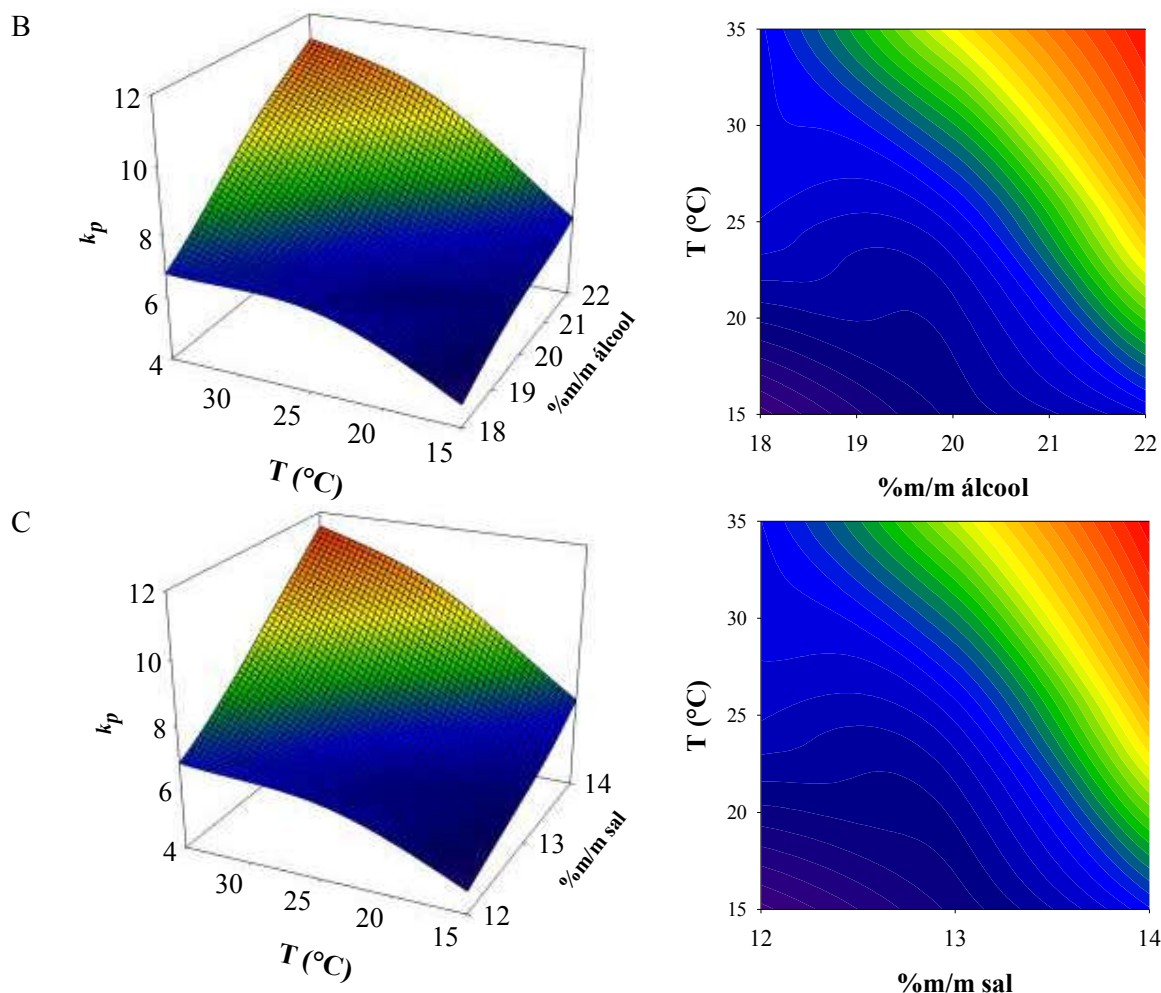
Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio	F-valor	p-valor
Regressão	8	9,840793	42,56164	< 0,0001*
$x_1$	1	21,08602	91,19747	< 0,0001*
$x_2$	1	24,38813	105,4792	< 0,0001*
$x_3$	1	22,78125	98,52938	< 0,0001*
$x_1 \cdot x_2$	1	2,042041	8,83187	0,0178*
$x_1 \cdot x_3$	1	1,625625	7,030862	0,0292*
$x_2 \cdot x_3$	1	1,600225	6,921007	0,0301*
$x_1^2$	1	1,853307	8,015591	0,0221*
$x_2^2$	1	3,068716	13,27226	0,0066*
Resíduo	8	0,231213		
Total corrigido	16			

Fonte: dos autores (2019).

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

Figura 1 – Superfícies de resposta para os efeitos de interação das variáveis sobre  $k_p$ : (A) concentrações de álcool e sal a 25 °C, (B) temperatura e concentração de sal a 20 %m/m de álcool e (C) temperatura e concentração de álcool a 13 %m/m de sal





Fonte: dos autores (2019).

Observa-se na Figura 1 que as faixas ótimas das variáveis estudadas para particionar saponina de *Quillaja* no SAB avaliado foram: 21 a 22 %m/m de isopropanol, 13,5 a 14 %m/m de sulfato de magnésio e 27 a 35 °C de temperatura.

### Conclusão

Verificou-se que as moléculas de saponina de *Quillaja* particionam preferencialmente para fase superior em SAB compostos por isopropanol e sulfato de magnésio na faixa de temperatura de 15 a 35 °C, indicando maior afinidade entre as moléculas do biossurfactante e o álcool. Constatou-se que a composição do sistema (em termos das concentrações de sal e álcool) e a temperatura são parâmetros que influenciam a partição de saponina no SAB de forma significativa, sendo obtido um modelo significativo para estimar os valores do coeficiente de partição em função desses fatores. A

região que maximiza o coeficiente de partição foi determinada, compreendendo a faixa de 21 a 22 %m/m de isopropanol, 13,5 a 14 %m/m de sulfato de magnésio e temperaturas entre 27 a 35 °C.

### Agradecimentos

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

### Referências

- GUO, W. *et al.* Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of hydrophilic alcohols (ethanol/2-propanol/1-propanol) and MgSO<sub>4</sub>/ZnSO<sub>4</sub> at (303.15 and 313.15) K and correlation. **Thermochimica Acta**, v. 546, p. 8–15, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2012.07.022>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- HE, A. *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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.05.041>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- HIAI, S.; OURA, H.; NAKAJIMA, T. Color Reaction of Some Sapogenins and Saponins With Vanillin and Sulfuric Acid. **Planta Medica**, v. 29, n. 02, p. 116–122, 1976. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1097639>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- KEZWON, A.; WOJCIECHOWSKI, K. 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: 12 jun. 2019.
- LIANG, Q. *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. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24040778>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- LIU, Y.; FENG, Y. Q.; ZHAO, Y. Liquid-liquid equilibrium of various aqueous two-phase systems: Experiment and correlation. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 58, n. 10, p. 2775–2784, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/je400453b>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- REIS, I. A. O. *et al.* Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2453–2461, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.010>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- RUIZ, K.B. *et al.* Quinoa seed coats as an expanding and sustainable source of bioactive compounds: An investigation of genotypic diversity in saponin profiles. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 156–163, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.007>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- SHOW, P. L. *et al.* Recovery of lipase derived from Burkholderia cenocepacia ST8 using sustainable aqueous two-phase flotation composed of recycling hydrophilic organic solvent and inorganic salt. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 112–118, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.018>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- WOJCIECHOWSKI, K. *et al.* Effect of  $\beta$ -casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 208–216, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.010>. Acesso em: 12 jun. 2019.
- WU, X. *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: 12 jun. 2019.

YENDO, A.C.A. *et al.* Production of plant bioactive triterpenoid saponins: Elicitation strategies and target genes to improve yields. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 94-104. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9257-6>. Acesso em: 12 jun. 2019