UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Programa de Pós-Graduação de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos
Escola de Química

Tese de Doutorado

Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira

Bernardo Dias Ribeiro

RIO DE JANEIRO
MARÇO/2012

ESTRATÉGIAS DE PROCESSAMENTO VERDE DE SAPONINAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Bernardo Dias Ribeiro

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadores:

Profª. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.

Prof. Daniel Weingart Barreto, D. Sc.

RIO DE JANEIRO

MARÇO/2012

ESTRATÉGIAS DE PROCESSAMENTO VERDE DE SAPONINAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Bernardo Dias Ribeiro

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

Aprovada em 23 de março de 2012.

Profª. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc. – EQ/UFRJ
(Orientadora)

Prof. Daniel Weingart Barreto, D. Sc. – EQ/UFRJ
(Orientador)

Profª. Celuta Sales Alviano, D. Sc. – IMPG/UFRJ

Profª Claudia Regina Elias Mansur, D. Sc. – IMA/UFRJ

Profª Isabel Maria Delgado Jana Marrucho Ferreira, Ph.D. – ITQB/UNL, Portugal

Profª. Karen Signori Pereira, D. Sc. – EQ/UFRJ

Profª. Suely Pereira Freitas, D. Sc. – EQ/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Quatro anos é muito tempo. Muita coisa acontece.

Nunca imaginei ao começar o Doutorado o quanto as coisas iriam mudar em 4 anos, o quanto eu iria mudar. Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de evoluir como pessoa, de ser mais compreensivo, paciente e atencioso com os meus próximos.

Nesses 4 anos, eu casei com minha querida Aline, companheira de todos os momentos proporcionados pela tese ou não. Sua ternura, calma, paz, amor e apoio com certeza influenciaram na minha evolução como pessoa. Te amo muito.

Aprendi que a família é mais importante do que o trabalho, porque é a família que realmente te dá o suporte nas horas difíceis. Agradeço a vocês por tudo que me ensinaram na vida: minha mãe Sonia, que apesar de todos os obstáculos encontrados na vida, sempre teve fibra para me ensinar um homem sério e responsável; meu avô Afrânio, que me deu o exemplo de como ser persistente e sempre lutar pelos seus objetivos na vida; minha avó Maria, que me ensinou a ser bom com as pessoas e sempre ajudar o próximo que estiver necessitado; meu tio Afrânio, que me ensinou a gostar de futebol e do Botafogo. Aos demais familiares, obrigado por vocês existirem na minha vida, e torcerem pela minha felicidade.

Aprendi que a vida nunca é previsível, e que a saudade é inevitável. Um grande abraço e um beijo para avô José, tia Marília e tia Zelinda, que vocês estejam nos braços de Deus.

Durante esse tempo, eu aprendi muito, não só sobre produtos naturais, enzimas, líquidos iônicos e tecnologias limpas, mas também sobre pessoas, e quanto elas podem ser complexas.

Aprendi que amizade não tem idade, mas que nem todos querem ser seu amigo.

Aprendi que algumas amizades são eternas, e que elas fazem falta.

Aprendi que não sou uma pessoa focada, mas sim multifocal.

Percebi que muitos sentem realmente minha falta, e que torcem pelo meu sucesso.

Nesses 4 anos, comecei com dois orientadores, quase fiquei sem e depois cheguei a ter 3, mas no fim continuei com os mesmos do inicio: Prof. Daniel Barreto, e Profª Maria Alice. Ambos eu conheço desde 2003. Prof Daniel foi quem me ensinou a pensar industrialmente, a visualizar um processo, e de como “vender” uma idéia. Prof Alice foi quem me acolheu, e quem confiou no meu potencial, me dando a oportunidade de cooperar na organização do material do livro, e de ainda ser um dos seus autores, mesmo sendo aluno de graduação. Além disso, me ensinou como deve ser um pesquisador, e me deu recentemente a oportunidade de fazer um estágio doutoral em Portugal junto a Prof Isabel Marrucho, para que se possa desenvolver uma linha de pesquisa sobre liquidos iônicos, e de ir a um Congresso Internacional. Por isso, é justo lhe chamar de “madrinha cientifica”.

Convivi com muitas pessoas nesses quatro anos, dentro e fora da UFRJ:

- Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos, E-103, EQ/UFRJ: Mariana, Patrícia, Marcelle, Raquel, Roseli, Roberta, Thiana, Priscilla, Gizele, Ana Iraidy, André, Luana, Kelly, Tatiana, Ariane, Verônica, Lívia, Conrado, Diego, Naíra, Raísa, Yang, Pedro, Renata, Natália, Hélio, Aline, Daniel Torres e todos os outros, agradeço pelo ambiente agradável de trabalho e pela convivência pacifica;

- Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais, I-160, EQ/UFRJ: Josélia, Fábio, Eduardo, Thiago, Udson, Bruno, Daniel Lima, pela ajuda quando foi necessário, e também pela convivência pacifica e divertida;

- Laboratório de Termodinâmica Molecular, ITQB/UNL: Prof Isabel Marrucho, Liliana, Filipa, Filipe, João, Ana Belém, Rui e Helga pela recepção positiva que tive de todos, pelo aprendizado com os liquidos iônicos, e espero continuar o contato com todos vocês;

- Profª Suely Freitas, EQ/UFRJ: agradeço por ter me auxiliado no momento que fiquei praticamente órfão, onde me cedeu aluno de IC, comprou reagentes e ainda me aceitou como co-orientador de projeto final;

- Prof Márcio Nele, EQ/UFRJ: agradeço por ter permitido o uso do tensiomêtro no Laboratório de Engenharia Química, nas várias vezes que precisei;

- Prof Fernando Pellegrini, e Fábio Pedro, EQ/UFRJ: agradeço por ter me emprestado o bolhômetro e rotâmetro;

- Profª Denise Freire, e Bruno, IQ/UFRJ: agradeço por ter permitido e me auxiliado no uso do sistema de ultrafiltração no Laboratório de Biotecnologia Microbiana;

- Profª Ana Cláudia Vieira, FF/UFRJ: agradeço por sua grande ajuda ao fazer as análises para confirmação de espécies das plantas trabalhadas, e além disso, pela grande amizade que obtive;

- Profª Daniela Alviano, IM/UFRJ: agradeço pela cooperação ao realizar as análises de atividade antimicrobiana de todas as amostras de saponinas;

- Ricardo Reis, Coordenador de Coleções Vivas do Jardim Botânico, por ter cedido 3 folhas de sisal (*Agave sisalana*);

A todas as demais pessoas que contribuíram, direta e indiretamente, para que o presente texto pudesse ser desenvolvido;

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite;

A CAPES, pela bolsa de doutorado concedida (03/2008-11/2009);

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida; (12/2009 -02/2010);

A FAPERJ, pela bolsa de doutorado NOTA DEZ concedida; (03/2010 -02/2012).

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

Dalai Lama

Resumo da proposta de pesquisa apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ) como parte integrante do Exame de Qualificação para o Doutorado.

RIBEIRO, Bernardo Dias**. Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Saponinas, glicosídeos amplamente distribuídos na natureza, incluem um grupo diverso de compostos caracterizados por sua estrutura triterpênica ou esteroidal e um ou mais açúcares a esta ligada através de glicosilações. Sua diversidade estrutural é refletida por suas propriedades físico-quimicas (formação de espuma, emulsificação, solubilização, adoçante, amargor) e biológicas (hemolítico, antimicrobiano, molusquicida, inseticida, ictiocida), que são exploradas em várias aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica e também em biorremediação de solos. Algumas plantas, como *Quillaja saponaria* e *Yucca schidigera*, são exploradas comercialmente para extração de saponinas, utilizadas na emulsificação de bebidas ou em síntese de drogas esteroidais. As duas plantas, porém, não são brasileiras: a *Quillaja saponaria* é nativa do Chile e a *Yucca schidigera*, do Mexico.
Os objetivos desta tese consistem na busca por matérias-primas vegetais oriundas da agrobiodiversidade brasileira que possuam saponinas com potencial de aproveitamento econômico. Para isso, duas plantas, no máximo, serão selecionadas pela comparação das suas propriedades fisico-químicas e antimicrobianas, e estas serão caracterizadas e utilizadas como matéria-prima para o estudo e desenvolvimento de métodos de extração e concentração verdes das saponinas. Posteriormente, serão realizados testes de aplicação das saponinas como ativador e/ou inibidor enzimático para uso em alimentos e/ou cosméticos.
Das 38 plantas avaliadas por critérios tais como teor de saponinas e seus respectivos índices de emulsificação, tensão superficial, atividade antimicrobiana, além da sua sustentabilidade, duas foram escolhidas: juá e sisal. Com isso, foi realizada a caracterização destas saponinas, determinando suas concentrações micelares críticas (CMCs), 1,11 e 0,54 g/L, respectivamente, e avaliando a sua variação pela influência de pH, temperatura e concentração de NaCl; atividade antioxidante, complexação com colesterol e composição das saponinas por espectrometria de massas. Foram testados métodos de extração com etanol 30%, líquidos iônicos, solventes eutéticos, além da extração micelar com Triton X-100 e com auxilio de ultrassom. Destes métodos, a extração micelar tendo como condições em relação as saponinas de juá: 38,8ºC; 1 h; 0,272 (relação juá/solvente), 300 rpm, 15% Triton; e em relação as saponinas de sisal: 50ºC; 4 h; 0,166 (relação sisal/solvente), 200 rpm, 7,5% Triton, obteve recuperações de 90,8 e 98,4%, respectivamente, sendo o método escolhido para concentração por ponto de névoa. A extração orbital simples, com mais 2 reextrações, em condições similares, foi mantida para estudo dos métodos de concentração por coluna de espuma e separação por membranas. Dentre os métodos de concentração estudados, o de ponto de névoa obteve a maior seletividade, com uso de carbonato de sódio 20% para a separação bifásica, e Amberlite FPX-66 em condições diferentes para as saponinas de juá (46,8ºC e 25,1%) e de sisal (40,8ºC e 25,4%) durante 30 min para remoção do Triton, tendo como fatores de concentração 10,6 e 6,6, respectivamente. Com os testes de alteração de atividade enzimática, hidrólise s síntese, as saponinas podem ser aplicadas em alimentos ricos em proteínas, favorecendo a produção de hidrolisados protéicos; aditivo para hidrólise de materiais amiláceos; auxiliar na síntese de ésteres de cadeia curta; fármacos antiobesidade e ativos cosméticos *antiaging*.

Abstract of the research proposition presented to the Escola de Química of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (EQ/UFRJ) as one of the requirements to fulfill the Qualifying Examination for the Doctorate.

RIBEIRO, Bernardo Dias**. Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira**. Rio de Janeiro, 2012. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Saponins, glycosides largely distributed in nature, include a diverse group of compounds characterized by their structure with a steroidal or triterpenic aglicone and one or more sugar molecules bound to the aglycone through glycosydic linkages. This structural diversity is reflected by their physicochemical (foaming, emulsification, solubilization, sweetening, bitterness) and biological properties (hemolytic, antimicrobial, molluscacide, insecticide, ictyocide), which are explored in many applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries and also in soil bioremediation. Some plants, as *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera*, are commercially explored for saponin extraction and are used in emulsification of beverages or in steroidal drugs synthesis. However, both are not Brazilian species: the *Quillaja saponaria* is from Chile and the *Yucca schidigera*, from Mexico.
The aims of this thesis consist in the search of vegetable raw materials obtained from the Brazilian agrobiodiversity which have saponins with potential for economic explotation. Thus, two plants will be selected by comparison of their physicochemical and antimicrobial properties, and these will be characterizated and used as raw material for the study and development of green extraction and concentration methods of saponins. Afterly, tests for saponin application as enzymatic activator and/or inhibitor for use in food and cosmetics were carried out.
From 38 plants evaluated by criteria such as saponins content and their corresponding emulsification index, surface tension, antimicrobial activity, besides of sustainability, two were chosen: juá and sisal. Then, the saponins were characterized, determining their critical micellar concentrations (CMCs), 1.11 and 0.54 g/L, respectively, and evaluating their variation due to influence of pH, temperature and NaCl concentration; besides their antioxidant activity, cholesterol complexation and saponin composition by mass spectrometry. Extraction methods were tested with ethanol 30%, ionic liquids, eutectic solvents, besides micellar extraction with Triton X-100 and assisted by ultrasound. From these methods, micellar extraction with conditions related to juá saponins: 38.8ºC; 1 h; 0.272 (juá/solvent), 300 rpm, 15% Triton; and related to sisal saponins: 50ºC; 4 h; 0.166 (sisal/solvent), 200 rpm, 7.5% Triton, had obtained recoveries of 90.8 and 98.4%, respectively, which it was chosen to continue in cloud point concentration. Orbital extraction, with two more reextractions in similar conditions, was maintained to the study of concentration methods foam cloumn and membrane separation. Between the concentration methods, cloud point concentration had the higher selectivity, with the use of sodium carbonate 20% for biphasic separation, and Amberlite FPX-66 in different conditions for juá (46.8ºC, 25.1%) and sisal (40.8ºC, 25.4%) saponins during 30 min for Triton removal, having as concentration factors 10.6 and 6.6, respectively. With tests of enzymatic activity modification, hydrolysis and synthesis, saponins can be applied in protein-rich food, favoring protein hydrolysates production; additive for hydrolysis of starchy materials; aid in the synthesis of short chain esters; antiobesity drugs and cosmectic antiaging active.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral de surfactantes 24
Figura 2 – Formas micelares (Rosen & Dahanayake, 2000) 25
Figura 3 - Estruturas de agliconas de saponinas esteroidais (R = oses) (Vincken *et al*, 2007) 30
Figura 4 - Estruturas de agliconas de saponinas triterpênicas (Vincken *et al*, 2007) 30
Figura 5 – Esquema geral da via do mevalonato (Dewick, 2009) 33
Figura 6 – Biossíntese das agliconas triterpênicas e esteroidais. Enzimas: LS (lupeol sintase); β-AS (β-amirina sintase); α-AS (α-amirina sintase); DS (damarenediol sintase); CS (cucurbitadienol sintase); CyS (cicloartenol sintase); LaS (Lanosterol sintase); EHC (Esqualeno-hopeno ciclase); ED (esterol demetilases: esterol 14-demetilase, esterol Δ^{14}-redutase e esterol C-4 demetilase) (Dewick, 2009) 34
Figura 7 – Orientações possíveis de saponinas na interface água-ar (Stanimirova *et al*, 2011) 36
Figura 8 – Esquema das alteraçãoes na membrana celular promovido pela interação saponina-colesterol (Augustin *et al*, 2011) 37
Figura 9 – Saponinas de raízes: (A) Ácido glicirrizínico, (B) Periandrina I, (C) Ginsenosídeo Rb1, (D) Fafosídeo B, (E) Betavulgarosídeo III 46
Figura 10 - Saponinas de bulbos e tubérculo: (A) Erubosídeo B (Alho); (B) Aliospirosídeo D (Cebola), (C) Saponina esteroidal de alho poró, (D) Saponina esteroidal de lírio; (E) Dioscina. 48
Figura 11 – Saponinas de cascas de tronco: (A) Saponina geral de quilaia (R pode ser xilose, ramnose ou apiose); (B) Jujubosídeo sulfatado; (C) Saponina 1 de unha-de-gato 50
Figura 12 – Saponinas de folhas: (A) Asiaticosídeo; (B) Hederasaponina C; (C) Teasaponina B1; (D) Matesaponina 1; (E) Dongnosídeo E; (F) Quadrangulosídeo 52
Figura 13 – Saponinas de flores: (A) Heliantosídeo 5, (B) Calendasaponina A 53
Figura 14 – Saponinas de frutos: (A) Terrestrosina J, (B) CAY-1, (C) Melongosídeo O, (D) Luciosídeo N 55
Figura 15 – Saponinas de sementes: (A) Escina II; (B) Amaranthus-saponina I; (C) Saponina triterpênica de quinoa; (D) Avenacosídeo B; (E) Pulsatilla saponina D (Guaraná); (F) Soyasaponina αg (encontrada em soja, grão-de-bico, ervilha, amendoim e lentilha); (G) Azukisaponina VI; (H) Phaseolosídeo I. 57
Figura 16 – Interface entre solução com bolhas e espuma em uma coluna de espuma 67
Figura 17 – Preparo do extrato rico em saponinas 70
Figura 18 – Determinação de CMC dos extratos ricos em saponinas através do tensiômetro. 93
Figura 19 – Determinação de CMC dos extratos ricos em saponinas pelo método turbidimétrico 93
Figura 20 - Curvas de contorno fixadas no ponto médio: efeitos de pH, temperatura e concentração salina sobre o CMC das saponinas de juá 96
Figura 21 - Curvas de contorno fixadas no ponto médio: efeitos de pH, temperatura e concentração salina sobre o CMC das saponinas de sisal 98
Figura 22 – Saponinas do juá (Tabela 19) 103
Figura 23 – Saponinas do sisal (Tabela 19) 104
Figura 24 – Espectro de massas da diosgenina 105
Figura 25 – Espectro de massa das saponinas do juá 106
Figura 26 - Espectro de massa das saponinas do sisal 107
Figura 27 – Avaliação das proporções entre água e etanol na extração das saponinas do juá. Parâmetros fixos deste ensaio de extração: Relação matéria-prima/solvente de 1/5 (0,2); 50ºC; 200 rpm; 4 horas. 108

Figura 28 – Avaliação das proporções entre água e etanol na extração das saponinas do resíduo mucilaginoso de sisal. Parâmetros fixos deste ensaio de extração: Relação matéria-prima/solvente de 1/5 (0,2); 50ºC; 200 rpm; 4 horas. 108
Figura 29 – Superfícies de resposta fixadas no ponto ótimo: efeitos de temperatura, relação juá/solvente e velocidade de agitação sobre a extração das saponinas de juá 110
Figura 30 – Avaliação da cinética de extração de saponinas do juá..... 111
Figura 31 – Avaliação da cinética de extração de saponinas do sisal 112
Figura 32 – Avaliação do número de reextrações de saponinas do juá e do sisal 113
Figura 33 – Diagramas de Pareto do planejamento de mistura para extração de saponinas de juá. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos) 116
Figura 34 – Curvas de contorno do planejamento de mistura para extração de saponinas de juá. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos) 116
Figura 35 - Diagramas de Pareto do planejamento de mistura para extração de saponinas de sisal. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos) 117
Figura 36 - Curvas de contorno do planejamento de mistura para extração de saponinas de sisal. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos) 117
Figura 37 – Cinética de extração de saponinas por solventes eutéticos. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)..... 118
Figura 38 – Influência da relação matéria-prima/solvente na extração de saponinas 119
Figura 39 - Influência da temperatura na extração de saponinas 119
Figura 40 – Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de saponinas do juá 120
Figura 41 - Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de (a) fenóis e (b) açúcares redutores..... 121
Figura 42 – Avaliação da variação da concentração de Triton X-100 sobre a recuperação de saponinas de juá..... 122
Figura 43 – Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de saponinas do sisal 122
Figura 44 – Avaliação da variação da concentração de Triton X-100 sobre a recuperação de saponinas de sisal 123
Figura 45 – Avaliação da capacidade de remoção de Triton X-100 dos extratos concentrados de sisal por adsorventes. (A) Sisal, (B) Juá 126
Figura 46 – Otimização da remoção de TritonX-100 das fases supramoleculares de sisal (A) e juá (B) 127
Figura 47 - Cinética de adsorção de Triton X-100 nas fases supramolculares de sisal (A) e juá (B)..... 127
Figura 48 – Otimização dos parâmetros da concentração de saponinas de juá por coluna de espuma 131
Figura 49 – Otimização dos parâmetros da concentração de saponinas de sisal por coluna de espuma 133
Figura 50 – Avaliação da vazão para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma..... 134
Figura 51 - Avaliação de pH para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma 135
Figura 52 - Avaliação da presença de anéis de Raschig para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma 135

Figura 53 – Operação de coluna da espuma. (A) Formação da espuma, (B) Coleta, (C) Início de instabilidade da espuma e (D) Fim do processo 136
Figura 54 – Cinética de concentração de saponinas de juá por coluna de espuma (A) utilizando um gradiente de vazão de ar (B) 137
Figura 55 - Cinética de concentração de saponinas de sisal por coluna de espuma (A) utilizando um gradiente de vazão de ar (B) 137
Figura 56 – Operação de um sistema de ultrafiltração em escala de bancada 138
Figura 57 – Cinética de concentração de saponinas por ultrafiltração 139
Figura 58 – Alteração da atividade amilásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 141
Figura 59 - Alteração da atividade proteásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 142
Figura 60 - Alteração da atividade lipásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 142
Figura 61 - Alteração da atividade da colagenase por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 144
Figura 62 – Alteração da atividade amilásica (A), proteásica (B) e lipásica (C) da pancreatina por diferentes teores de diosgenina e das agliconas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 145
Figura 63 - Alteração da atividade da colagenase por diferentes teores de diosgenina e das agliconas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 146
Figura 64 – Hidrólise de materiais protéicos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 147
Figura 65 - Hidrólise de materiais protéicos por papaína por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 147
Figura 66 - Hidrólise de gelatina por colagenase spor diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 148
Figura 67 - Hidrólise de matérias amiláceos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 149
Figura 68 - Hidrólise de matérias amiláceos por Stargen por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5% 150
Figura 69 - Hidrólise de materiais lipidicos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 151
Figura 70 - Hidrólise de materiais lipidicos por Lipozyme CALB por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 151
Figura 71 – Síntese enzimática de acetato de butila (A) e estearato de etila (B) por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5% 152
Figura 72 – Extratos metanólicos das plantas utilizadas nesta tese 182
Figura 73 - Atividade antimicrobiana por difusão em ágar. Resultados positivos, 17: Juá e 47: Alho 183
Figura 74 – MS/MS de alguns picos relativos as saponinas do sisal 184
Figura 75 – MS/MS de alguns picos relativos as saponinas do juá 185
Figura 76 – Extração de saponinas de sisal (A) e de juá (B) utilizando líquidos iônicos e análogos contendo ChCl/aditivo 1/2 molar, e co-solventes sendo a esquerda água e a direita etanol 30% 186
Figura 77 – Exemplos da aplicação de diferentes sais para concentração de saponinas de sisal (A) e de juá (B) por ponto de névoa. (1) citrato de sódio, (2) Na_2CO_3, (3) $NaHCO_3$, (4) $NaNO_3$, (5) $(NH_4)_2SO_4$ 187
Figura 78 – Interação das saponinas com lipase (seta vermelha) 187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de saponinas em algumas espécies vegetais 31
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de possíveis saponinas presentes em extratos vegetais 39
Tabela 3 – Exemplos de metabólitos extraídos por líquidos iônicos 63
Tabela 4 – Plantas utilizadas para o estudo de saponinas..... 68
Tabela 5 – Análise da variação de CMC utilizando planejamento composto central 78
Tabela 6 – Otimização da extração de saponinas do juá utilizando planejamento composto central.. 81
Tabela 7 – Planejamento de misturas de extração de saponinas por líquidos iônicos ou análogos..... 82
Tabela 8 – Otimização da adsorção de Triton dos extratos concentrados utilizando planejamento composto central 84
Tabela 9 – Planejamento composto central exploratório da concentração de saponinas por coluna de espuma..... 85
Tabela 10 - Planejamento composto central da concentração de saponinas por coluna de espuma.... 85
Tabela 11 – Comparação do teor e atividade surfactante das saponinas das matérias-primas utilizadas..... 89
Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos extratos por difusão em ágar 91
Tabela 13 – Comparação dos CMC dos extratos ricos em saponinas obtidos por dois métodos distintos..... 94
Tabela 14 – Resultados da análise da variação de CMC e tensão crítica dos extratos de juá e sisal utilizando planejamento composto central descrito na Tabela 5..... 94
Tabela 15 - ANOVAs com modelo completo e ajustado para variação do CMC do extrato de juá ... 95
Tabela 16 - ANOVAs com modelo completo e ajustado para variação do CMC do extrato de sisal . 97
Tabela 17 – Atividade Antioxidante dos extratos de juá e de sisal 99
Tabela 18 – Concentração inibitória mínima das saponinas de juá e de sisal 101
Tabela 19 – Dados de m/z de saponinas de juá e de sisal 102
Tabela 20 – Comparação dos rendimentos (saponinas, fenóis e açúcar redutores totais) da extração de saponinas de juá e de sisal utilizando planejamento composto central..... 109
Tabela 21 - ANOVA com modelo ajustado para extração de saponinas do juá 109
Tabela 22 - ANOVA com modelo ajustado para extração de saponinas do sisal 111
Tabela 23 – Comparação dos métodos de extração orbital simples e Soxhlet das saponinas de juá e de sisal..... 112
Tabela 24 - Comparação do poder extrativo de líquidos iônicos e análogos em relação a saponinas 114
Tabela 25 – Resumo da comparação dos métodos de extração das saponinas..... 123
Tabela 26 – Avaliação de sais na pré-concentração por ponto de névoa de saponinas de juá e de sisal 124
Tabela 27 – Avaliação da concentração de carbonato de sódio na pré-concentração por ponto de névoa de saponinas de juá e de sisal 125
Tabela 28 – Comparação dos rendimentos (saponinas, fenóis e açúcar redutores totais) da extração de saponinas de juá e de sisal utilizando planejamento composto central..... 127
Tabela 29 – Avaliação do reciclo de adsorvente para remoção de Triton X-100 128
Tabela 30 – Avaliação de alternativas ao Triton X-100 para separação bifásica aquosa de saponinas 129
Tabela 31 – Resultados do planejamento exploratório para concentração de saponinas por coluna de espuma..... 130
Tabela 32 – Comparação dos métodos de concentração de saponinas..... 139
Tabela 33 – Atividade enzimática da pancreatina e da colagenase sem adição de saponinas 140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
Ac	Anion Acetato
Amim	Cátion 1-Alil-3-metilimidazolio
APL	Anteprojeto de Lei
α-AS	α-Amirina sintase
β-AS	β-Amirina sintase
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHI	*Brain Heart Infusion*
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDB	Convenção sobre Diversidade Biológica
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
ChCl	Cloreto de Colina
CII	Concentração Inibitória Infinita
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMA	Centros Irradiadores de Manejo da Agrobiodiversidade
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI/NCCLS	*Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards*
CMC	Concentração Micelar Crítica
$C_n$mim	Cátion 1-alquil-3-metilimidazólio
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONABIO	Comissão Nacional de Biodiversidade
CS	Cucurbitadienol sintase
CyS	Cicloartenol sintase
DBU	1,8-diazabicicloundec-7-eno
dca	Anion dicianamida
DDMP	2,3-diidro-2,5-dihidroxi-6-metil-4*H*-piran-4-ona
DIMCARB	*N*,*N*-dimetilamonio *N'*,*N'*-dimetilcarbamato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazil
DS	Damarenediol sintase
EAM	Extração assistida por microondas
ED	Esterol demetilases
ED_{50}	Dose efetiva
EE	Esqualeno epoxidase
EGCG	Epigalocatequina galato
EHC	Esqualeno-hopeno ciclase
ELP	Extração líquida pressurizada
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER	Efetividade Relativa
ESI	Ionização por Eletrospray
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FPP	Pirofosfato de farnesila
Γ_{max}	Densidade superficial máxima
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranila
HPLC	*High Pressure Liquid Chromatography*
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBD	Instituto Biodinâmico
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

Imaflora	Instituto de Manejo e Certificação Florestal e Agrícola
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
IPP	Isopentenila difosfato
L.A.	Lírio híbrido das espécies longiflorum e asiático
LaS	Lanosterol sintase
LI	Líquidos iônicos
LS	Lupeol sintase
MEP	Metileritritol fosfato
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico
NTf_2	Anion bis(trifluorometilsulfonil)imida
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEG	Polietilenoglicol
PPBio	Programa de Pesquisa em Biodiversidade
PROBIO	Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Biodiversidade Brasileira
PROBIO II	Projeto Nacional de Ações Integradas Público-Privadas para Biodiversidade
PUC	Pontifícia Universidade Católica
PVPP	Polivinilpirrolidona insolúvel
Span 20	Monolaurato de sorbitana
TPP	Tiamina difosfato
Triton X-100	Etoxilato de octilfenol
Tween 80	Polioxietileno monooleato de sorbitana
UDP	Uridina-5’-difosfato
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC_2	Unidade Formadora de Colônia
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
Unifesp	Universidade Federal de São Paulo
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO 17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24

2.1) SURFACTANTES 24
2.1.1) Características Gerais 24
2.1.2) Propriedades 25
2.1.2.1) Formação de Espuma 25
2.1.2.2) Molhamento (*Wetting*) 26
2.1.2.3) Emulsificação e Dispersão 26
2.1.2.4) Adesão 26
2.1.2.5) Solubilização 26
2.1.2.6) Viscosidade 26
2.1.3) Classificação dos surfactantes 27
2.1.3.1) Sintéticos 27
2.1.3.1.1) Aniônicos 27
2.1.3.1.2) Catiônicos 27
2.1.3.1.3) Anfóteros 27
2.1.3.1.4) Não-Iônicos 28
2.1.3.2) Naturais 28
2.1.3.2.1) De origem microbiana 28
2.1.3.2.2) De origem vegetal 28

2.2) SAPONINAS 29
2.2.1) Tipos e Distribuição 29
2.2.2) Biossíntese 32
2.2.3) Propriedades 35
2.2.3.1) Propriedades micelares 35
2.2.3.2) Interações com Esteróis 36
2.2.3.3) Interações com Proteínas 41
2.2.3.4) Modificações estruturais 41
2.2.3.5) Toxidez 42
2.2.3.6) Atividade Antioxidante 43
2.2.3.7) Outras Propriedades 43

2.3) FONTES DE SAPONINAS 44
2.3.1) Raízes 44
2.3.2) Caules 47
2.3.3) Folhas 50
2.3.4) Flores 53
2.3.5) Frutos 53
2.3.6) Sementes 55

2.4) MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 58
2.4.1) Extração Micelar 58
2.4.2) Extração assistida por Energias Não-Térmicas 59
2.4.3) Extração por Solventes Pressurizados 61
2.4.4) Extração por Líquidos Iônicos 62

2.5) MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO 64
2.5.1) Separação por Membranas 65
2.5.2) Separação por Sistemas Aquosos Bifásicos 65
2.5.3) Fracionamento por Coluna de Espuma 66

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS 68

3.1) MATERIAIS 68

3.2) EQUIPAMENTOS 69

3.3) MÉTODOS ANALÍTICOS 69

3.3.1) Teor de Saponinas Totais 69
3.3.2) Teor de Compostos Fenólicos Totais (ou Fenóis Totais) 71
3.3.3) Teor de Açúcares Redutores Totais 71
3.3.4) Índice de Emulsificação 71
3.3.5) Tensão Superficial 72
3.3.6) Atividade Antimicrobiana 72
3.3.7) Concentração Micelar Crítica (CMC) 72
3.3.8) Atividade Antioxidante 72
3.3.9) Determinação do Colesterol 73
3.3.10) Determinação de Triton X-100 73
3.3.11) Produção de Agliconas por Hidrólise Ácida 73
3.3.12) Atividade Enzimática 74
3.3.13) Determinação do Grau de Hidrólise (e Síntese) 75

3.4) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 77
3.4.1) Screening de matérias-primas 77
3.4.2) Caracterização das Saponinas 78
3.4.3) Extração das Saponinas 80
3.4.4) Concentração das Saponinas 83
3.4.4.1) Pré-concentração por Ponto de Névoa 83
3.4.4.2) Coluna de Espuma 84
3.4.4.3) Separação por Membranas 86
3.4.5) Aplicação das Saponinas 86
3.4.5.1) Alteração de Atividade Enzimática 86
3.4.5.2) Hidrólise e/ou Síntese enzimática 87

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 88

4.1) SCREENING DE MATÉRIAS-PRIMAS 88
4.1.2) Seleção preliminar dos extratos 88
4.1.3) Atividade Antimicrobiana 90
4.1.4) Seleção Final 92

4.2) CARACTERIZAÇÃO DAS SAPONINAS 92
4.2.1) Concentração Micelar Crítica (CMC) 92
4.2.2) Atividade Antioxidante 99
4.2.3) Complexação com Colesterol 100
4.2.4) Concentração Inibitória Mínima (CIM) 101
4.2.5) Composição de Saponinas 102

4.3) EXTRAÇÃO DE SAPONINAS 107
4.3.1) Extração com solventes orgânicos verdes 107
4.3.1.1) Avaliação da Composição do Solvente 107
4.3.1.2) Otimização da Extração por Planejamento Composto Central 108
4.3.1.3) Cinética da Extração 111
4.3.2) Extração com líquidos iônicos e análogos 113
4.3.2.1) Seleção dos líquidos iônicos e análogos 113
4.3.2.2) Planejamento de misturas 115
4.3.2.3) Otimização Seqüencial da Extração 118
4.3.3) Comparação dos Métodos de Extração 120
4.3.3.1) Juá 120
4.3.3.2) Resíduo Mucilaginoso de Sisal 122
4.3.3.3) Resumo 123

4.4) CONCENTRAÇÃO DE SAPONINAS 124
4.4.1) Pré-concentração por Ponto de Névoa 124
4.4.1.1) *Screening* dos Sais 124
4.4.1.2) Remoção do Triton 125
4.4.1.3) Alternativas ao Triton 128
4.4.2) Coluna de Espuma 129
4.4.3) Separação por Membranas 138
4.4.4) Resumo 139

4.5) APLICAÇÕES DAS SAPONINAS 140
4.5.1) Alteração da Atividade Enzimática por Saponinas 140
4.5.2) Alteração da Atividade Enzimática por Agliconas 144
4.5.3) Hidrólise enzimática 146
4.5.4) Síntese enzimática 151
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES 153
CAPÍTULO 6 – TRABALHOS FUTUROS 155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 156
GLOSSÁRIO 180
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA 181
ANEXO 182

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Biodiversidade, segundo a definição da Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), significa "a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas". O termo tem como sinônimo *diversidade biológica*. A biodiversidade contempla tanto a diversidade encontrada nos ecossistemas naturais como naqueles com interferência humana, ou antrópicos. A parcela da biodiversidade utilizada por comunidades locais, povos indígenas e agricultores familiares em sistemas de cultivo e manejo, ou em práticas correlatas, na natureza, de forma domesticada ou semi-domesticada, é definida como *agrobiodiversidade*. (Abrantes, 2002; MMA, 2006a; http://www.mma.gov.br, 2009). Entre os componentes da agrobiodiversidade estão:

- **Recursos genéticos manejados no ambiente de ocorrência natural:** frutos nativos, plantas medicinais silvestres (espinheira-santa, arnica, carqueja, unha-de-gato), ervas e chás (erva-mate, macela), castanhas (castanha-do-brasil, barú), condimentos (baunilha, pequi), extração de resinas e óleos (copaíba, andiroba, seringueira), fibras (taboa, piaçaba, cipós).
- **Recursos genéticos animais semi-domesticados e domesticados:** animais silvestres criados em regime semi-extensivo ou semi-aberto, em cativeiro ou em tanques; animais de criação selecionados (gado bovino, caprino e ovino); pequenos animais de criação (galinhas, patos); animais domésticos ou de companhia (cães, gatos)
- **Recursos genéticos vegetais domesticados:** sementes de cultivares agrícolas (milho, feijão, arroz, algodão); raízes, tubérculos e rizomas (batata, batata-doce, cará, mandioca); frutíferas selecionadas (cítricos, manga, abacate, mamão, banana); plantas medicinais e aromáticas cultivadas sob linhagens (hortelã, menta); condimentos cultivados (pimentas, canela, cravo).
- **Variedades Crioulas:** são recursos genéticos vegetais utilizados para alimentação e agricultura, mantidas por um contínuo processo de conservação realizado por agricultores. Apresentam alta diversidade genética (genotípica e fenotípica) e interface entre os tipos silvestres e domesticados.

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, quer se considere o número (riqueza) e a abundância relativa (eqüitabilidade) das espécies, quer se considere a variabilidade local (diversidade alfa), a complementaridade biológica entre habitats (diversidade beta) ou a diversidade de ecossistemas e biomas (diversidade gama). Os principais biomas brasileiros são a Floresta Amazônica, maior Floresta Tropical do mundo; a

Mata Atlântica, a Floresta Tropical com os maiores índices de biodiversidade por área; o Cerrado, uma vegetação de savana com os mais altos índices de endemismos; o Pantanal, a maior planície inundável do mundo; e a Caatinga, maior biodiversidade encontrada em uma região semi-árida do planeta. Estes reúnem a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Por outro lado, infelizmente também possuímos cerca de 470 espécies da flora ameaçadas de extinção (Ferro *et al*, 2006a; Rodrigues, 2009).

Para promover a conservação e utilização sustentável da biodiversidade brasileira, com a repartição justa e eqüitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, de componentes do patrimônio genético e dos conhecimentos tradicionais associados a esses recursos, foi criado pelo Decreto nº 4.339, de 22 de agosto de 2002, a Política Nacional de Biodiversidade. Com isso, alguns programas do Governo Brasileiro têm sido implementados como (MMA, 2006a,b; Rodrigues, 2009; http://www.mma.gov.br, 2011):

- **"Plantas para o Futuro":** tem como objetivo definir as espécies nativas da flora brasileira comercialmente subutilizadas, de uso local e regional, para utilização direta pelo agricultor e para ampliar as oportunidades de investimento pelo setor empresarial no desenvolvimento de novos produtos.
- **Parentes Silvestres:** mapeamento da distribuição geográfica de cada um dos parentes silvestres identificados e das raças locais/variedades crioulas, avaliação das condições de conservação dessas espécies e das raças/variedades e as medidas e ações necessárias para a manutenção e busca de um melhor aproveitamento para esse acervo genético.
- **Centros Irradiadores de Manejo da Agrobiodiversidade (CIMA):** parceria entre o Ministério do Meio Ambiente e o Ministério do Desenvolvimento Agrário, por meio do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA. Tem como objetivo promover o resgate, a conservação, o uso sustentável e a valorização da diversidade genética contida na agrobiodiversidade e mantida em co-evolução por comunidades locais, povos indígenas e agricultores familiares.
- **Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio):** preservar e ampliar os conhecimentos sobre diversidade biológica, que constitui a base de recursos de aplicação alimentar, medicinal e industrial, tendo como exemplo a geração de uma base de dados das plantas aromáticas e frutos da Amazônia e a investigação de parâmetros físico-químicos da destilação por arraste a vapor de óleo essencial de priprioca (*Cyperus articulatus*) e estoraque (*Ocimum micranthum*).

- **Comissão Nacional de Biodiversidade (CONABIO):** implementar a Política Nacional de Biodiversidade, mediante a promoção de sinergias entre o Poder Público e a sociedade civil. Um dos seus mecanismos de auxílio técnico e financeiro foi, até 2005, o PROBIO (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Biodiversidade Brasileira). Em 2008, foi lançado o PROBIO II (Projeto Nacional de Ações Integradas Público-Privadas para Biodiversidade) que pretende impulsionar a transformação dos modelos de produção, consumo e de ocupação do território nacional, começando com os setores de agricultura, ciência, pesca, florestas e saúde, com extensa parceria entre os ministérios do governo brasileiro, além de Fiocruz, Embrapa, ICMBio, Caixa Econômica Federal e Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

O acesso a componentes do patrimônio genético e a conhecimentos tradicionais associados para geração de pesquisa científica, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico por instituições públicas ou privadas, é coordenado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), criado pela Medida Provisória nº 2186-16, de 23/08/2001, que já credenciou ICMBio para autorizar outras instituições a realizar a coleta de material biológico com finalidade de pesquisa científica, e IBAMA e CNPq para autorizar o acesso ao patrimonio genético.

Seu maior objetivo é o combate a biopirataria e a repartição dos benefícios, mas o excesso de burocracia e a morosidade na análise e deliberação dos processos levaram muitos cientistas a ignorar a legislação para que suas pesquisas não ficassem paralisadas. Por isso, várias orientações técnicas e resoluções foram aprovadas com intuito de esclarecer e fornecer meios para realização das exigências, como as Resoluções nº 21, de 31/08/2006 e nº 28, de 06/11/2007, que definem que pesquisas relacionadas a história evolutiva ou a identificação de uma espécie ou grupo taxonômico, assim como pesquisas epidemiológicas e de formação de coleções de germoplasma não se enquadram sob o conceito de acesso ao patrimônio genético. Similarmente aplicado a elaboração de óleos fixos, de óleos essenciais ou de extratos quando esses resultarem de isolamento, extração ou purificação, nos quais as características do produto final sejam substancialmente equivalentes à matéria prima original, descrito na Resolução nº 29 de 06/12/2007.

A mais recente, a Resolução nº 35 de 27/04/2011 permite a regularização de empresas que utilizaram plantas e animais para desenvolver produtos - como fármacos, alimentos e cosméticos - sem aval do governo, podendo contar com redução de multas e autorização para

explorar os produtos que criaram com base na biodiversidade. Ainda assim foi elaborado um novo anteprojeto de Lei (APL) com o intuito de simplificar o acesso a recursos genéticos, reduzindo o tempo para obter autorizações de pesquisa de meses para semanas, além de outras melhorias (Ferro *et al*, 2006b; http://www.planalto.gov.br/, 2009).

No setor privado também há algumas iniciativas para valorização de matérias-primas e princípios ativos oriundos da biodiversidade brasileira na produção de fármacos, alimentos e cosméticos. Como exemplos, têm-se:

- **Projeto Algas:** Parceria do Instituto Terramar, Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e Universidade Federal do Ceará (UFC) para o desenvolvimento de técnicas de reprodução da alga *Gracilaria birdiae*, e assim, garantir a preservação dos bancos naturais de algas e benefícios a comunidade de pescadores (http://www.terramar.org.br/, 2009). Dessa alga vermelha, polissacarídeos sulfatados são extraídos e utilizados como geleificantes (Maciel *et al*, 2008).
- **Acheflan**: Primeiro antiinflamatório tópico feito do extrato de planta brasileira (erva-baleeira, *Cordia verbenacea*) e tendo como ativo o alfa-humuleno, desenvolvido em conjunto pelo professor João Batista Calixto (UFSC), Unifesp, Unicamp, PUC-Campinas e Laboratórios Aché, com investimento de R$ 15 milhões em 7 anos de pesquisa. A erva-baleeira é cultivada de forma sustentável em um centro de pesquisa da Unicamp, em Paulínia, visando à manutenção de qualidade e constância dos extratos (Ereno, 2005; Fialho, 2005).
- **Linha Ekos**: Em 2000, com investimento inicial de R$ 11 milhões a Natura lançou uma linha de cosméticos onde as matérias-primas castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*), breu-branco (*Protium pallidum*), copaíba (*Copaifera spp*.), guaraná (*Paullinia cupana*), pitanga (*Eugenia uniflora*), entre outras são extraídas de forma sustentável com certificações do IBD (Instituto Biodinâmico) e Imaflora (Instituto de Manejo e Certificação Florestal e Agrícola). Estas matérias-primas são fornecidas por comunidades tradicionais extrativistas, grupos de agricultura familiar e assentamentos agrícolas a empresas intermediárias que ficam responsáveis pelo processamento, refinamento físico e químico e padronização, e fixam contrato com a Natura (Ferro *et al*, 2006a; Miguel, 2007).

As plantas produzem vários metabólitos que podem ser essenciais para o crescimento, a reprodução e a manutenção da vida, como proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e lipídeos, ou apenas benéficos para sua sobrevivência atuando na atração de polinizadores ou na defesa contra predadores, conhecidos como metabólitos secundários ou especiais, por exemplo, os terpenóides (óleos essenciais, fitoesteróis e carotenóides), alcalóides,

fenilpropanóides (ácidos fenólicos e cumarinas) e glicosídeos (flavonóides e saponinas) (Dewick, 2009).

As saponinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal, e incluem um grupo diverso de compostos caracterizados pela sua estrutura contendo uma aglicona esteroidal ou triterpenóide ligada a uma ou mais moléculas de açúcar. A denominação "saponina" é derivada de *sapo*, originado do latim que significa sabão, devido à formação de espuma quando extratos contendo saponinas são agitados com água (Oleszek, 2000; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007). As saponinas desempenham importantes funções fisiológicas nas plantas, como fatores de resistência contra patógenos e em interrelações alelopáticas (Kalinowska *et al*, 2005).

Sua diversidade estrutural é refletida nas suas propriedades fisico-químicas (formação de espuma, emulsificação, solubilização, adoçante, amargor) e biológicas (hemolítico, antimicrobiano, molusquicida, inseticida, ictiocida), as quais são exploradas em várias aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (intermediário na síntese de drogas esteroidais, e adjuvante em vacinas), e também em meio ambiente (biorremediação de solos) (Sparg *et al*, 2004; Vincken *et al*, 2007).

Saponinas em alimentos têm tradicionalmente sido consideradas "fatores antinutricionais" e em alguns casos têm seu uso limitado devido ao seu sabor amargo. Por isso, a maioria das pesquisas tem como objetivo sua remoção para facilitar consumo humano. O uso de saponinas, entretanto, voltou a ganhar interesse recentemente devido a novos estudos sobre seus benefícios à saúde, como a redução de colesterol e o registro de propriedades anticâncer. O potencial comercial das saponinas tem resultado no desenvolvimento de novas estratégias de processamento e reavaliação das tecnologias existentes de extração/concentração (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

Mas apenas a utilização sustentável de matérias-primas e seus princípios ativos da biodiversidade não garante o desenvolvimento de produtos limpos e verdes. Para isso, há 12 princípios da química verde que devem ser considerados (http://www.epa.gov/, 2009):

1. **Prevenção**: é melhor prevenir a geração de resíduos do que tratá-los depois de produzidos;
2. **Eficiência atômica**: etapas ou reações de síntese devem ser desenvolvidas para maximizar a incorporação de todas as matérias-primas utilizadas no produto final, evitando subprodutos ou resíduos;

3. **Uso de substâncias químicas menos tóxicas:** métodos sintéticos devem ser desenvolvidos para utilizar e gerar substâncias que possuam pouca ou nenhuma toxidez ao meio ambiente e a população.
4. **Desenvolvimento de produtos mais seguros:** produtos químicos devem ser desenvolvidos não só para que realizem a função desejada, mas também sejam menos tóxicos a curto e longo prazo.
5. **Solventes e auxiliares mais seguros:** o uso de substâncias auxiliares como solventes e agentes de separação devem ser evitados. Se não for possível, estas substâncias devem ser inócuas ou facilmente reutilizáveis.
6. **Busca pela eficiência energética:** as necessidades energéticas dos processos químicos devem ser identificadas e minimizadas por seus impactos ambientais e econômicos. Se possível, todas as reações devem ser conduzidas a temperaturas e pressões amenas.
7. **Uso de matérias-primas renováveis:** a matéria-prima deve ser renovável sempre que técnica e economicamente viável.
8. **Redução de derivados:** derivatização deve ser minimizada ou evitada.
9. **Catálise:** reagentes catalíticos são superiores aos estequiométricos, preferencialmente catalisadores heterogêneos.
10. **Produtos degradáveis:** produtos químicos devem ser desenvolvidos para que ao término de sua função seja degradado em produtos inócuos e que não persistam no meio ambiente.
11. **Análise em tempo real para prevenção de poluição:** metodologias analíticas precisam ser melhoradas para permitir monitoramento e controle em tempo real antes da formação de substâncias perigosas.
12. **Química mais segura para prevenção de acidentes:** as substâncias utilizadas nos processos químicos devem escolhidas para minimizar os acidentes, como incêndios e explosões.

Várias tecnologias verdes vêm sendo desenvolvidas com a utilização de solventes alternativos (água, etanol, líquidos iônicos, fluidos supercríticos e fluorados), outras fontes energéticas além da térmica (microondas, ultrassom, campos elétricos e energia solar), biocatalisadores (enzimáticos ou microbianos), catalisadores heterogêneos (por exemplo, zeólitas) e processos como separação por membranas (por exemplo, ultrafiltração e pervaporação) que podem substituir processos convencionais (por exemplo, destilação) mais intensivos em energia (Clark & Macquarrie, 2002; Doble & Kruthiventi, 2007).

O objetivo desta tese foi explorar vários processos de extração e concentração utilizando tecnologia limpa (ou verde) para obtenção de produtos à base de saponinas obtidas da agrobiodiversidade brasileira com aplicações industriais em cosméticos e em alimentos.

Para tanto, este trabalho foi dividido em alguns objetivos específicos como:

1) Seleção das matérias-primas já referenciadas na literatura como fonte de saponinas, comparando suas propriedades físico-químicas e antimicrobianas;
2) Caracterização das matérias-primas selecionadas, como sua composição de saponinas, a variação da sua atividade surfactante, antimicrobiana, antioxidante e de complexação com colesterol;
3) Estudo dos métodos de extração das saponinas, comparando e otimizando a extração mais usual (orbital simples) com a extração micelar, a auxiliada por ultrassom e por Soxhlet, utilizando solventes com a abordagem mais verde possível, como água, etanol e líquidos iônicos biocompatíveis;
4) Estudo dos métodos de concentração das saponinas, como pré-concentração por ponto de névoa, fracionamento por coluna de espuma e separação por membranas;
5) Testes de aplicação das saponinas como ativador e/ou inibidor enzimático para uso em alimentos e/ou cosméticos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) SURFACTANTES

2.1.1) Características Gerais

Surfactantes são compostos orgânicos que apresentam uma parte da molécula com características polares hidrofílicas e outra parte com características apolares hidrofóbicas (Figura 1). A parte hidrofóbica geralmente presente em surfactantes é composta por hidrocarbonetos (saturados, insaturados, lineares, ramificados, aromáticos e/ou cíclicos), perfluorohidrocarbonetos, siloxanos ou polioxipropileno (ou butileno). Os grupos hidrofílicos podem ser negativamente e/ou positivamente carregados ou podem até mesmo não possuir carga.

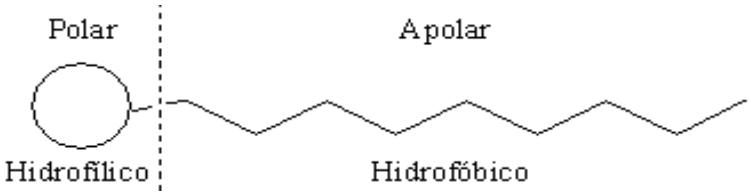


Figura 1 – Estrutura geral de surfactantes

Devido a essa dualidade na molécula dos surfactantes, estes formam arranjos na interface entre duas fases de polaridades distintas, tais como ar-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido. Estes arranjos ocorrem devido a dois fenômenos: adsorção e micelização (agregação). Na **adsorção**, os surfactantes migram para a interface focando em minimizar o contato das regiões hidrofóbicas destes com a parte hidrofílica, alterando as propriedades interfaciais, e podendo ser quantificado como a densidade superficial (Γ) do surfactante. Na **micelização**, em uma determinada concentração os surfactantes se agregam, onde os grupos hidrofóbicos se orientam para o interior do agregado (micela) e os grupos hidrofílicos se orientam para a solução aquosa, alterando assim as propriedades da solução. Esta concentração é conhecida como concentração micelar crítica (CMC), intrínseca de cada surfactante, que pode ser observada por alterações agudas de propriedades físicas das soluções, como turbidez, solubilidade de corantes, condutividade elétrica, pressão osmótica, viscosidade, tensão superficial e interfacial (Rosen & Dahanayake, 2000; Farn, 2006). A densidade superficial também atinge um valor máximo (Γ_{max}) na CMC, onde a concentração de surfactante na interface está saturada, não ocorrendo mais adsorção (Mitra & Dungan, 1997; Decroos *et al*, 2007). As micelas podem formar estruturas esféricas, cilíndricas e lamelares, conforme mostra a Figura 2 (Farn, 2006).

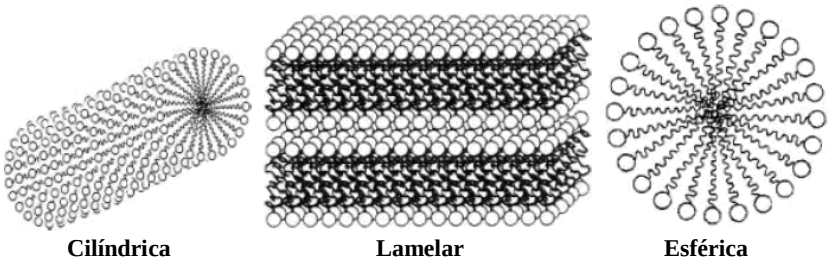


Figura 2 – Formas micelares (Rosen & Dahanayake, 2000)

Os surfactantes podem ter as mais variadas aplicações industriais como em detergentes e sabões para limpeza doméstica, como agentes espalhantes em agroquímicos, como componentes essenciais em fórmulas cosméticas como cremes, shampoos e condicionadores, em fármacos, como dispersantes de pigmentos em tintas, como fixadores de corantes e agentes antiestáticos em fibras e tecidos, na remoção da tinta na reciclagem de papéis, na flotação seletiva em processos de hidrotratamento de minérios, na produção de polímeros, na recuperação terciária em poços de petróleo, e no preparo e formulação de produtos alimentícios (molhos, bebidas, sorvetes, entre vários outros), tendo movimentado no mundo mais de US$24 bilhões em 2009 (Farn, 2006; Myers, 2006; http://www.acmite.com, 2011). Contudo, existem aspectos, além das propriedades intrínsecas dos surfactantes, que devem ser considerados, tais como a biodegradabilidade, bioacumulação, toxidez e irritação cutânea (alerginicidade) (Rosen & Dahanayake, 2000; Tadros, 2005). Por isso, já há uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos derivados da petroquímica por outros derivados da oleoquímica ou de outras fontes de origem natural (biossurfactantes e saponinas) (Nitschke & Pastore, 2002).

2.1.2) Propriedades

Os surfactantes geralmente alteram as propriedades interfaciais de misturas e soluções, gerando fenômenos macroscópicos como a formação de espuma, o molhamento, a emulsificação, a dispersão, a adesão, a solubilização, a viscosidade e a detergência (processo mais complexo onde várias destas propriedades ocorrem juntas) (Rosen & Dahanayake, 2000; Farn, 2006).

2.1.2.1) Formação de Espuma

Espuma é produzida quando um gás é introduzido em uma solução que possui um filme superficial com propriedades viscoelásticas. Quando um surfactante é adsorvido na interface gás/solução, este pode inferir estas propriedades ao filme interfacial, estabilizando-o e formando a espuma.

2.1.2.2) Molhamento (*Wetting*)

Molhamento é o fenômeno em que um líquido se espalha sobre um substrato (líquido ou sólido), deslocando a fase que estava originalmente em contato com o substrato e substituindo-a por uma camada do líquido espalhante, que tem agora novas interfaces com ambos substrato e fase originalmente em contato com ele. Na presença de um surfactante, solventes hidrofílicos (como a água, por exemplo) podem se espalhar sobre uma superfície hidrofóbica devido à alterações nas propriedades interfaciais do sistema já que os surfactantes se adsorveram sobre a interface.

2.1.2.3) Emulsificação e Dispersão

As emulsões são formadas quando dois líquidos imiscíveis entre si e de polaridades diferentes são misturados na presença de um surfactante. O surfactante se organiza na mistura, localizando-se na interface entre os dois líquidos, gerando barreiras elétricas ou estéricas que evitam a coalescência das gotas do líquido imiscível. As dispersões são similares às emulsões, substituindo o líquido na fase descontínua por partículas sólidas, onde a presença do surfactante também gera barreiras para evitar a agregação das partículas.

2.1.2.4) Adesão

A adesão entre duas fases imiscíveis depende diretamente da força de interação entre duas diferentes moléculas através da interface, principalmente entre grupos hidrofóbicos similares e entre grupos de cargas opostas. Assim, a natureza da interface pode ser alterada pela adsorção de um surfactante, que pode aumentar (ou diminuir) a adesão entre o substrato e a segunda fase.

2.1.2.5) Solubilização

Solubilização é a dissolução de uma substância (sólido, líquido ou gás) por interação reversível com micelas de surfactantes em um solvente para formar uma solução termodinamicamente estável. Em geral, a capacidade de solubilização é maior para solutos polares e diminui com o aumento do volume molar do soluto.

2.1.2.6) Viscosidade

O aumento de viscosidade da solução também é função das micelas no sistema, ocorrendo com o aumento na fração volumétrica do material dissolvido na solução. Também é dependente da estrutura e do arranjo das micelas formadas.

2.1.3) Classificação dos surfactantes

2.1.3.1) Sintéticos

2.1.3.1.1) Aniônicos

Surfactantes aniônicos são os mais utilizados em aplicações industriais devido ao seu baixo custo e sua excelente capacidade de formar emulsões estáveis. Sua estrutura anfifílica deve-se à presença de um grupo hidrofílico negativamente carregado, como carboxilatos (sabões), sulfatos, sulfonatos, fosfatos, sulfosuccinatos, isetionatos e tauratos, ligados a um esqueleto hidrocarbônico hidrofóbico com estrutura predominantemente linear contendo entre 8 a 18 átomos de carbono. Os grupos hidrofílicos aniônicos possuem como contra-íon mais comum o sódio. Este tipo de surfactante também gera bastante espuma em soluções cuja concentração do surfactante está acima da CMC, o que é considerado um atributo desejável em aplicações de limpeza (Tadros, 2005; Farn, 2006).

2.1.3.1.2) Catiônicos

Surfactantes catiônicos possuem um grupo hidrofílico carregado positivamente, geralmente sais de amônio quaternário ou sais de amina, e na parte hidrofóbica da cadeia grupos alquila de 8 a 18 átomos de carbono, tendo como contra-íon mais comum o cloreto, como por exemplo, o cloreto de dodecil trimetil amônio. Outros grupos possíveis são as imidazolinas e os cloretos de benzalcônio. A CMC deste surfactante é próxima à de surfactantes aniônicos com mesmo tamanho de cadeia de hidrocarboneto. Os surfactantes catiônicos são bastante utilizados como agentes antiestáticos em amaciantes de roupa e condicionadores para cabelos, como bactericidas, inibidores de corrosão e dispersantes de pigmentos inorgânicos (Tadros, 2005; Myers, 2006).

2.1.3.1.3) Anfóteros

São surfactantes que possuem ambos os grupos catiônicos e aniônicos, que podem variar a carga (negativa, positiva e neutra) de acordo com o pH da solução. Entre estes incluem betaínas (dimetil alquil glicinatos), derivados alquilados de aminoácidos e derivados alquilados de imidazolina. Apresentam boa compatibilidade com os outros tipos de surfactantes, gerando estruturas micelares mistas e modificando suas propriedades. Geralmente são menos agressivos à pele e aos olhos do que os outros surfactantes, sendo muito utilizados em shampoos e outros cosméticos (Tadros, 2005; Farn, 2006; Myers, 2006).

2.1.3.1.4) Não-Iônicos

Os surfactantes não-iônicos são eletricamente neutros, o que gera vantagens interessantes como baixa sensibilidade a eletrólitos e ao pH. Em sua grande maioria, estes surfactantes são baseados no poli(óxido de etileno), produzindo álcoois, ácidos graxos, alquilfenóis, monoalquilamida, ésteres de sorbitana e aminas graxas etoxiladas. Mas há também os derivados de polióis e glicerol, poliglicosídeos, óxidos de aminas e ésteres graxos de sacarose. As principais aplicações são em alimentos, cosméticos e fármacos (Tadros, 2005; Myers, 2006).

2.1.3.2) Naturais

2.1.3.2.1) De origem microbiana

Biossurfactantes são um grupo heterogêneo de metabólitos sintetizados por microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras para emulsificar substratos e assim facilitar o uso em seu crescimento; transporte do substrato para o interior celular; aderência a superfícies e atividade antimicrobiana. Geralmente produzidos por fermentação, apresentam algumas vantagens como baixa toxidez, maior biodegradabilidade, maior formação de espuma e atividade específica em condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Estes podem ser categorizados em moléculas de baixa massa molar (glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros e lipopeptídeos), que diminuem a tensão superficial e interfacial mais eficientemente, e os de alta massa molar (poliméricos e particulados), que se ligam mais fortemente às superfícies, estabilizando as emulsões. Assim, a maioria dos biossurfactantes são aniônicos ou não-iônicos, sendo aplicados principalmente na indústria petrolífera, tanto em biorremediação como em recuperação de reservatórios (Desai & Banat, 1997; Nitschke & Pastore, 2002; Van Hamme *et* al, 2006; Singh *et al*, 2007; Rahman & Gakpe, 2008).

2.1.3.2.2) De origem vegetal

Os surfactantes naturais de origem vegetal são fosfolipídeos, proteínas ou hidrolisados protéicos e saponinas. Os fosfolipídeos mais utilizados são obtidos do processo de degomagem de óleo de soja, e incluem o fosfatidilinositol, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. Esta mistura de fosfolipídeos, conhecida como lecitina de soja é utilizada como um surfactante anfótero, principalmente na indústria alimentícia. Por ter características de solubilidade intermediárias, a lecitina de soja é mais efetiva em estabilizar emulsões quando atua conjuntamente com outro surfactante (Gunstone & Padley, 1997; McClements, 2005).

As proteínas, por terem uma massa molar maior, não reduzem tanto a tensão superficial, mas geram emulsões e espumas mais estáveis, diferindo entre si na sua atividade superficial devido a fatores moleculares (estabilidade conformacional, flexibilidade, distribuição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura primária) e fatores externos (pH, força iônica e temperatura). As proteínas podem ser modificadas por tratamentos químicos, térmicos ou enzimáticos para alterar sua composição e tamanho, e assim melhorar suas propriedades funcionais, como a emulsificação e formação de espuma. As principais aplicações de proteínas e de hidrolisados protéicos são na indústria alimentícia e cosmética (Garti, 1999; Moure *et al*, 2006).

2.2) SAPONINAS

2.2.1) Tipos e Distribuição

Saponinas são freqüentemente subdivididas em duas classes principais, triterpênicas e esteroidais, ambas derivadas do precursor óxido de esqualeno, com 30 átomos de carbono (C30). A diferença entre estas duas classes é que as saponinas esteroidais têm 3 grupos metila a menos (C27), enquanto as saponinas triterpênicas se mantêm com 30 átomos de carbono. Subdivisões das principais classes são baseadas em modificações adicionais, como rearranjos, ciclizações, oxidações (formação de grupos hidroxila, carbonila e carboxila), glicosilações, insaturações e degradações, além da presença de grupos como DDMP (2,3-diidro-2,5-dihidroxi-6-metil-4*H*-piran-4-ona) e angeloíla como substitutos de hidroxilas (Hostettmann & Marston, 2005; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007; Vincken *et al*, 2007).

As saponinas esteroidais podem ser do tipo espirostano (Figura 3A), ou furostano (Figura 3B) (Sparg *et al*, 2004). Já as saponinas triterpênicas apresentam uma variedade maior de tipos de esqueleto: damaranos (Figura 4A), tirucalanos (Figura 4B), lupanos (Figura 4C), hopanos (Figura 4D), oleananos (Figura 4E), taraxasteranos (Figura 4F), ursanos (Figura 4G), cicloartanos (Figura 4H), lanostanos (Figura 4I) e cucurbitanos (Figura 4J) (Kasai *et al*, 1999; Vincken *et al*, 2007).

Quando a classificação das saponinas é baseada na biossíntese das suas agliconas, é esperado que tipos similares de saponinas sejam encontrados em ordens taxonômicas próximas. Esta expectativa é derivada de que ordens similares contenham enzimas com mesmas funções, e que estas possam provavelmente catalisar biotransformações similares, finalmente gerando estruturas químicas próximas (Vincken *et al*, 2007).

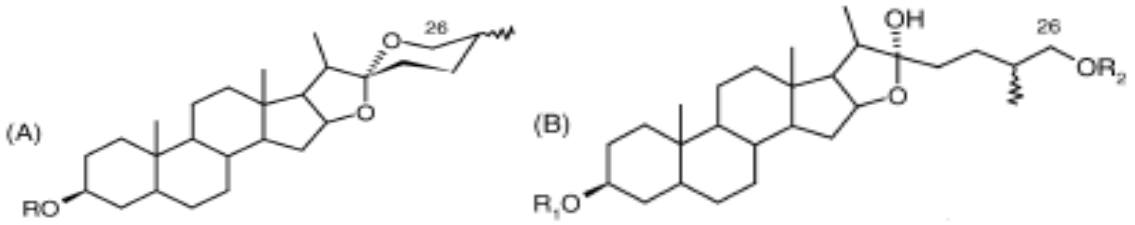


Figura 3 - Estruturas de agliconas de saponinas esteroidais (R = oses) (Vincken *et al*, 2007)

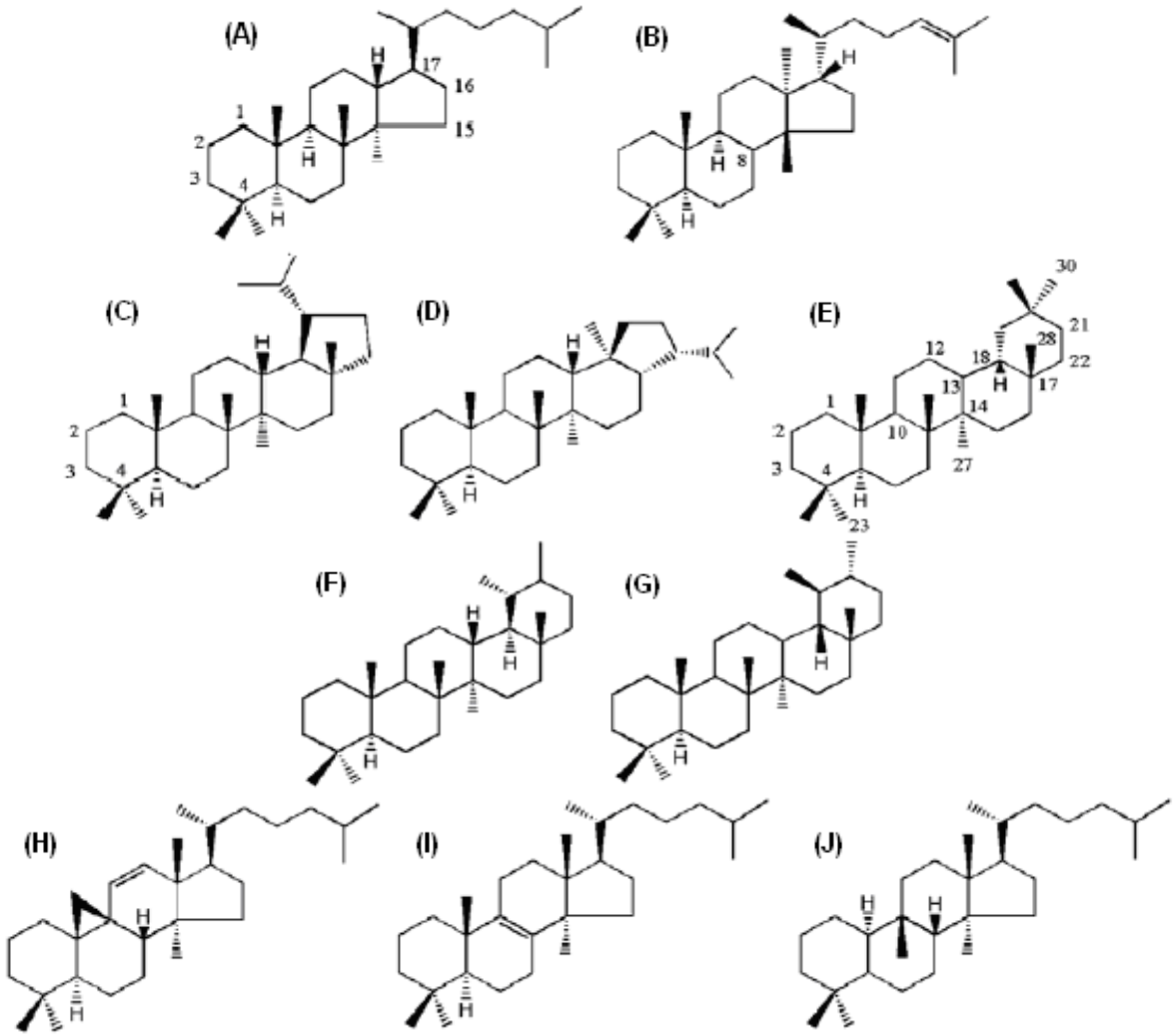


Figura 4 - Estruturas de agliconas de saponinas triterpênicas (Vincken *et al*, 2007)

As saponinas ocorrem em diferentes famílias vegetais, sendo que as esteroidais encontram-se distribuídas em famílias como Agavaceae, Alliaceae, Asparagaceae, Costaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Ruscaceae, Solanaceae, além de *Aspilia montevidensis* (Asteraceae), *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae), *Trigonella foenum-graecum* (Leguminosae) e *Tribulus terrestris* (Zygophyllaceae). As saponinas triterpênicas estão presentes em várias dicotiledôneas (Sparg *et al*, 2004; Hostettmann & Marston, 2005). Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de espécies vegetais nas quais as saponinas estão distribuídas.

Tabela 1 – Distribuição de saponinas em algumas espécies vegetais

Espécie	Família	Tipo de Saponina	Referência
Sisal (*Agave sisalana*)	Agavaceae	Esteroidal	Ding *et al*, 1989
Alho (*Allium sativum*)	Alliaceae	Esteroidal	Matsuura *et al*, 1988
Amaranto (*Amaranthus cruentus*)	Amaranthaceae	Triterpênica	Oleszek *et al*, 1999
Pfafia (*Pfaffia paniculata*)	Amaranthaceae	Triterpênica	Nakai *et al*, 1984
Mate (*Ilex paraguariensis*)	Aquifoliaceae	Triterpênica	Gnoatto *et al*, 2005
Centella (*Centella asiatica*)	Apiaceae	Triterpênica	Inamdar *et al*, 1996
Ginseng (*Panax ginseng*)	Araliaceae	Triterpênica	Park *et al*, 2005
Aspargo (*Asparagus officinalis*)	Asparagaceae	Esteroidal	Huang & Kong, 2006
Erva-botão (*Eclipta alba*)	Asteraceae	Triterpênica	Yahara *et al*, 1997
Confrei (*Symphytum officinale*)	Boraginaceae	Triterpênica	Mohammad *et al*, 1995
Saponária (*Saponaria officinalis*)	Caryophyllaceae	Triterpênica	Jia *et al*, 1999
Beterraba (*Beta vulgaris*)	Chenopodiaceae	Triterpênica	Brezhneva *et al*, 2001
Espinafre (*Spinacia oleracea*)	Chenopodiaceae	Triterpênica	Mithöfer *et al*, 1999
Quinoa (*Chenopodium quinoa*)	Chenopodiaceae	Triterpênica	Woldemichael & Wink, 2001
Cana-do-brejo (*Costus spicatus*)	Costaceae	Esteroidal	Da Silva *et al*, 1999
Bucha (*Luffa cylindrica*)	Cucurbitaceae	Triterpênica	Yoshikawa *et al*, 1991
Cará (*Dioscorea alata*)	Dioscoraceae	Esteroidal	Sautour *et al*, 2006
Alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*)	Fabaceae	Triterpênica	Sabbioni *et al*, 2005
Alcaçuz do Brasil (*Periandra dulcis*)	Fabaceae	Triterpênica	Suttisri *et al*, 1993
Grão-de-bico (*Cicer arietinum*)	Fabaceae	Triterpênica	Kerem *et al*, 2005
Soja (*Glycine max*)	Fabaceae	Triterpênica	Yoshiki *et al*, 2005
Lírio branco (*Lilium candidum*)	Liliaceae	Esteroidal	Mimaki *et al*, 1999
Maracujá (*Passiflora edulis*)	Passifloraceae	Triterpênica	Reginatto *et al*, 2001
Aveia (*Avena sativa*)	Poaceae	Triterpênica	Osbourn, 2003
Quilaia (*Quillaja saponaria*)	Quillajaceae	Triterpênica	San Martín & Briones, 1999
Juá (*Zizyphus joazeiro*)	Rhamnaceae	Triterpênica	Higuchi *et al*, 1984
Espada-de-são-jorge (*Sansevieria trifasciata*)	Ruscaceae	Esteroidal	Mimaki *et al*, 1996
Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum)*	Sapindaceae	Triterpênica	Yoshikawa *et al*, 1996b
Cipó-timbó (*Serjania lethalis*)	Sapindaceae	Triterpênica	Teixeira *et al*, 1984
Salsaparrilha (*Smilax officinalis*)	Smilacaceae	Esteroidal	Bernardo *et al*, 1996
Berinjela (*Solanum melongena*)	Solanaceae	Esteroidal	Kintia & Shvets, 1985a
Pimenta (*Capsicum frutescens*)	Solanaceae	Esteroidal	De Lucca *et al*, 2006
Chá (*Camellia sinensis*)	Theaceae	Triterpênica	Sagesaka *et al*, 1994
Batata doce (*Ipomoea batatas*)	Convolvulaceae	Triterpênica	Dini *et al*, 2009

O conteúdo de saponinas nas plantas pode variar com a parte vegetal examinada, e com fatores ambientais e agronômicos, como disponibilidade de nutrientes e água, e necessidade de proteção contra herbívoros e patógenos (Augustin *et al*, 2011). Shi e colaboradores (2007) exemplificaram isso ao investigar a presença de ginsenosídeos em raízes, folhas e caule de *Panax ginseng* em idades diferentes, resultando uma maior produção destes nas raízes com um ano de crescimento.

As saponinas também podem ser categorizadas de acordo com o número de glicosilações na sua estrutura como mono-, di- ou tridesmosídicas. Saponinas monodesmosídicas têm uma única glicosilação na aglicona, sendo geralmente ligada ao carbono 3 (C3). Já as saponinas bidesmosídicas apresentam, além da ligação via éter em C3, há também uma ligação via éster em C28 (aglicona triterpênica) ou uma ligação via éter em C26 (aglicona furostanólica). Os monossacarídeos mais comuns incluem: D-glicose, D-galactose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, L-ramnose, L-arabinose, D-xilose e D-fucose. As glicosilações podem ocorrer com apenas um monossacarídeo ou até com um oligossacarídeo com 8 oses, distintas ou não, sendo o mais comum a presença de trissacarídeos (Sparg *et al*, 2004; Vincken *et al*, 2007).

2.2.2) Biossíntese

Os precursores dos metabólitos especiais presentes nos vegetais são intermediários no metabolismo primário, que se inicia a partir da fotossíntese, onde a glicose é gerada para depois ser consumida na respiração e produzir água e CO_2, sendo que esta ocorre em 3 etapas: glicólise, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (Berg *et al*, 2004). Da glicólise, surge o *fosfoenolpiruvato (PEP)*, que ao reagir com a eritrose-4-fosfato deriva a via do ácido chiquímico, precursora de aromáticos como alcalóides, aminoácidos e ácidos fenólicos; o *acetil-CoA*, que gera duas vias: malonato, produzindo policetídeos e lipídeos; e mevalonato, formando triterpenos, esteróis e saponinas (Figura 5). Intermediários das vias especiais também podem se unir, criando uma biossíntese mista, como os flavonóides e tocoferóis (Torssell, 1997). Há também outra via produtora de terpenóides, presente em vegetais, algas e bactérias, chamada via do metileritritol fosfato (MEP), que tem como precursores o ácido pirúvico e gliceraldeído fosfato cuja reação é mediada pela tiamina difosfato (TPP), gerando muito mais isopentenila difosfato (IPP) do que a via do mevalonato. Na planta, estas vias ocorrem em locais diferentes: a via do mevalonato, no citosol; e a via do MEP, nos cloroplastos (Kalinowska *et al*, 2005; Dewick, 2009; Augustin *et al*, 2011; Osbourn *et al*, 2011).

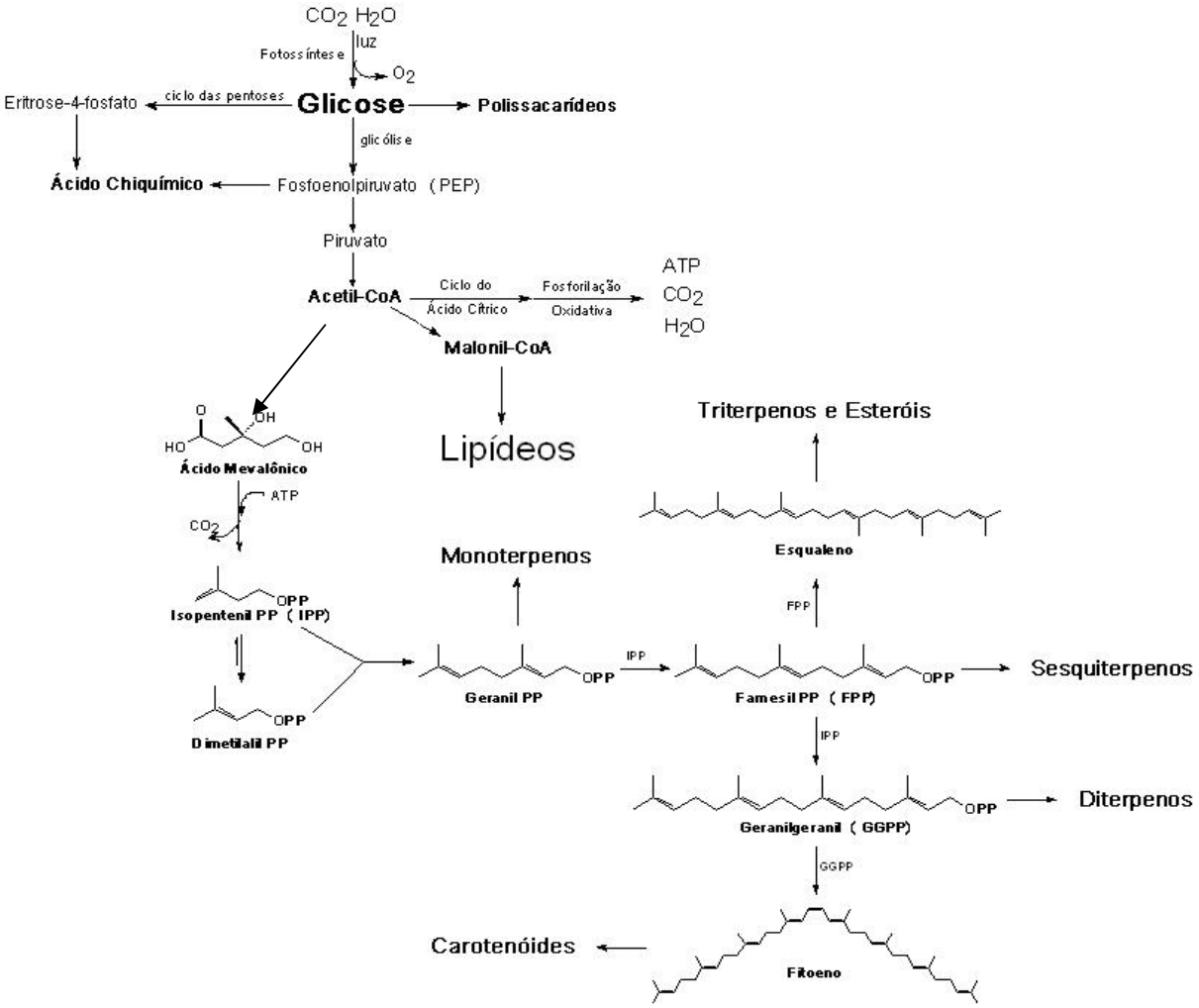


Figura 5 – Esquema geral da via do mevalonato (Dewick, 2009)

O principal precursor dos triterpenos e esteróis é o esqualeno, que se oxida através da esqualeno epoxidase (EE), gerando o 2,3-óxido de esqualeno que, por sua vez, por ciclizações e rearranjos através das oxidoesqualeno ciclases, produz dois cátions: dammarenila (forma as principais agliconas triterpênicas) e protosterila (nas plantas através do cicloartanos gera as agliconas esteroidais). A biossíntese destas agliconas pode ser melhor visualizada na Figura 6 (Haralampidis *et al*, 2002; Xu *et al*, 2004; Philips *et al*,2006; Vincken *et al*,2007; Dewick, 2009).

Depois da formação das agliconas, várias modificações podem ocorrer através de enzimas do citocromo P450, com hidroxilação e carboxilação, ou através de aciltransferases, com a inserção de grupos N-metila antranilatos, benzoíla ou DDMP, antes da glicosilação para geração das saponinas, que é promovida de forma seqüencial onde as glicosiltransferases com auxílio da UDP (uridina-5'-difosfato) inserem o monossacarídeo primeiro no C-3, e depois podem continuar aumentando a cadeia ou glicosilar em outra posição (Haralampidis *et*

al, 2002; Kalinowska *et al*, 2005; Augustin *et al*, 2011; Osbourn *et al*, 2011). A glicosilação geralmente está associada a modulação da estabilidade do metabólito, atividade biológica, solubilidade, e sinalização para acúmulo ou transporte celular (Augustin *et al*, 2011)

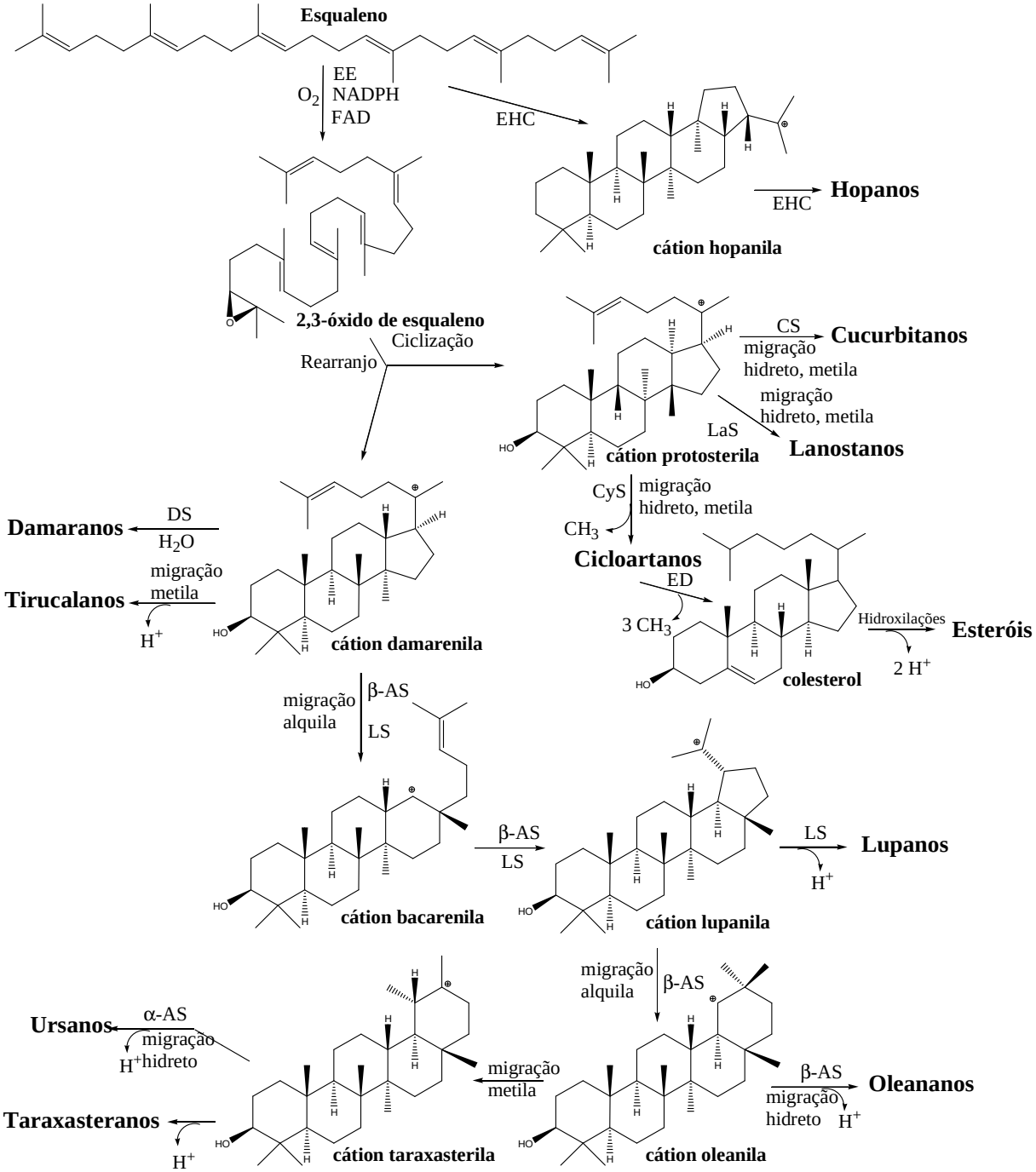


Figura 6 – Biossíntese das agliconas triterpênicas e esteroidais. Enzimas: LS (lupeol sintase); β-AS (β-amirina sintase); α-AS (α-amirina sintase); DS (damarenediol sintase); CS (cucurbitadienol sintase); CyS (cicloartenol sintase); LaS (Lanosterol sintase); EHC (Esqualeno-hopeno ciclase); ED (esterol demetilases: esterol 14-demetilase, esterol Δ^{14}-redutase e esterol C-4 demetilase) (Dewick, 2009)

2.2.3) Propriedades

2.2.3.1) Propriedades micelares

As propriedades micelares das saponinas, como CMC, densidade superficial máxima e número de agregação (número de monômeros em uma micela), são muito importantes para aplicações como surfactantes e espumógenos. Estas são influenciadas por variáveis como temperatura, concentração salina, pH da fase aquosa, concentração e tipo de solvente (etanol, metanol). Além disso, as micelas formadas em soluções aquosas podem variar em tamanho e forma em função do tipo de saponina (Mitra & Dungan, 1997; 2000).

Como exemplos, a CMC de uma solução neutra de quilaia (*Quillaja saponaria*; Mitra & Dungan, 1997) varia entre 0,5 – 0,77 g/L, a 25ºC, mas a 52ºC esta aumenta para 0,8 – 1,07 g/L. Quando há variação de pH, a CMC varia entre 1,0 – 1,3 g/L a pH 8,8 e entre 0,1 – 0,2 g/L a pH 3,0, sendo este último resultado similar à variação encontrada quando a concentração de NaCl na solução neutra de quilaia está em 1,0M. Decroos e colaboradores (2007) observaram que três fatores estruturais influenciam a CMC, alterando a área hidrofóbica disponível: o número de cadeias de oses (monodesmosídeos apresentam menor CMC que os bidesmosídeos); conjugação com grupos substitutos (presença do grupo DDMP aumenta a CMC) e presença de grupos acetila (também diminui mais a CMC que saponinas não-acetiladas). Pekdemir e colaboradores (1999) relataram a ação de alguns eletrólitos sobre o CMC da β-escina da castanha da índia, tendo o valor inicial de 0,78 mM alterado para 1,69, 2,20 e 0,47 mM quando na presença de solução de 3 M de uréia, 3 M de glicose e água do mar, respectivamente. Estes autores também dissertam sobre o efeito de alcoóis com vários tamanhos de cadeia sobre a tensão superficial das saponinas, onde cadeias maiores geram uma menor tensão superficial, devido a uma maior interação com o grupo hidrofóbico da saponina, promovendo uma maior adorção desta na interface água-ar.

Mitra e Dungan (1997) também determinaram Γ_{max} das saponinas da quilaia como 0,2 mmol/cm², resultando numa área ocupada por molécula na interface de 83 Å², que é próximo do dobro da área encontrada para um surfactante não-iônico típico como C15E8 (octaetoxilato de pentadecila), 45,2 Å², a 298 K. Stanimirova e colegas (2011) relataram um valor um pouco superior de 113 ± 4 Å² de área ocupada por molécula de saponina de quilaia na interface, muito provavelmente devido a diferentes fontes de quilaia, que a partir do processamento, pode ter gerado alguma modificação estrutural nas saponinas. Devido a esse valor de área encontrado, os autores verificaram através de modelagem molecular que a orientação *lay-on* (todos os grupos hidrofílicos imersos em água) das saponinas na interface água-ar seria mais indicada do que a orientação *end-on* (apenas um grupo hidrofílico imerso em água), que teria uma área de 30 Å² (Figura 7).

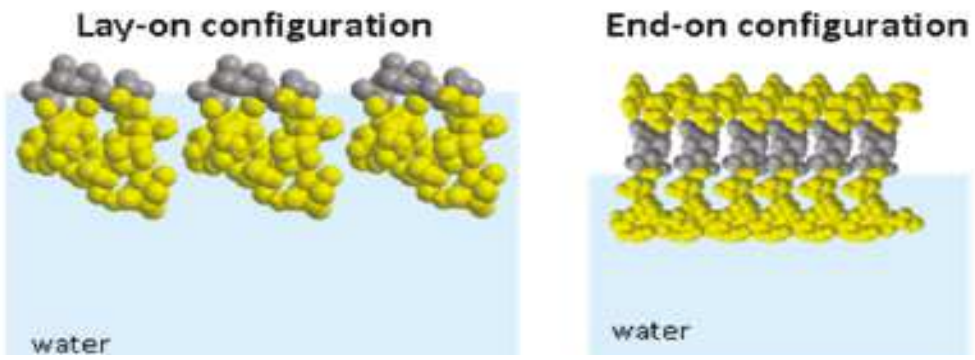


Figura 7 – Orientações possíveis de saponinas na interface água-ar (Stanimirova *et al*, 2011)

A solubilização micelar de compostos com baixa ou nenhuma solubilidade em água também é possibilitada pelas saponinas. Isso permite seu uso em processos de lavagem e biorremediação de poluentes como a solubilização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007), fenantreno (Zhou *et al*, 2011), hexaclorobenzeno (Kommalapati *et al*, 1997), naftaleno (Roy *et al*, 1997), petróleo (Urum & Pekdemir, 2004; Pekdemir *et al*, 2005) e no estímulo a bactérias na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos (Kaczorek *et al*, 2008), e no aumento da biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos, como carbamazepina e flurbiprofeno (Peixoto *et al*, 2011), progesterona, alfa-tocoferol (Sasaki *et al*, 1988) e quercetina (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007), além de aumentar a solubilização de outras saponinas, como as monodesmosídicas (Morita *et al*, 1986; Sasaki *et al*, 1988).

2.2.3.2) Interações com Esteróis

As saponinas são conhecidas por interagirem com esteróis formando complexos com ergosterol, colesterol e fitoesteróis. Esta interação é base de uma gama variada de atividades biológicas e farmacológicas associadas a aspectos estruturais (tipos de agliconas e cadeias de monossacarídeos), como atividade hemolítica, atividade antifúngica, antiprotozoário e hipocolesterolêmica (Micich *et al*, 1992; Hwang & Damodaran, 1994; Mitra & Dungan, 2000), permitindo até mesmo seu uso como agente permeabilizante celular para análise em citometria de fluxo (Pereira *et al*, 2007).

A atividade hemolítica é atribuída à interação entre as saponinas e os esteróis da membrana do eritrócito, causando aumento de permeabilidade e sua ruptura da célula (Sparg *et al*, 2004). Wang e colaboradores (2007) associaram a atividade hemolítica à estrutura das saponinas e concluíram que, a partir da mesma aglicona, as saponinas que apresentam cadeias de monossacarídeos maiores geram maior atividade hemolítica. O mesmo acontece com o grau de acetilação das oses. Magid e colaboradores (2006) complementam que saponinas monodesmosídicas possuem muito mais atividade hemolítica que as bidesmosídicas, que são praticamente inativas. A presença de grupos ésteres também favorece a hemólise devido a

diminuição da polaridade (Hosttetmann & Marston, 2005). Chwalek e colaboradores (2006) correlacionaram a atividade hemolítica com diferentes modificações na cadeia glicosídica de saponinas de hera, indicando que anômeros de arabinose na forma alfa são mais hemolíticos que os da forma beta, e que a metilação do grupo carboxílico da hederagenina aumenta o poder hemolítico pelo menos 3 vezes. Gauthier e colaboradores (2009) citaram que saponinas com estrutura oleanólica possuem muito mais atividade hemolítica que as de estrutura lupanólica, derivadas de ácido betulínico, praticamente inativas; e, além disso, Kaiser *et al* (2010), através de uma análise estatística multivariada, estabeleceram que na saponina oleanólica a presença de hidroxila no C-16, CH_2OH no C-17, acetila em C-22 e acila em C-21 aumentam a atividade hemolítica.

O modo de ação das saponinas sobre as membranas celulares, exemplificado na Figura 8, ocorre com a incorporação espontânea destas na membrana através da sua parte hidrofóbica, favorecendo assim a formação de complexos (1:1 molar) entre essas e os esteróis presentes nas membranas. Estes complexos se acumulam, gerando perturbação e curvatura na membrana, podendo culminar na formação de um poro ou alterações hemitubulares, produzindo vesículas. Assim, estes poros aumentam a permeabilidade da membrana permitindo a passagem de íons e macromoléculas. Outro modelo indica que a ação das saponinas é sobre os microdomínios lipídicos (*lipid raft*) que apresenta maior concentração de colesterol e esfingolipídeos, e que esta interação promoveria uma desorganização da membrana e um rompimento do microdomínio (Augustin *et al*, 2011).

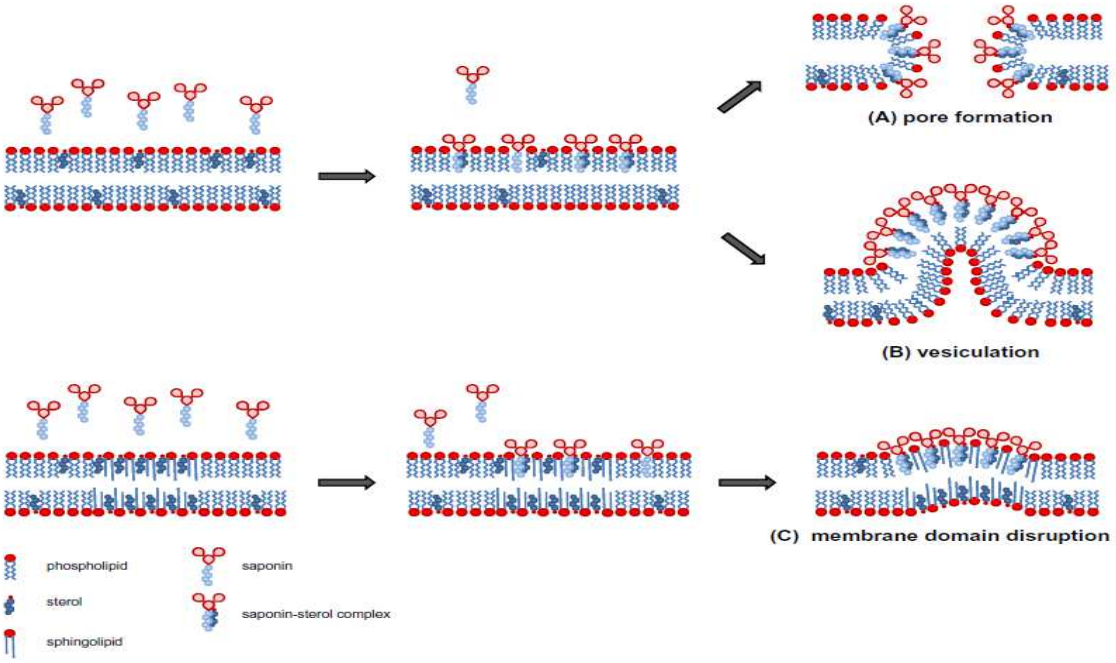


Figura 8 – Esquema das alteraçãoes na membrana celular promovido pela interação saponina-colesterol (Augustin *et al*, 2011)

As saponinas também podem apresentar um efeito hipocolesterolêmico em animais e humanos, resultando numa diminuição nas concentraçãoes de colesterol no sangue e no fígado. Isso pode ocorrer pela formação de complexos com colesterol inibindo sua absorção pelo intestino, e também pela solubilização dos sais biliares, aumentando assim sua excreção fecal, e estimulando a conversão do colesterol em ácidos biliares (Cheeke, 2000; Shi *et al*, 2004). Uma redução de 20% no teor de colesterol no plasma sanguineo foi obtida com administração de platicodinas e saponinas de alfafa, feno-grego, soja e feijão branco, confirmando que a presença de carboxilas na aglicona influencia positivamente a hipocolesterolemia (Story *et al*, 1984; Petit *et al*, 1995; Waller, 1999; Shi *et al*, 2004; Zhao *et al*, 2008).

A atividade antifúngica das saponinas também ocorre devido à interação destas com esteróis da membrana plasmática, só que neste caso com o ergosterol, formando poros e a perda da integridade da membrana, causando a morte celular. Normalmente as plantas armazenam as saponinas na forma bidesmosídica, e ativam uma glucosidase para transformá-la em monodesmosídica quando há ataque microbiano. Saponinas modesmosídicas com cadeias de 4 a 5 monossacarídeos apresentam maior atividade antifúngica (Yang *et al*, 2006). A atividade antibacteriana das saponinas, entretanto, é muito pequena ou nula, atuando em proteínas e enzimas da membrana (Oleszek, 2000; Sparg *et al*, 2004; Hostettmann & Marston, 2005). Um possível uso das saponinas nesse caso seria no auxílio do controle biológico de fungos fitopatogênicos (Hao *et al*, 2011). Também atuam como antiprotozoários no tratamento de malária, leishmaniose e doença de Chagas, ou só para promover sua eliminação no rúmen do gado para promover sua engorda (Cheeke, 2000; Sparg *et al*, 2004; Wallace, 2004; Campos *et al*, 2005; Piacente *et al*, 2005; Cheeke *et al*, 2006).

A atividade antimicrobiana tem como princípio a avaliação do grau de eficiência de inibição ou inativação de uma faixa selecionada de microrganismos sob condições especificadas. Para isso, testes de rastreamento para obtenção de informações preliminares podem ser utilizados, como os "*endpoint tests*", nos quais os microrganismos são testados por um período arbitrário de tempo de incubação, gerando informações sobre a concentração efetiva dos compostos antimicrobianos, e os descritivos, que fornece dados quantitativos sobre a dinâmica de crescimento dos microrganismos (Davidson *et al*, 2005).

Os "*endpoint tests*" mais utilizados são o método de difusão em ágar, que correlaciona a atividade antimicrobiana com um maior diâmetro da zona de inibição de crescimento microbiano, sendo apenas qualitativo, e o método de diluição sucessivas (em ágar ou em caldo), utilizado para obtenção de dados quantitativos, como a concentração inibitória mínima (CIM), que é a menor concentração de antimicrobiano que previne o crescimento do microrganismo, e a concentração letal mínima (CLM), que é a menor concentração de antimicrobiano necessária para redução de 99,9% dos microrganismos. Dependendo do microrganismo testado, a CLM pode ser chamada de concentração fungicida mínima (CFM) ou concentração bactericida mínima (CBM) (Davidson *et al*, 2005; Schwalbe *et al*, 2007). Na Tabela 2, algumas CIMs de extratos ricos em saponinas podem ser visualizados.

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) de possíveis saponinas presentes em extratos vegetais

Matéria-prima	Extração/ Purificação	CIM (µg/mL)	Microrganismo	Referências
Banana-de-papagaio (*Swartzia langsdorffii*)	Etanol	125	*Candida albicans, C. krusei, C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*	Marqui *et al*, 2008
Ginseng (*Panax ginseng*)	80% Metanol e Butanol	100	*Staphylococcus epidermidis, S. aureus, Salmonella typhimurium* e *Vibrio vulnificus*	Sung & Lee, 2008
Juá (*Ziziphus joazeiro*)	Água	25 6,25 100 6,25 400	*Candida albicans* *Candida guilliermondii* *Cryptococcus neoformans* *Trichophyton rubrum* *Fonsecaea pedrosoi*	Cruz *et al*, 2007
Alho (*Allium sativum*): Saponina Furostanólica	Metanol e Cromatografia	> 800 > 800	*Candida albicans* *Aspergillus niger*	Matsuura *et al*, 1988
Alho (*Allium sativum*): Saponina Espirostanólica	Metanol e Cromatografia	25 400	*Candida albicans* *Aspergillus niger*	Matsuura *et al*, 1988
Chá (*Camellia sinensis*)	Comercial	500 > 2000 2000	*Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Candida albicans*	Li *et al*, 2009
Yucca schidigera	Etanol e Cromatografia	62,5 31,3 125 31,3 31,3 62,5 31,3 62,5 31,3 > 1000 > 1000 31,3 15,6 > 1000 > 1000 31,3 15,6 31,3	*Candida albicans* *Candida famata* *Cryptococcus laurentii* *Debaryomyces hansenii* *Hansenula anomala* *Kloeckera apiculata* *Pichia nakazawae* e *P. carsonii* *Saccharomyces cerevisiae* *Zygosaccharomyces rouxii* *Aspergillus awamori* e *A. niger* *Aspergillus oryzae* e *A. sydowii* *Epidermophyton floccosum* *Mucor pusillus* *Penicillium expansum* *Rhizopus formosaensis* e *R. nigricans* *Microsporum canis* *Trichophyton rubrum* *Trichophyton mentagrophytes*	Miyakoshi *et al*, 2000
Quinoa (*Chenopodium quinoa*)	Metanol e Butanol	50	*Candida albicans*	Woldemichael & Wink, 2001

Inhame (*Dioscorea cayenensis*): Dioscina	Metanol 70%, Butanol e Cromatografia	12,5 12,5 25	*Candida albicans* *Candida glabrata* *Candida tropicalis*	Sautour *et al*, 2004
Smilacina atropurpurea	Metanol, Butanol e Cromatografia	10 20 5 20	*Candida albicans* *Candida glabrata* *Cryptococcus neoformans* *Aspergillius fumigatus*	Zhang *et al*, 2006a
Pimentão (*Capsicum annuum*): 22-O-Metilcapsicosídeo G	Metanol, Butanol e Cromatografia	25 12,5 25 25 12,5 25 12,5 12,5 500 250 125 250	*Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomycoides ludwigii* *Schizosaccharomyces pombe* *Candida albicans* *Kloeckera apiculata* *Hanseniaspora osmophila* *Hanseniaspora vinae* e *H. uvarum* *Hanseniaspora guilliermondii* *Penicillium expansum* *Phoma terrestris* *Rhizopus orizea* *Trichoderma viride*	Iorizzi *et al*, 2002
Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*)	Metanol	3130 780 1560	*Staphylococcus aureus* *Salmonella typhimurium* *Escherichia coli*	Hassan *et al*, 2010
Gymnema sylvestre/ *Eclipta prostrata*	Metanol, Acetona e Cromatografia	800/1200 1000/1200 1000/1200 1200/1000 600/1000 1200/1000 1400/1400	*Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* *Salmonella typhi* *Klebsiella pneumoniae* *Proteus mirabilis* *Staphylococcus aureus* *Aspergillus fumigatus, A. flavus e A. niger*	Khanna & Kannabiran, 2008
Phytolacca tetramera	Metanol e Butanol	250 500 125 250 125 250 100 250 250	*Candida albicans* *Candida tropicalis* *Saccharomyces cerevisiae* *Cryptococcus neoformans* *Aspergillus flavus* *Microsporum canis* e *M. gypseum* *Trichophyton mentagrophytes* *Trichophyton rubrum* *Epidermophyton floccosum*	Escalante *et al*, 2002

Depois da CIM ter sido determinada, os testes descritivos podem ser realizados pela curva de inibição (*time-kill curve*), onde o microrganismo é incubado na presença do composto antimicrobiano, na concentração determinada, por até 48 h, verificando em 0, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 h a viabilidade celular destes, ou pela detecção de turbidez em espectrofotômetro, determinando a concentração inibitória infinita (CII), onde o inverso da efetividade relativa (ER), que significa a razão do tempo de uma população microbiana em alcançar uma turbidez específica na presença de um antimicrobiano pelo tempo da mesma população microbiana alcançar esta turbidez na ausência deste, deve tender a zero (Davidson *et al*, 2005; Schwalbe *et al*, 2007). Sung & Lee (2008) fizeram a curva de inibição dos ginsenosídeos, em uma concentração de 100 µg/mL, contra *Staphylococcus aureus* necessitando de 210 min para a ação bactericida.

2.2.3.3) Interações com Proteínas

As saponinas também realizam interações com proteínas, podendo gerar alterações na sua topologia. Essa interação está associada com várias atividades farmacológicas, como por exemplo, a interação das saponinas com receptores de glicocorticóides, que pode induzir ação anti-inflamatória e neuroprotetora, além de apoptose e adipogênese (Augustin *et al*, 2011; Hong & Lyu, 2011); interação com proteínas da membrana celular, como os canais de Ca^{+2} e as Na, K-ATPases, pode ter um efeito citotóxico (Mimaki *et al*, 1999; Park *et al*, 2005; Chwalek *et al*, 2006; Augustin *et al*, 2011), ou a inibição da síntese de DNA (Sampson *et al*, 2001), pode ter uma ação antitumoral; inibição de algumas enzimas presentes na matriz extracelular, como colagenase, elastase e hialuronidase, sendo associado a uma ação antienvelhecimento, restaurando o equilíbro anabólico/catábolico, e a uma venotônica, diminuindo a permeabilidade do sistema capilar (Facino *et al*, 1995; Wilkinson & Brown, 1999; Aburjai & Natsheh, 2003; Thring *et al*, 2009); inibição da lipase e amilase pancreática, podendo gerar um efeito antiobesidade e hipoglicemiante (Önning & Asp, 1995; Birari & Bhutani, 2007); inibição de metaloproteases de células tumorais obtendo uma ação antimetastática (Man *et al*, 2011); inibição do sistema renina-angiotensina, evitando problemas de hipertensão (Takahashi *et al*, 2010); inibição da ciclooxigenase 2 e da óxido nítrico sintase, gerando ação analgésica (Süleyman *et al*, 2003; Neto *et al*, 2005; Puangpraphant & De Mejia, 2009).

Esta interação de saponinas e proteínas também influencia em outras aplicações, já que algumas propriedades funcionais, como tensão superficial, formação de emulsões e de espuma, além de estabilidade térmica e à hidrólise enzimática, podem ser alteradas, sendo dependentes da concentração de saponina e do tipo de estrutura da proteína e/ou da enzima envolvida, variando a proporção das interações eletrostáticas e hidrofóbicas envolvidas (Potter *et al*, 1993; Shimoyamada *et al*, 2000; Sarnthein-Graf & La Mesa, 2004; Heng, 2005; Wojciechowski *et al*, 2011). Morton & Murray (2001) relataram que a interação de saponinas e proteínas de beterraba geram problemas de turbidez no processamento de bebidas carbonatadas.

2.2.3.4) Modificações estruturais

A estrutura complexa das saponinas pode sofrer transformações químicas durante a estocagem e o processamento, que podem modificar suas propriedades, e uma diminuição no seu percentual em até 60%. A ligação glicosídica pode ser hidrolisada na presença de ácidos ou bases, devido à hidrotermólise (aquecimento na presença de água) ou por atividade enzimática e/ou microbiana resultando na formação de agliconas, prosapogeninas, mono- e oligossacarídeos, dependendo do método e condições de hidrólise (Önning *et al*, 1994; Shi *et al*, 2004; Hostettmann & Marston, 2005; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

Wang *et* al (2012) e An *et al* (2011) realizaram a modificação de ginsenosídeos apenas por processamento térmico pressurizado. Heng e colaboradores (2006) discutiram sobre o uso de etanol em concentrações maiores que 30% como estabilizante de saponinas com grupos DDMP frente a temperaturas maiores que 65ºC, mas se as saponinas apresentarem carboxilas livres, em condições próximas do ponto de ebulição do álcool, ocorre a esterificação das saponinas entre 2 e 10% (Tava *et al*, 2003).

A alteração estrutural das saponinas pode gerar propriedades diferentes, como um maior poder surfactante ou atividade antimicrobiana. Por isso, alguns estudos tem sido realizados em biotransformação microbiana, como a inserção de um grupo hidroxila no C-22 de uma hederagenina (Murgu *et al*, 2008), hidrólise de saponinas esteroidais para produção de diosgenina (Liu *et al*, 2010a), conversão do ginsenosídeo Rb1 em Rd, mais farmacologicamente ativo (Ye *et al*, 2010), ou com uso de glicosidases, como a modificação de platicodinas por celulases e hemicelulases (Wie *et al*, 2007), produção do Composto K a partir de ginsenosídeos através de pectinases (Kim *et al*, 2006), obtenção do 20 (*S*)-ginsenosídeo Rg3 por ação de celulases (Chang *et al*, 2009), e modificação das saponinas de quilaia para seu uso como estabilizante de espuma de cerveja (Alárcon-Camacho & Sainz-Lobo, 2010). Outra opção seria utilizar as saponinas apenas como matéria-prima para produção de suas agliconas, como a diosgenina, utilizando uma hidrólise ácida (Rothrock *et al*, 1957; Li *et al*, 2010a; Peng *et al*, 2011).

2.2.3.5) Toxidez

A toxidez das saponinas para animais de sangue quente é dependente do método de administração, fonte, composição da mistura e concentração. Estas apresentam baixa absorção pelas células intestinais ou sofrem hidrólise enzimática e, por isso, a via oral é o que menos problemas podem causar. Altas doses de ácido glicirrízico podem gerar um desequilíbrio nas concentrações de sódio e potássio causando retenção hídrica e aumento de pressão sanguínea (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007). No caso de concentrações altas (acima de dez vezes a dose normal em prescrições clínicas) do extrato etanólico de *Dioscorea zingiberensis* pode causar danos ao fígado (Qin *et al*, 2009). Em animais de sangue-frio, entretanto, as saponinas apresentam toxidez elevada, atuando como icitiocidas, inseticidas, larvicidas, molusquicidas (controle do caramujo transmissor da esquistossomose) e anti-helmínticos (Teixeira *et al*, 1984; Ekabo *et al*, 1996; Helaly *et al*, 1999; Pizarro *et al*, 1999; Sparg *et al*, 2004; Hostettmann & Marston, 2005; Santiago *et al*¸ 2005).

2.2.3.6) Atividade Antioxidante

Os antioxidantes são compostos que, presentes em pequenas concentrações em relação ao um substrato oxidável, conseguem atrasar ou inibir a oxidação deste. Normalmente atuam suprimindo a formação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou removendo espécies reativas rapidamente antes que atinjam moléculas essenciais em organismos (Laguerre *et al*, 2007; Niki, 2010). Esses radicais livres geram um estresse oxidativo no organismo, proporcionando oxidação em lipídios, proteínas, polissacarídeos e DNA, e assim causando, além de envelhecimento, inúmeras doenças degenerativas, cardiovasculares, mal de Alzheimer e de Parkinson (Krishnaiah *et al*, 2011). Essa capacidade antioxidante pode ser explorada em testes que avaliam a peroxidação de lipídios; pela formação de malonaldeído, que pode ser analisado por HPLC e GC-MS, ou por espectrofotometria na forma de um aduto com ácido tiobarbitúrico, ou no branqueamento do β-caroteno na formação do peróxido de ácido linoléico; ou então avaliam a captura dos radicais livres como DPPH e ABTS, ou promovendo a redução e/ou a oxidação dos íons de ferro que estejam acoplados ou complexados a um corante, ou não permitindo a ação do sistema hipoxantina/xantina oxidase pela captura de radicais superóxido (Moon & Shibamoto, 2009; Krishnaiah *et al*, 2011).

Algumas saponinas podem ter atividade antioxidante, capturando radicais livres tanto de fases aquosas como de hidrofóbicas (Xi *et al*, 2008), ou de forma indireta, apenas estimulando sistemas enzimáticos antioxidantes e inibindo a formação de complexos de radicais livres com íons metálicos (Huong *et al*, 1998). Nzowa e colaboradores (2010) provaram que as saponinas de *Entada rheedii* realmente capturavam radicais superóxido ao invés de só inibir a xantina oxidase. Ryu e colaboradores (2012) relataram que saponinas de *Platycodon grandiflorum* que apresentam grupo hidroxila no C-23 e 24 capturam melhor radicais peroxinitritos do que peroxilas, e com o aumento de monossacarídeos ligados à aglicona, a captura de peroxilas diminuía, mas sem alterações em relação aos peroxinitritos.

2.2.3.7) Outras Propriedades

Normalmente, as saponinas possuem um sabor amargo, mas há suas exceções como a glicirrizina do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), as periandrinas do alcaçuz brasileiro (*Periandra dulcis*), albiziasaponinas de *Albizia myriophylla*, os abrusosídeos das folhas do gênero *Abrus* sp., os pterocariosídeos e ciclocariosídeos de *Pterocarya paliurus*, que são de 50 a 300 vezes mais doce que a sacarose, e todas pelo menos apresentado grupos carboxila no C-30 ou ácido glucorônico na cadeia glicosídica (Kinghorn & Soejarto, 2002; Yoshikawa *et al*, 2002; Heng, 2005).

As saponinas também podem interagir com minerais como cálcio e ferro (Shi *et al*, 2004; Yoshiki *et al*, 2005), e metais pesados, como cobre, zinco, níquel, cromo, cádmio e chumbo, possibilitando seu uso na recuperação de metais pesados de solos e efluentes (Hong *et al*, 2002; Chen *et al*, 2008; Song *et al*, 2008; Yuan *et al*, 2008; Kiliç *et al*, 2011; Gusiatin & Klimiuk, 2012). Essa interação só ocorre com saponinas que apresentem grupos carboxilas (Yuan *et al*, 2008). Önning e colaboradores (1994) relataram que a presença de Fe^{+3} em processamento térmico de aveia leva a degradação dos avenacosídeos.

As saponinas apresentam também outras atividades farmacológicas como imunoadjuvantes em vacinas, estimulando a produção de linfócitos e de resposta imune (Santos *et al*, 1997, 2002; Sun *et al*, 2006, 2009; Song & Hu, 2009; Silveira *et al*, 2011); cicatrizante, onde as saponinas estimulam os queratinócitos com a produção de fatores de crescimento e citocinas (Sampson *et al*, 2001); antiviral, agindo na cápsula viral ou nas membranas das células hospedeiras, inutilizando os sítios de ligações com os vírus (Aquino *et al*, 1989; Yoshiki *et al*, 1998; Tam & Roner, 2011); inibidor de absorção de etanol (Yoshikawa *et al*, 1996b) e de glicose (Shimizu *et al*, 2001); gastroprotetor (Yoshikawa *et al*, 2001); antimutagênica (Krizková *et al*, 2004) e espermicida (Sparg *et al*, 2004).

2.3) FONTES DE SAPONINAS

Todas as plantas escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho apresentam dados sobre a presença de saponinas previamente relatados na literatura. Como há uma grande variedade de matérias-primas, estas serão aqui subdivididas de acordo com a parte da planta utilizada para extração de saponinas.

2.3.1) Raízes

As espécies de alcaçuz são ervas perenes da Família Fabaceae, nativas da Região Mediterrânea, Rússia e Ásia Menor, apresentando mais de 30 espécies, incluindo *Glycyrrhiza glabra* (que possui 3 variedades: persa ou turca, var. *violacea*; russa, var. *gladulifera*; espanhola ou italiana, var. *typical*), *G. uralensis*, *G. inflata*, *G. aspera*, *G. korshinskyi* e *G. eurycarpa*. Suas raízes apresentam saponinas triterpênicas (4-20%), principalmente glicirrizina, que é mistura de sais de cálcio e potásssio de ácido glicirrizínico (Figura 9A). Além disso, suas raízes têm flavonóides, chalconas, isoflavonas, cumarinas, estilbenos, lactonas, triterpenos, ácidos graxos, glicose, sacarose, amido e arabinogalactanas (Nassiri Asl & Hosseinzadeh, 2008). Sua produção mundial está entre 30 e 40 mil toneladas anuais, sendo utilizado principalmente em produtos de confeitaria e como adoçante (Ibanoglu & Ibanoglu, 2000; http://www.crop.cri.nz, 2010).

No Brasil, este alcaçuz geralmente é importado, mas o gênero *Periandra* que tem em suas raízes saponinas muito similares, as periandrinas (entre 0,7 e 1,3%, Figura 9B), é utilizado como substituto, sendo conhecido como alcaçuz brasileiro. Também da Família Fabaceae, as espécies encontradas são: *Periandra mediterranea* (antiga *P. dulcis*), *P. gracilis*, *P. coccinea*, *P. pujalu*, *P. densiflora* e *P. heterophylla*, tendo sua produção ainda em sistema de manejo. Alguns estudos revelam outros componentes em suas raízes, como outras saponinas (periandradulcinas), triterpenos e glucanas com propriedades anti-inflamatórias e adjuvantes (Hashimoto *et al*, 1982; Ikeda *et al*, 1991; Suttisri *et al*, 1993; Santos *et al*, 1997; Funch & Barroso, 1999; Pereira *et al*, 2000).

Outra raiz muita estudada é o ginseng, pertencente à Família Araliaceae, que apresenta várias espécies cultivadas nos Estados Unidos, Canadá, China, Japão e Coréia do Sul, como *Panax ginseng* (ginseng coreano, chinês ou asiático), *P. quinquefolium* (ginseng americano), *P. japonicus* (ginseng japonês), *P. notoginseng* (notoginseng ou sanqi), *P. pseudoginseng* (ginseng himalaiao) e *P. trifolius* (ginseng anão). Suas saponinas são conhecidas como ginsenosídeos (Figura 9C), e apresentam teores que variam entre 1,5 a 6% do peso da raiz seca. Suas raízes ainda possuem sesquiterpenos, poliacetilenos, polissacarídeos, peptidoglicanas, ácidos graxos e compostos fenólicos. Sua produção mundial está entre 6 e 7 mil toneladas anuais e suas principais aplicações são em bebidas, fitoterápicos e como suplemento alimentar (Park *et al*, 2005; Angelova *et al*, 2008; Jia & Zhao, 2009; http://www.wanfangdata.com/, 2010).

Outras espécies que não são do gênero *Panax* também são chamadas ginseng. É o caso da *Eleutherococcus senticosus* (ginseng siberiano) e da *Pfaffia paniculata* (ginseng brasileiro). O gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, possui 27 espécies distribuídas pelo Brasil, além da citada anteriomente, como *P. glomerata*, *P. tuberosa* e *P. iresinoides*, sendo que a *P. paniculata* é a mais comercializada no Brasil, embora na Região Sul a *P. glomerata* seja mais freqüente. Os componentes presentes em suas raízes são as saponinas (fafosídeos, cerca de 4%, Figura 9D), triterpenos, fitoesteróis, ecdisteróides (exceto a *P. paniculata*) e alantoína. O gênero *Pfaffia* é utilizado no Brasil como fitoterápico, sendo sua produção por sistema de coleta, embora o seu manejo agrícola já esteja sendo iniciado pela Embrapa, com projetos de cultivo no Pantanal (Nakai *et al*, 1984; Nishimoto *et al*, 1984; Court, 2000; Rates & Gosmann, 2002; Mattos & Salis, 2005; Zimmer *et al*, 2006).

A maioria dos trabalhos relacionados às saponinas da beterraba (betavulgarosídeos, Figura 9E) se refere à variedade de beterraba sacarínica (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *altíssima*, Família Chenopodiaceae) que é amplamente cultivada na Europa, Estados Unidos e Rússia. A *B. vulgaris* apresenta cerca de 0,3% de saponinas tanto nas raízes como nas folhas. Por estarem presentes nas raízes, a matéria-prima utilizada para extração de saponinas é o melaço da beterraba, um resíduo do processamento de açúcar, onde estas, juntamente com açúcares e proteínas estão concentradas. Nesta tese, foram utilizadas as raízes e as folhas de beterraba vermelha (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*) visto que a grande similaridade taxonômica entre as duas espécies permite a investigação da presença de saponinas nesta espécie. Na raiz da beterraba vermelha ocorrem grandes quantidades de antocianinas e betalaínas, além de ácidos fenólicos e pectina. A produção brasileira foi próxima de 180 mil toneladas em 2006 (Ridout *et al*, 1994; Yoshikawa *et al*, 1996a, 1998; Ng *et al*, 1998; Brezhneva *et al*, 2001; Kujala *et al*, 2002).

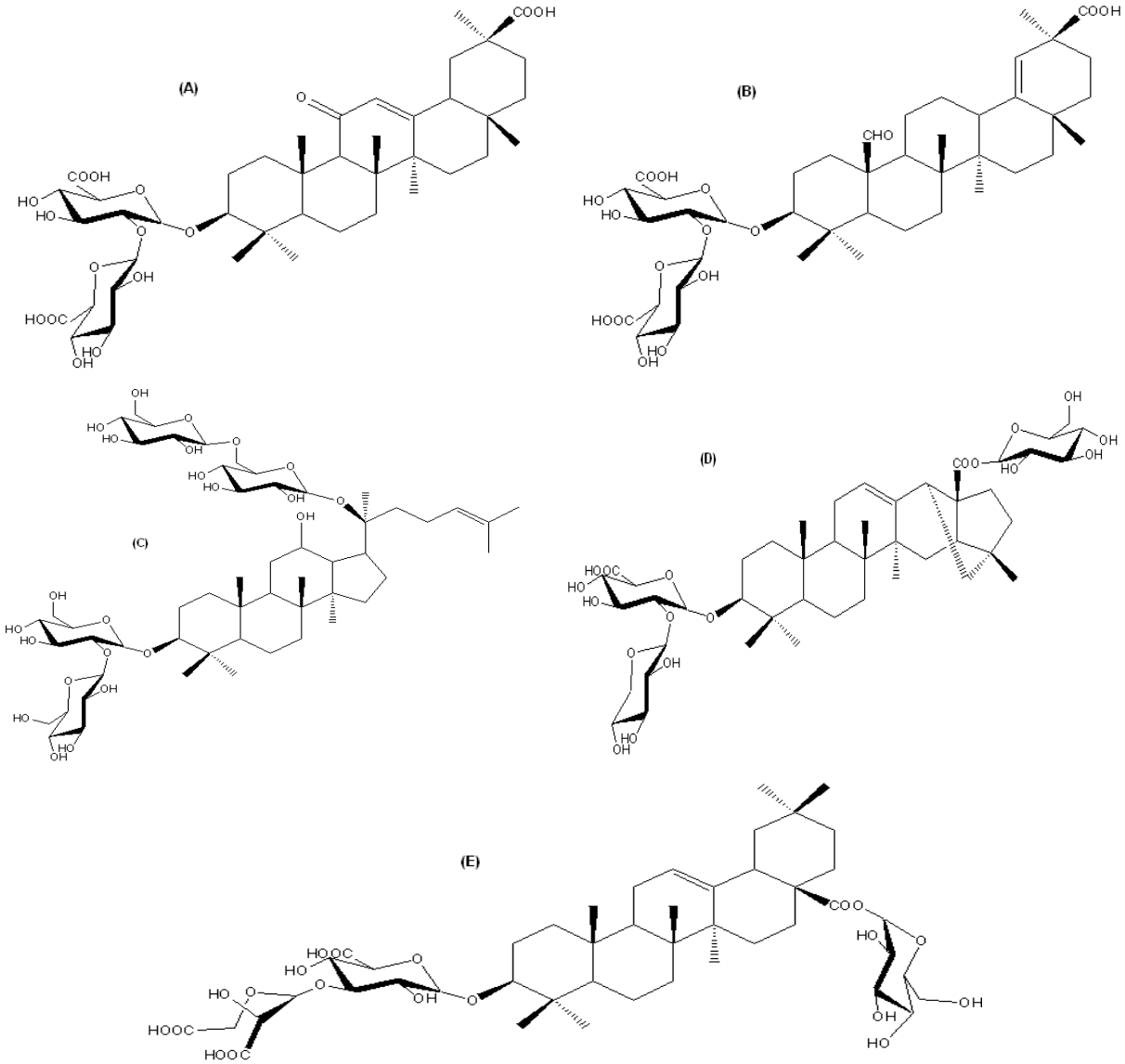


Figura 9 – Saponinas de raízes: (A) Ácido glicirrizínico, (B) Periandrina I, (C) Ginsenosídeo Rb1, (D) Fafosídeo B, (E) Betavulgarosídeo III

2.3.2) Caules

Como as plantas se irradiaram para vários habitats diferentes, precisaram desenvolver adaptações em suas estruturas, como no caso do caule, gerando tipos como hastes (ervas pequenas), troncos (árvores lenhosas), colmos (bambu), lianas (videira) e cladódios (cactus) que são formas aéreas, e bulbos (alho) e tubérculos (cará) que são formas subterrâneas (Gonçalves & Lorenzi, 2007).

O gênero *Allium* (Família Amaryllidaceae) é um dos mais antigos e comuns utilizados em alimentos e em medicamentos, sendo citado pelo Código de Ebers, em 1550 A.C.. Possui mais de 450 espécies, sendo os mais conhecidos o alho (*A. sativum*), a cebola (*A. cepa*), o alho-poró (*A. porrum*), a cebolinha-verde *(A. fistulosum*), a cebolinha-branca ou chalote *(A. ascalonicum*), a cebolinha-francesa *(A. schoenoprasum*) e o nirá (*A. tuberosum*). A produção mundial destes bulbos é elevada, com mais de 17 milhões toneladas de alho e 74 milhões toneladas de cebola. A produção anual de outras plantas do gênero chega a 3,6 milhões toneladas. No Brasil, essa produção é bem menor com 104 mil toneladas de alho; 1,75 milhão toneladas de cebola e aproximadamente 6 mil toneladas de alho-poró. Seus bulbos apresentam saponinas esteroidais (Figuras 10A, 10B e 10C), esteróides, flavonóides, tiosulfinatos e compostos organossulfurados. Todos possuem baixo teor de saponinas: 0,2% no alho, 0,8% na cebola e 0,6% no alho-poró (Matsuura *et al*, 1988; Carotenuto *et al*, 1999; Fattorusso *et* al, 2000; Corea *et al*, 2005; Lanzotti, 2005, 2006; Corzo-Martínez *et al*, 2007; http://faostat.fao.org/, 2010; http://www.sidra.ibge.gov.br/, 2010).

Outro bulbo que possui saponinas (entre 0,01 e 0,03%, Figura 10D) é o lírio, pertencente ao gênero *Lilium* (Família Liliaceae) com mais de 100 espécies, sendo 4 variedades híbridas comuns no Brasil: longiflorum, asiáticos, orientais e L.A. (híbrido de longiflorum e de asiático). Em seu bulbo, também há flavonóides, alcalóides, fitoesteróis e esteróides. Poucos dados sobre a produção de lírio estão relatados na literatura, mas como as flores de lírio são a terceira na preferência em vendas, e a produção de flores de corte e plantas ornamentais no Brasil se manteve em 50 mil toneladas em 2007, pode-se imaginar que a quantidade produzida seja significativa. Em relação à produção de bulbos, há um relato da produção de 11,5 milhões de bulbos comercializados nos Estados Unidos e Canadá em 1996. No Brasil, a produção de bulbos e flores de lírios ocorre principalmente em Holambra (SP) (Mimaki & Sashida, 1990; Mimaki *et* al, 1999; Erdogan *et al*, 2001; Caixeta-Filho *et al*, 2002; Fráguas *et al*, 2002; Eisenreichová *et al*, 2004; Junqueira & Peetz, 2008; http://aggie-horticulture.tamu.edu/, 2010).

Já os tubérculos do gênero *Dioscorea* (Família Dioscoreaceae), com mais de 600 espécies espalhadas pelo mundo, são bem conhecidos por possuir grande quantidade de amido, mas sempre houve muito desentendimento em torno do seu nome comum, cará e inhame, devido à semelhança com a espécie *Colocasia esculenta* (Família Araceae). Por isso, em 1999 foi proposta a padronização da nomenclatura onde inhame seriam as espécies relacionadas ao gênero *Dioscorea*, e taro seria o nome vulgar da espécie *Colocasia esculenta*. As espécies comercializadas no Brasil são inhame ou cará (*D. alata*), cará-doce (*D. trifida*), cará-da-costa (*D. cayennensis*), cará-de-rama ou cará-do-ar (*D. bulbifera*) e cará-barbado ou caratinga (*D. dodecaneura*). Além de amido, seus tubérculos possuem saponinas (variando de 0,08 a 5%, Figura 10E), proteínas, flavonóides, ácidos fenólicos, tocoferóis, cromenos, coenzima Q e mucilagem. A produção mundial de inhame é de 48,7 milhões ton, e no Brasil de 232 mil ton (Mascarenhas & Resende, 2002; Pedralli *et al*, 2002; Sautour *et al*, 2006; Cheng *et al*, 2007; Huang *et al*, 2007; Lin & Yang, 2008; http://faostat.fao.org/, 2010).

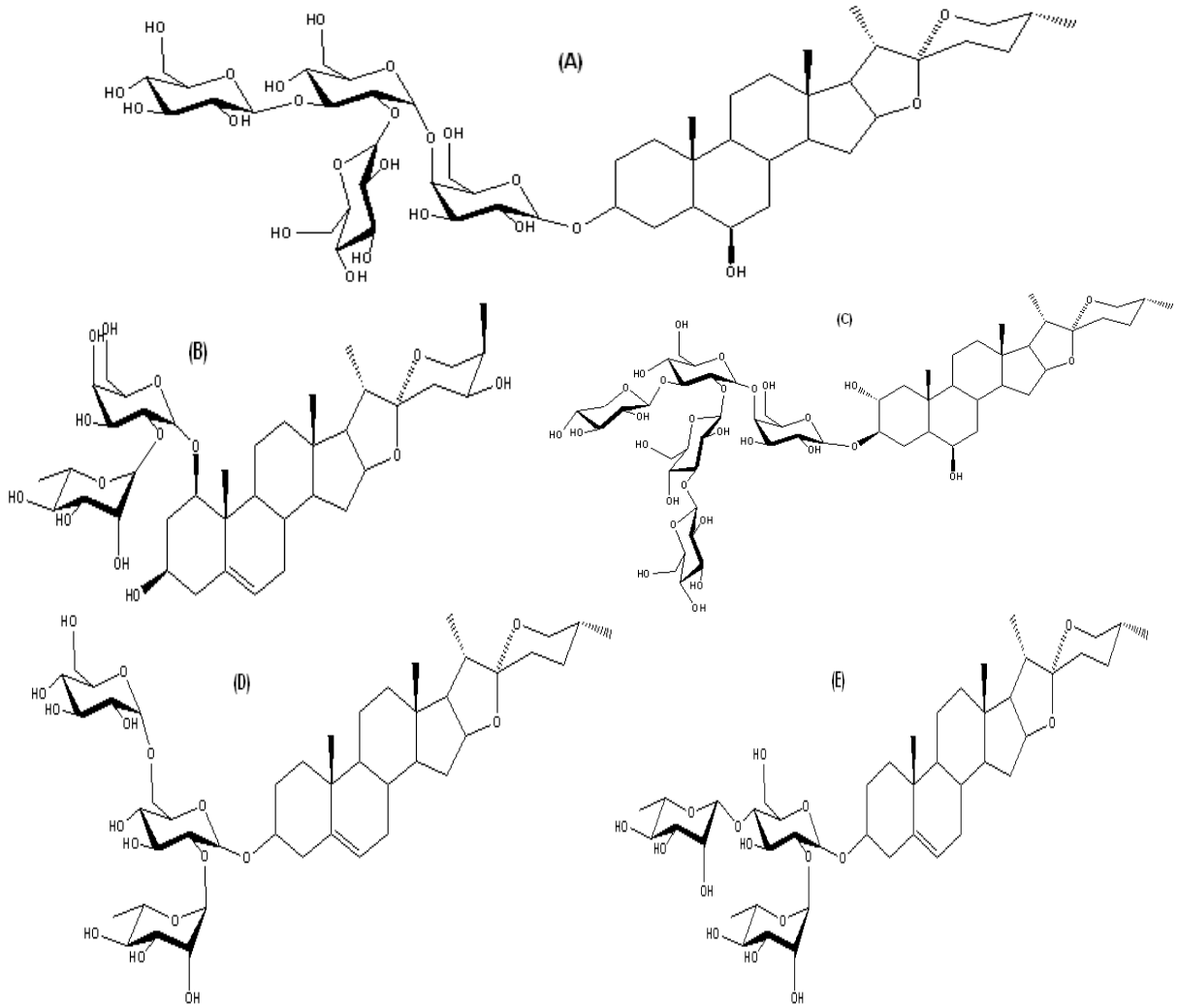


Figura 10 - Saponinas de bulbos e tubérculo: (A) Erubosídeo B (Alho); (B) Aliospirosídeo D (Cebola), (C) Saponina esteroidal de alho poró, (D) Saponina esteroidal de lírio; (E) Dioscina.

As propriedades espumógenas das cascas de *Quillaja saponaria* (Família Quillajaceae) foram observadas pelos índios Mapuches do Chile desde tempos antigos, utilizando-as para lavagem de roupas e cabelo. Essas propriedades estão associadas diretamente com as saponinas (entre 5 e 20%, Figura 11A), presentes na casca, que também possui taninos, proteínas, oxalato de cálcio e açúcares. De 20 mil toneladas de árvores cortadas anualmente para extração, apenas 11% do peso obtido da biomassa, que representam a casca, são usados. Por isso alguns estudos estão sendo feitos para que se utilize a árvore inteira para extração de saponinas. Dois tipos de extrato de quilaia são oferecidos no mercado: o Tipo 1, que possui 20-26% de saponinas e o Tipo 2, que alcança 70-95% de saponinas devido ao processo de concentração por ultrafiltração. Suas principais utilizações são em dentifrícios, bebidas e adjuvantes em vacinas (San Martín & Briones, 1999; Copaja *et al*, 2003; Resnick, 2004).

O juá (*Ziziphus joazeiro*, Família Rhamnaceae) ocorre no Brasil desde o Ceará até Mato Grosso do Sul, sendo muito importante para o Sertão Nordestino, que utiliza suas folhas para alimentação do gado, seus frutos como alimento e suas cascas como detergente, dentifrício e fitoterápico. A sua produção se dá de forma exclusivamente extrativista. O gênero *Ziziphus* possui mais de 30 espécies, sendo que além do juá, mais 4 são encontradas no Brasil: *Z. cinnamomum*, *Z. cotinifolia*, *Z. platyphylla* e *Z. undulata*. Além das saponinas (jujubosídeos, entre 2 a 10%, Figura 11B), são encontrados nas suas cascas triterpenos, estearato de glicerila, alcalóides (amphibinas) e cafeína (Higuchi *et al*, 1984; Barbosa-Filho *et al*, 1985; Barbosa-Filho, 1997; Schühly *et al*, 2000; Carvalho *et al*, 2007; http://www.cnip.org.br/, 2010).

O gênero *Uncaria* (Família Rubiaceae) é representado por 60 espécies de lianas, sendo que na Amazônia e na América Central duas espécies chamadas de unha-de-gato são mais comuns: *U. tomentosa* e *U. guianensis*. No Brasil, sua produção é por sistema de coleta, enquanto no Peru já há o cultivo com produção anual de 700 toneladas. Seu principal uso é como fitoterápico, apesar de estudos recentes terem verificado sua ação larvicida. Suas cascas apresentam saponinas (cerca de 0,6%, Figura 11C), flavonóides, alcalóides oxindólicos, triterpenos, taninos e fitoesteróis (Cerri *et al*, 1988; Elliot, 2000; Miranda *et al*, 2001; Valente *et al*, 2006, 2009).

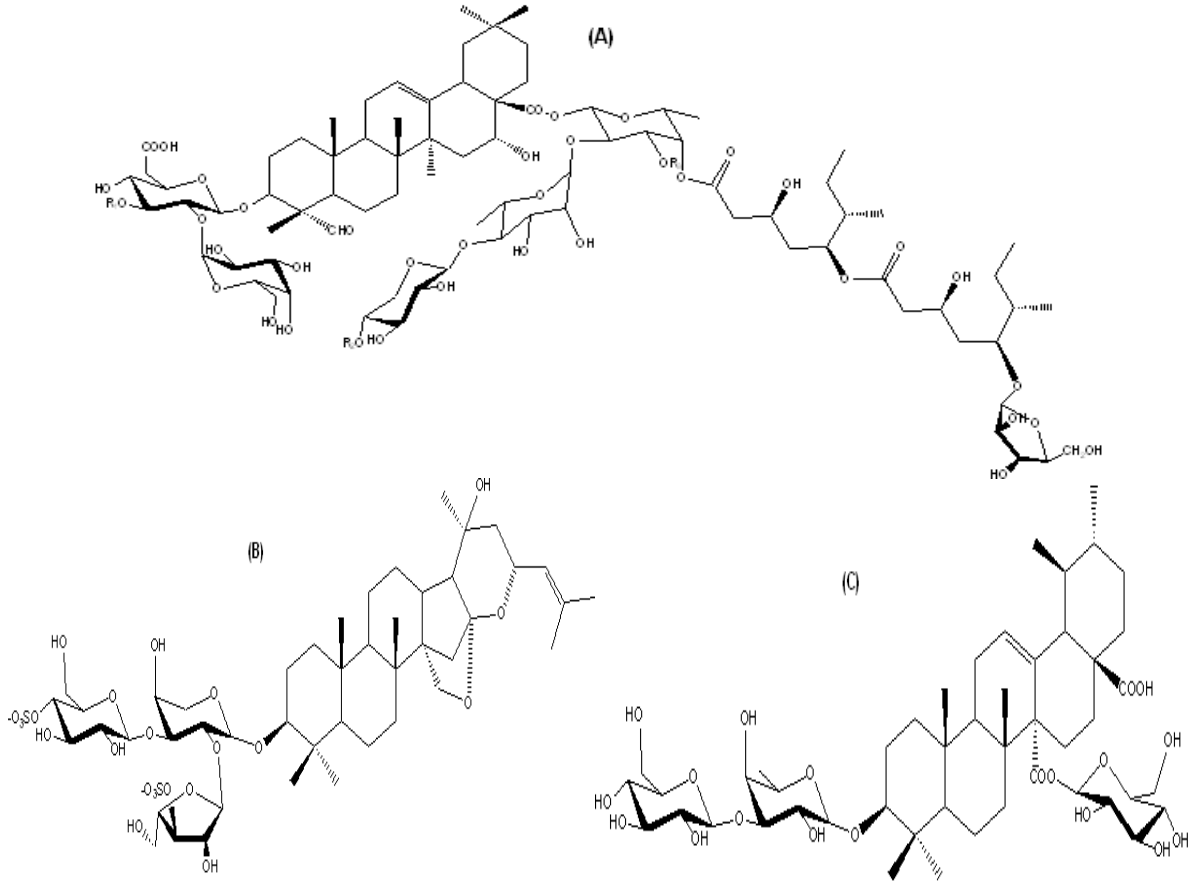


Figura 11 – Saponinas de cascas de tronco: (A) Saponina geral de quilaia (R pode ser xilose, ramnose ou apiose); (B) Jujubosídeo sulfatado; (C) Saponina 1 de unha-de-gato

2.3.3) Folhas

Centella asiatica, é uma erva da família Araliaceae, e é oriunda de regiões quentes de ambos os hemisférios, sendo abundante em áreas pantanosas da Índia, Iran e Paquistão. A centela possui diferentes variedades em relação à origem geográfica que estão correlacionadas com a morfologia foliar e sua composição química: *C. asiatica* var. *typica* (Ásia tropical e Madasgacar), *C. asiatica* var. *abyssinica* (África tropical e equatorial) e *C. asiatica* var. *floridana* (Sul dos Estados Unidos até Argentina e Oceania). Não foram encontrados relatos econômicos sobre esta planta, levantando-se a hipótese, portanto, que sua produção seja por coleta. As partes aéreas da planta contêm saponinas (asiaticosídeo e madecassosídeo, 3 a 12%, Figura 12A), triterpenos, flavonóides, fitoesteróis, óleo essencial, clorofila, lipídeos e poliacetilenos. Seu uso é como fitoterápico (Inamdar *et al*. 1996; Bajaj, 1998; Yu *et al*, 2007; Zheng & Qin, 2007; Subban *et al*, 2008; Rafamantanana *et al*, 2009).

O gênero *Hedera* (Família Araliaceae) consiste de 15 espécies distribuídas pela Europa, Norte da África, Macaronésia e Ásia. A hera (*Hedera helix*) possui 3 subespécies: *H. helix* subsp. *helix* (Norte, Oeste e Centro da Europa), *H. helix* subsp. *poetarum* (Sul da Europa e da Ásia) e *H. helix* subsp. *rhizomatifera* (Sul da Espanha), com mais de 100 cultivares. Sua produção é pequena com apenas 26 ton. Sua utilização é como planta ornamental e fitoterápico (com restrições devido a sua toxidez). Suas folhas possuem saponinas (entre 4 e 6%, Figura 12B), triterpenos, óleo essencial, ácido abscisico, flavonóides, ácidos fenólicos, clorofila, emetina e falcarinol (Elias *et al*, 1991; Bedir *et al*, 2000; Ackerfiled & Wen, 2002; Medeiros *et* al, 2002; Censkowsky *et al*, 2007; Pennisi *et al*, 2009).

As folhas de chá (*Camellia sinensis*, Família Theaceae) são consumidas há mais de 5000 anos na China. É a segunda bebida mais popular do mundo, sendo produzidos 4,5 milhões de toneladas por ano, e apenas 0,4% da produção no Brasil. O chá possui duas variedades: *assamica* e *sinensis*, e pode ter diferentes processamentos gerando produtos como chá verde, preto, *oolong*, vermelho, branco e amarelo. Em suas folhas se encontram flavonóides, metilxantinas, óleo essencial, aminoácidos, polissacarídeos, clorofila, saponinas (entre 0,25 e 0,3%, Figura 12C) e triterpenos (Sagesaka *et al*, 1994; Wang *et al*, 2000; Kobayashi *et al*, 2006; Lima *et al*, 2009; Sharangi, 2009; http://faostat.fao.org/, 2010).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, Família Aquifoliaceae) é originária da Região Sul do Brasil, que, em conjunto com Argentina, Uruguai e Paraguai produzem mais de 760 mil toneladas por ano. Aproximadamente 30% da população destes países consomem mais de 1 litro da bebida de erva-mate todo dia. Suas folhas possuem saponinas (entre 0,7 e 1%, Figura 12D), metilxantinas, ácidos fenólicos, flavonóides e clorofila (Gosmann *et al*, 1995; Gnoatto *et al*, 2005; Heck & De Mejia, 2007; Efing, 2008; Sugimoto *et al*, 2009; http://faostat.fao.org/, 2010).

O sisal (*Agave sisalana*, Família Asparagaceae) é a principal fibra dura produzida no mundo, correspondendo a 70% da produção comercial de fibras. No Brasil, o cultivo do sisal se concentra na região Nordeste, alcançando mais de 350 mil toneladas/ano através de pequenos produtores, com predomínio do trabalho familiar. Apesar da sua boa adaptação ao país, o sisal não é nativo, e sim originário do México, tendo sido introduzido no Brasil em 1903. Das suas folhas são extraídas as fibras longas, que só representam 3 a 5% do seu peso. Os 95 a 97% restantes constituem os chamados resíduos do beneficiamento ("suco do sisal"), que são aproveitados como adubo orgânico, ração animal, bioinseticida e intermediário de síntese de drogas esteroidais pela indústria farmacêutica.

Isso ocorre por que o suco do sisal, que tem saponinas esteroidais (0,21 – 1,25%, Figura 12E), sofre uma fermentação anaeróbica, iniciada 2 dias após a extração, gerando as sapogeninas, hecogeninas e tigogenina. Outros constituintes também estão presentes neste resíduo do sisal, como isoflavonóides, hemiceluloses e ramnogalacturonana (Ding *et al*, 1989, 1993; Stewart *et al*, 1997; Oashi, 1999; Pizarro *et al*, 1999; Zou *et al*, 2006; Chen *et al*, 2009; Martin *et al*, 2009; Narváez-Zapata & Sanchez-Teyer, 2009; Debnath *et al*, 2010).

Das 485 espécies do gênero *Passiflora*, de 150 a 200 são nativas do Brasil, que é o maior produtor mundial da fruta com 920 mil toneladas/ano. As espécies mais comercializadas no Brasil são a *P. edulis* (maracujá-azedo) e *P. alata* (maracujá-doce). Suas folhas apresentam saponinas (0,1-0,8%, Figura 12F), fitoesterol, flavonóides, alcalóides indólicos e maltol (Soulimani *et al*, 1997; Reginatto *et al*, 2001, 2004; Müller *et al*, 2005; Castro, 2008; http://www.sidra.ibge.gov.br/, 2010).

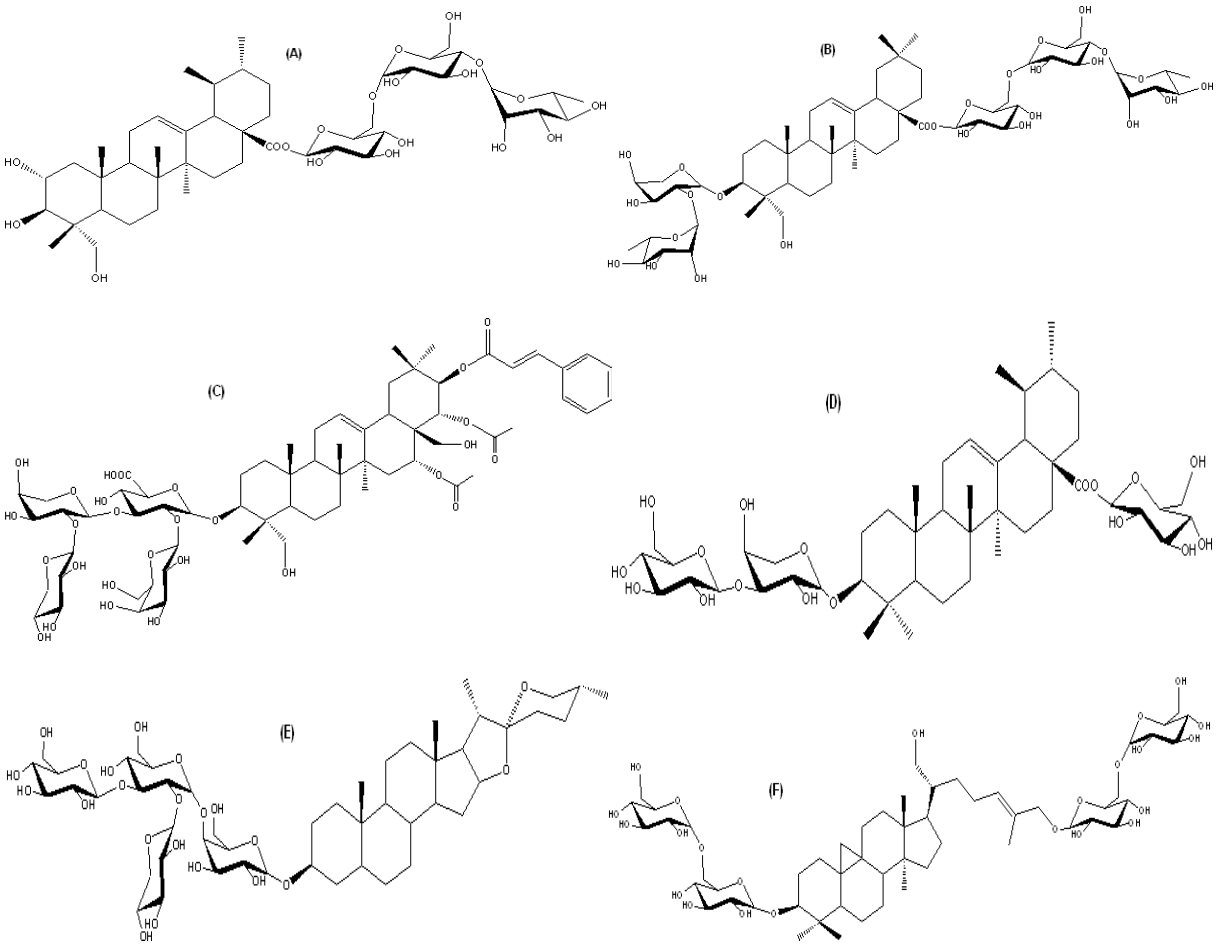


Figura 12 – Saponinas de folhas: (A) Asiaticosídeo; (B) Hederasaponina C; (C) Teasaponina B1; (D) Matesaponina 1; (E) Dongnosídeo E; (F) Quadrangulosídeo

2.3.4) Flores

Há muitos estudos sobre o óleo e as proteínas do girassol (*Helianthus annuus*, Família Asteraceae) provenientes de sua semente, mas suas flores também possuem constituintes químicos importantes como saponinas (heliantosídeos, cerca de 0,6%, Figura 13A), carotenóides e flavonóides. O girassol é originário do México, mas atualmente é plantado em vários países como Argentina, Rússia, Ucrânia, China e França, tendo uma produção mundial de 30,4 milhões toneladas de sementes do girassol granífero. No Brasil, a produção está em torno de 87 mil toneladas/ano. A Embrapa tem estimulado o cultivo do girassol ornamental criando novas variedades de cores diversas e menor porte para uso como flores de corte (Kishimoto *et al*, 2007; Ukiya *et al*, 2007; Sabbagh, 2008; http://faostat.fao.org/, 2010).

As flores da calêndula (*Calendula officinalis*, Família Asteraceae) também possuem saponinas (calendasaponinas, entre 0,3 a 2%, Figura 13B). A calêndula é originária da Região Mediterrânea, mas no Brasil já existem cultivos nas unidades experimentais da Embrapa. Em suas flores também apresentam carotenóides, flavonóides, óleo essencial, triterpenos, ácidos graxos e fenólicos. Seu uso principal é como cosmético e fitoterápico (Vidal-Ollivier *et* al, 1989; Yoshikawa *et al*, 2001; Szakiel *et al*, 2003; Volpato, 2005; Muley *et al*, 2009).

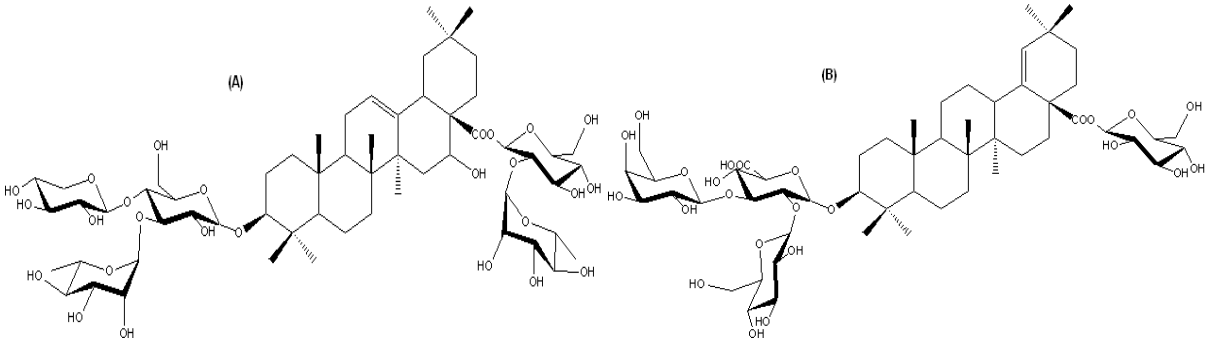


Figura 13 – Saponinas de flores: (A) Heliantosídeo 5, (B) Calendasaponina A

2.3.5) Frutos

A planta *Tribulus terrestris*, espécie pertencente à família Zygophyllaceae, é nativa da Região Mediterrânea, mas é muito cultivada em países como Bulgária, Romênia, Austrália, China e Índia. No Brasil, não há produção desta planta relatada na literatura. Seus frutos apresentam uma gama de saponinas esteroidais (entre 0,17 e 6,5%, Figura 14A) variando sua distribuição com a região geográfica. Além de saponinas, os frutos possuem flavonóides, alcalóides, lignanamidas e amidas de ácido cinâmico. Seu uso principal é como fitoterápico (Wang *et al*, 1997; Kostova & Dinchev, 2005; Su *et al*, 2009).

As pimentas e os pimentões pertencem à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum*. Este gênero possui de 20 a 25 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação. O Brasil destaca-se por possuir ampla diversidade em todas as categorias e contempla 4 espécies domesticadas: *C. annuum* var. *annuum* (Pimentão, Jalapeño e Pimenta doce), *C. baccatum* var. *pendulum* (Pimenta dedo-de-moça e cambuci), *C. chinense* (Pimenta de cheiro) e *C. frutescens* (Pimenta malagueta); e 3 semi-domesticadas: *C. annuum* var. *glabriusculum* (Pimenta de mesa), *C. baccatum* var. *praetermissum* (Pimenta cumari) e *C. baccatum* var. *baccatum* (Cumari verdadeira). A produção mundial é de 27,5 milhões toneladas, e no Brasil apenas 18 mil toneladas. Seus frutos apresentam saponinas (em torno de 1%, Figura 14B), ácidos graxos, óleoresina, capsaicinóides, carotenóides. Seu uso mais comum é como alimento, mas também tem sido utilizado como armas não letais com gás de oleoresina de pimenta (Iorizzi *et al*, 2002; De, 2003; De Lucca *et al*, 2001, 2006; http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/, 2010; http://faostat.fao.org/, 2010).

A berinjela (*Solanum melongena*, Família Solanaceae) é nativa da Índia, mas é produzida no Brasil, principalmente em Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, em um total de 78 mil toneladas anuais, ainda muito distante dos 42 milhões da produção mundial, onde a China é responsável por 58% da produção. Seus frutos apresentam antocianinas, glicoalcalóides esteroidais, saponinas esteroidais (melongosídeos, cerca de 0,35%, também encontrado nas sementes, Figura 14C), esteróides, proteínas, polissacarídeos, e são utilizados como alimentos (Kintia & Shvets, 1985a, b; Paczowski *et al*, 1998; Azuma *et al*, 2008; Tiwari *et al*, 2009; http://faostat.fao.org/, 2010).

A bucha é bastante conhecida no Brasil devido ao seu uso como esponja vegetal, tendo uma produção de 1.280 toneladas anuais, mas em seus frutos podem ser encontrados outros constituintes além das fibras como saponinas (luciosídeos, entre 1 e 4,5%, Figura 14D), flavonóides, triterpenos e xilanas. O gênero *Luffa* da Família Cucurbitaceae teve origem na Índia, mas pode ser encontrada pelo mundo todo. O gênero possui 7 espécies: *L. echinata*, *L. acutangula* (cabacinha), *L. aegyptiaca* (bucha, que substitui a *L. cylindrica*, e é a mais cultivada), *L. graveolens*, *L. operculata* (buchinha-do-norte), *L. quinquefida* e *L. astorii* (Yoshikawa *et al*, 2001; Bisognin, 2002; Kawahara *et al*, 2004; Du *et al*, 2006; Du & Gao, 2006; Du & Cui, 2007; Khajuria *et al*, 2007; http://www.sidra.ibge.gov.br/, 2010).

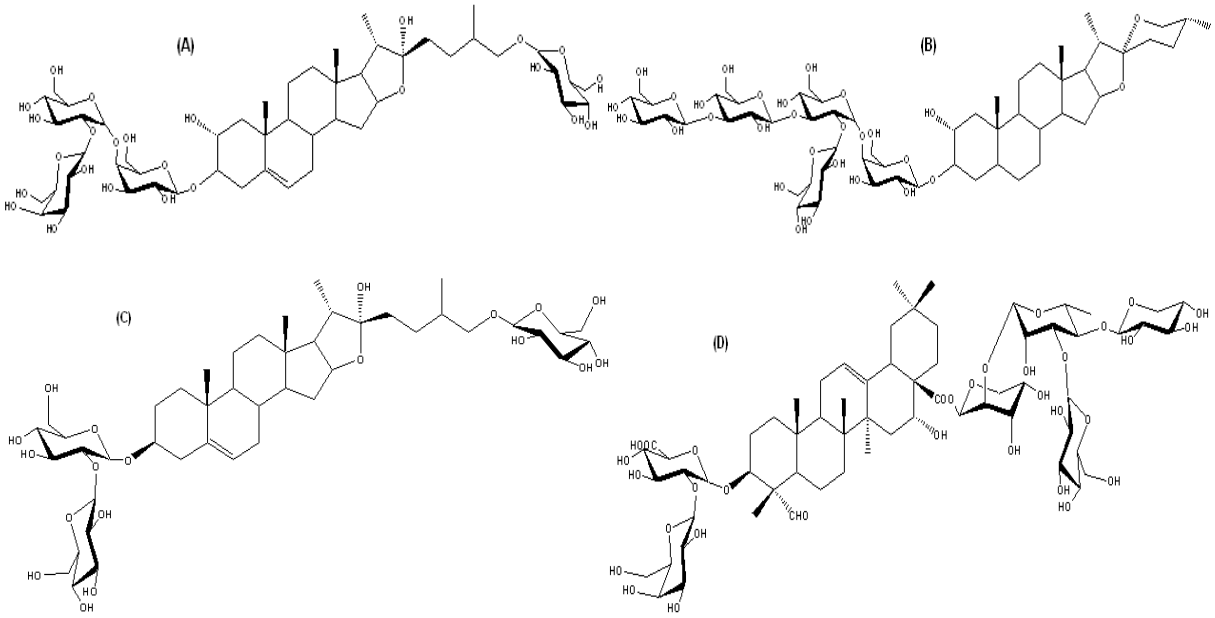


Figura 14 – Saponinas de frutos: (A) Terrestrosina J, (B) CAY-1, (C) Melongosídeo O, (D) Luciosídeo N

2.3.6) Sementes

O gênero *Aesculus* (Família Sapindaceae) tem 13 espécies distribuídas pelo hemisfério norte, sendo *A. hippocastanum* (castanha-da-índia) e *A. chinensis* as mais comuns da Eurásia e *A. pavia* nativa da América do Norte. Sua produção mundial é bem pequena (160 ton) e seu uso principal é como fitoterápico. Suas sementes possuem saponinas (escinas, 1,7%, Figura 15A), flavonóides, taninos, cumarinas, triterpenos, polissacarídeos, proteína, óleo e purinas (Yoshikawa *et al*,1996b; Wilkinson & Brown, 1999; Martins & Brandão, 2006; Zhang *et al*, 2006b; Censkowsky *et al*, 2007).

Há também pseudocereais que contem em seus grãos saponinas, como o amaranto e a quinoa, ambos pertencentes a Família Amaranthaceae, sendo originários da América Central (amaranto) e dos Andes (quinoa) e boas opções de alimentos para celíacos devido a ausência de gluten. Sua produção anual é estimada em 70 mil toneladas de quinoa e de 1400 toneladas de amaranto. No Brasil, a Embrapa já vem desenvolvendo cultivares para sua produção comercial como o *Amaranthus cruentus* BRS Alegria e o *Chenopodium quinoa* BRS Piabiru. Além das saponinas (amaranto, com teores entre 0,09 e 0,18%, Figura 15B; e quinoa, com teores entre 0,02 e 0,04%, Figura 15C), os grãos possuem proteínas, amido, óleo, tocoferóis, esqualeno e flavonóides (Gorinstein *et al*, 1991; Oleszek *et al*, 1999; Woldemichael & Wink, 2001; Spehar & Santos, 2002; Spehar *et al*, 2003; Martirosyan *et al*, 2007; Kuljanabhagavad *et al*, 2008; Stuardo & San Martín, 2008; http://faostat.fao.org/, 2010; http://www.agmrc.org/, 2010; Alvarez-Jubete *et al*, 2010).

Dentre os cereais, o gênero *Avena* (Família Poaceae) é uma exceção por sintetizar saponinas, chamadas de avenacinas, com estruturas triterpênicas, presentes nas raízes e avenacosídeos (Figura 15 D), com estruturas esteroidais, presentes nas folhas e sementes. As saponinas da aveia são encontradas em teores que variam entre 0,17 e 0,3%. Suas sementes também apresentam beta-glucanas, proteínas, lipídeos, amido, tocotrienóis e flavonóides. Sua produção mundial é de 19,6 milhões toneladas por ano, sendo o Brasil responsável apenas por 2% do total (Önning *et al*, 1994; Osbourn, 2003; Wenzig *et al*, 2005; Sayar *et al*, 2006).

Alguns trabalhos sobre guaraná (*Paullinia cupana*) citam a presença de pequenas quantidades (0,06%) de saponinas em suas sementes, mas apenas Henman (1982) relata que sua estrutura é similar às saponinas (Figura 15E) encontradas nos timbós (*Serjania* sp), sendo ambos da Família Sapindaceae, Subfamília Sapindoideae e Tribo Paullinieae. O guaraná é originário da Amazônia, possuindo duas subespécies: *P. cupana* var. *typica* (Venezuela e Colômbia) e a *P. cupana* var. *sorbilis* (oriunda do Brasil). A variedade brasileira apresenta uma produção anual de 3,7 mil toneladas. Suas sementes possuem também taninos, cafeína, xantinas, proteínas, óleo e polissacarídeos (Teixeira *et al*, 1984; Ekabo *et al*, 1996; Araújo *et al*, 2006).

Várias sementes de leguminosas, além de proteínas, oligossacarídeos e lipídeos, apresentam as mesmas saponinas (soyasaponinas, Figura 15F) como é o caso da soja (*Glycine max*, entre 0,3 e 2%), feijão preto (*Phaseolus vulgaris*, 0,15-0,2%), feijão azuki (*Vigna angularis*, 0,22%), grão-de-bico (*Cicer arietinum*, 0,23%), lentilha (*Lens culinaris*, 0,07-0,11%), ervilha (*Pisum sativum*, entre 0,18 e 4,2%) e amendoim (*Arachis hypogaea*, 0,1%). Estas sementes pertencem a mesma Família Fabaceae e Subfamília Faboideae, e apresentam algumas variedades, possuindo, além de saponinas, isoflavonóides, fitatos, flavonóides, taninos e ácidos fenólicos. O feijão preto e o azuki também apresentam saponinas características (Figura 15G e H), mas em quantidades menores. Estas leguminosas são originárias de vários lugares no mundo como China (soja e feijão azuki), Ásia menor (lentilha, grão-de-bico e ervilha), América do Sul e Central (feijão preto e amendoim). O Brasil é um dos maiores produtores de soja, colhendo 68,7 milhões toneladas de soja, 3,1 milhões toneladas de feijão, 261 mil toneladas de amendoim, 5,9 mil toneladas de ervilha e 11 toneladas de lentilha por ano (Kitagawa *et al*, 1983; Ruiz *et al*, 1996; Kinjo *et al*, 1998; Stevenson & Veitch, 1998; Muzquiz *et al*, 1999; Beninger & Hosfield, 2003; Shi *et al*, 2004; Chukwumah *et al*, 2007; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007; Lee *et al*, 2008; Onyilagha *et al*, 2009; Xu & Chang, 2009; http://www.sidra.ibge.gov.br/, 2010).

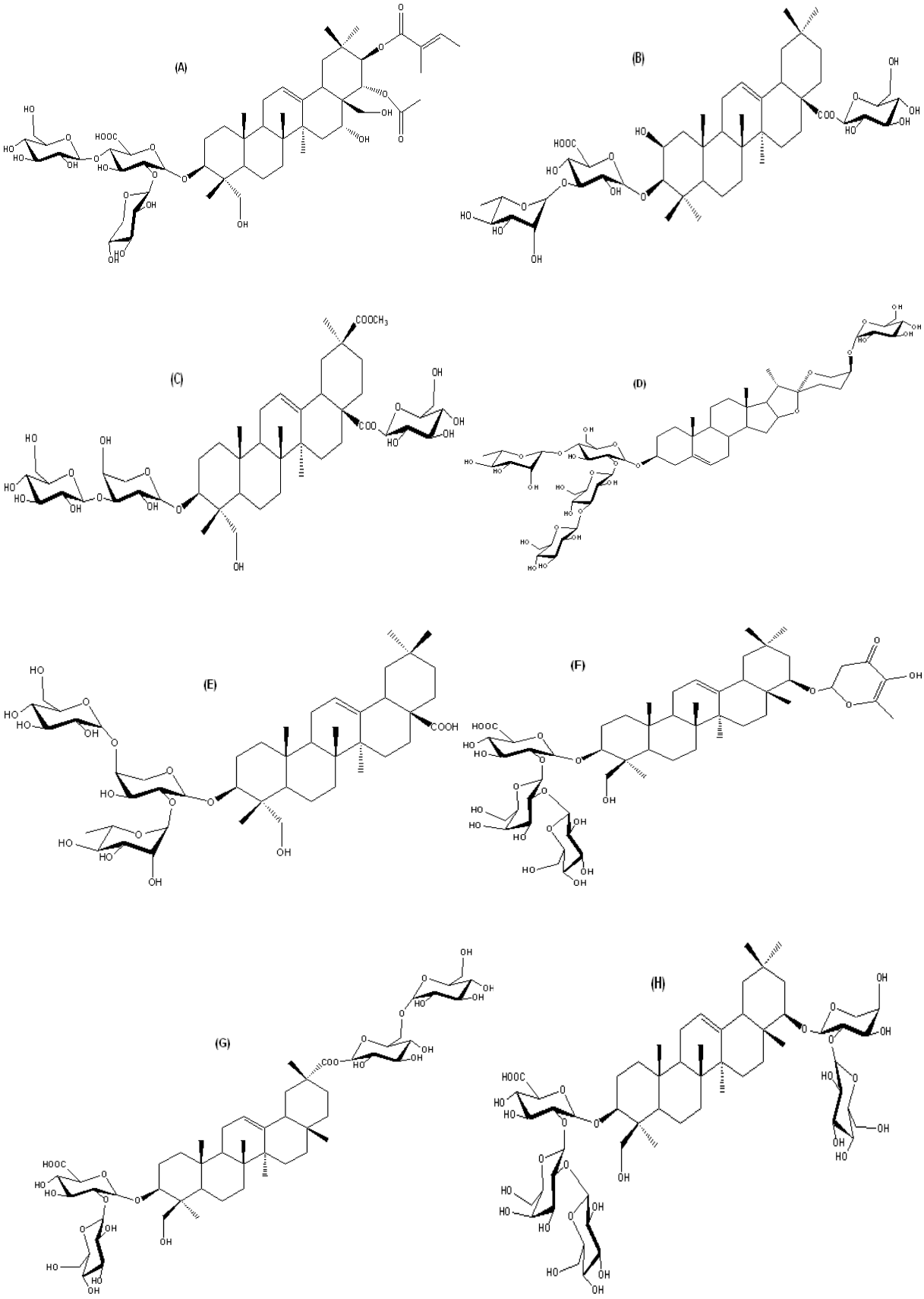


Figura 15 – Saponinas de sementes: (A) Escina II; (B) Amaranthus-saponina I; (C) Saponina triterpênica de quinoa; (D) Avenacosídeo B; (E) Pulsatilla saponina D (Guaraná); (F) Soyasaponina *α*g (encontrada em soja, grão-de-bico, ervilha, amendoim e lentilha); (G) Azukisaponina VI; (H) Phaseolosídeo I.

2.4) MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A primeira etapa no processamento de saponinas é o pré-tratamento da matéria-prima vegetal, incluído a secagem, a cominuição, e o desengorduramento, para que assim se aumente a eficiência da etapa de extração. Como em qualquer processo extrativo, o solvente extrator, as condições de extração (como temperatura, tempo, pH, relação matéria-prima/solvente, agitação), e as propriedades da matéria-prima (como composição e tamanho de partícula) são os principais fatores que determinam a eficiência do processo e as propriedades do produto final (Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007).

O método de extração de saponinas mais utilizado é o que utiliza solventes como água, metanol, etanol ou mistura hidroalcoólica em extrator Soxhlet ou por extração orbital simples. Outros solventes já foram utilizados como glicerol (Gafner *et al*, 2004) e soluções aquosas e alcoólicas de surfactantes (extração micelar), como a utilização de Triton X-100 (etoxilato de octilfenol) para extração de ginsenosídeos (Fang *et al*, 2000). Além do Soxhlet, outros métodos que utilizam uma menor quantidade de solvente, menor tempo de extração e que aumentem a eficiência do processo estão sendo estudados, tais como extração multi-estágios em contracorrente (Wang *et al*, 2004; Wanezaki *et al*, 2005); extração líquida pressurizada (ELP); extração de alta pressão (Zhang *et al*, 2007); extração assistida por ultrassom, por microondas (EAM), e com dióxido de carbono supercrítico aditivado de co-solvente (Ong, 2004; Wang & Weller, 2006).

Estes métodos de extração são muito promissores, mas ainda são conduzidos em escala laboratorial ou piloto, devido aos altos custos operacionais e aos sistemas termodinâmicos complexos, necessitando de dados adicionais de solubilidade, seletividade e difusividade para possibilitar um aumento de escala (Wang & Weller, 2006).

2.4.1) Extração Micelar

A extração micelar se assemelha muito a extração com solventes, apenas com a diferença de que a fase hidrofóbica é gerada dentro da fase aquosa, devido a formação de núcleos apolares nas micelas formadas pelo surfactante, permitindo a solubilização de vários metabólitos como proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios, íons metálicos e saponinas. Normalmente são utilizados surfactantes não-iônicos, como Triton X-100 e X-114 (ambos etoxilato de octifenol, mas com unidades com óxidos de etileno diferentes em suas cadeias: 9,5 e 7,5, respectivamente) e Genapol X-080 (polietilenoglicol dodecil éter) (Quina & Hinze, 1999; Paleologos *et al*, 2005). A grande maioria dos trabalhos utiliza a extração micelar associadas a energias não-térmicas e aos solventes pressurizados, sendo estes discutidos nos próximos subitens.

2.4.2) Extração assistida por Energias Não-Térmicas

Extrações assistidas por ultrassom (freqüências acima de 20kHz) envolvem efeitos mecânicos de cavitação acústica, onde há ciclos de expansão e compressão que formam e colapsam bolhas rapidamente, induzindo maior penetração de solvente no material e assim aumentando a transferência de massa. Geralmente utilizam-se banhos de ultrassom ou transdutores para promover a extração (Vilkhu *et al*, 2008). Já as extrações por micro-ondas (freqüências de 0,3 a 300 GHz) envolvem o aquecimento da matéria-prima através das interações com moléculas polares (água, metanol e etanol) pelas micro-ondas. Seus efeitos são extremamente dependentes das constantes dielétricas do solvente e da matriz vegetal, e por isso materiais hidratados facilitam a extração de ativos (Lidström *et al*, 2001). Ambas as extrações assistidas por energias não-térmicas já foram utilizadas para extração de vários metabólitos como óleos essenciais, carotenóides, compostos fenólicos, proteínas, polissacarídeos, ácidos orgânicos, alcalóides e saponinas, sendo normalmente mais rápidas que os processos convencionais (Vilkhu *et al*, 2008; Soria & Villamiel, 2010; Chemat *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2011).

Wu e colaboradores (2001) estudaram a extração de ginsenosídeos comparando o método por Soxhlet e o auxiliado por ultrassom, tanto diretamente (uso de transdutor imerso na solução, com 20 kHz, 25-27ºC) quanto indiretamente (uso de banho de ultrassom com 38,5 kHz, 38-39ºC) utilizando 200 mg de ginseng em 15 mL de solvente (metanol, água saturada com n-butanol e água com 10% de metanol) com agitação de 100 rpm. A extração com ultrassom, independente do solvente utilizado, foi 4 vezes mais rápida do que a extração com Soxhlet, que demorou 8 h, sem diferenças significativas em relação ao uso direto e indireto do ultrassom. Já Zhao e colaboradores (2007) reportaram a comparação entre uma extração orbital simples e auxiliado por um transdutor de ultrassom de 20kHz de 3 g de raízes em pó de *Bupleurum chinense* utilizando 75 mL de solução aquosa de 50% etanol, agitada a 420 rpm. Neste caso, o ultrassom acelerou em 6 vezes a extração, necessitando apenas de 30 min. A variação da temperatura de extração de 40 para 80ºC gerou um aumento de 20% na extração de saponinas, e o uso de tamanho de partículas menores (0,3-0,45 mm) acrescentou mais 33% ao rendimento. Cares *et al* (2010) e Gaete-Garretón e colaboradores (2011) indicaram que, também ao usar um transdutor similar, a extração de saponinas de quilaia, a 20 ºC por 20 min, numa proporção de cascas com granulometria de 0,2 mm e água de 1/15 alcançaram 62% de rendimento.

A maior parte dos trabalhos sobre extração assistida por micro-ondas de saponinas se refere às presentes no ginseng e no alcaçuz. Pan e colaboradores (2000) indicaram que a extração de ácido glicirrizico de alcaçuz com 60% de etanol e 2% de amônia auxiliada por micro-ondas (85-90ºC) obteve o mesmo resultado que a extração orbital simples (25ºC), só que com 4 min de

extração invés das 20 h. Extrações híbridas também já foram realizadas utilizando Triton X-100 para facilitar a solubilização do ácido glicirrizico auxiliado pelas micro-ondas, como Sun *et al* (2007a), que utilizaram uma solução aquosa 5% do surfactante a 100ºC por 3 min para extração, e adicionaram 20% NaCl para pré-concentração por ponto de névoa alcançando uma recuperação de 98%. Estes mesmos autores em 2008, verificaram que essa extração micelar conseguia os mesmos resultados da extração auxiliada por microondas com metanol e etanol 50%.

Kim e colaboradores (2003a) reportaram que a extração assistida por micro-ondas (EAM) (2450 MHz, 72,2ºC, potência máxima) de ginsenosídeos foi 360 vezes mais rápida que a extração orbital simples (75ºC, 3 h), mantendo o mesmo solvente (metanol 80%) e relação matéria-prima/solvente (1/10). Em outro trabalho dos mesmos autores (2003b), há conclusões similares utilizando como solvente etanol 60%, complementado pelo planejamento experimental (2003c), mantendo uma potência de irradiação de 105W, e obtendo como condições ótimas de extração de 295 s e uma concentração de etanol 77,3%. Enquanto isso, Shu e colaboradores (2003) investigaram a influência de várias concentrações de etanol e água, além das potências de irradiação e o tempo, obtendo 0,28% ginsenosídeo Rg1 com 30% etanol e 1,31% de ginsenosídeo Rb1 com 70% de etanol em 15 min de extração, com 150 W de potência. Vongsangnak *et al* (2004) mostraram que a extração assitida por micro-ondas de ginsenosídeos também pode ser efetuada em células vegetais, tendo como condições ótimas: 50ºC, 125 W, 4 min e uma razão sólido/líquido de 1/150. Qu e colaboradores (2009) relataram que o uso de pressão na EAM (450 kPa, 125 ºC, 10 min, 70% etanol) aumenta em 20% o rendimento em saponinas.

Já Kerem e colaboradores (2005) verificaram que a EAM (2450 MHz, 60ºC, 20 min) de soyasaponinas de grão-de-bico foi 18 vezes mais rápida em comparação com a obtida por Soxhlet, utilizando tanto metanol como etanol 70%. Hu e colaboradores (2008) relataram através de um planejamento experimental as condições ótimas de extração de saikosaponinas de *Bupleurum chinense*: entre 360-400 W de potência de irradiação, 73-74ºC, 5,8-6,0 min e concentração de etanol entre 47-50%, sendo a extração nestas condições cerca de 80 vezes mais rápida do que a extração orbital simples. Mandal *et al* (2009) fizeram a extração das saponinas de *Gymnema sylvestre* em 6 min com 85% metanol, 280 W de potência, recuperando 2 vezes mais saponinas, 240 vezes mais rápido do que a extração orbital simples. Li *et al* (2010b) realizaram a extração de saponinas triterpênicas de *Xanthoceras sorbifolia* em 3 ciclos de 7 min, a 51 ºC, usando 42% etanol com 900 W de potência de irradiação, alcançando 11,4% de rendimento.

2.4.3) Extração por Solventes Pressurizados

A extração com fluido supercrítico é muito utilizada para extrair moléculas apolares, como insaponificáveis e óleos essenciais. Neste processo, o CO_2 em condições supercríticas entra em contato com a matéria-prima no extrator pressurizado, sendo depois transportado para um separador, onde a diminuição da pressão ou o aumento da temperatura levam o CO_2 à condição de gás diminuindo o poder de solvatação do fluido e possibilitando a fácil recuperação do produto. Para a extração de moléculas polares, são adicionados co-solventes (metanol, etanol, acetonitrila, água, acetona, éter etílico e diclorometano) ao fluido supercrítico, o que pode alterar as condições supercríticas mais brandas do CO_2, além de diminuir a seletividade (Wang & Weller, 2006; Reverchon & De Marco, 2006).

Como exemplo, Wang e colaboradores (2001) relataram a extração de ginsenosídeos por CO_2 supercrítico adicionado de 6%mol de etanol 95%, mas, em 4 h de operação a 31,2 MPa e 333 K, obtiveram um rendimento 33% e 45% inferior ao conseguido com o ultrassom (150 min) e o do Soxhlet (12 h), respectivamente. Wood e colaboradores (2006) também estudaram a extração de ginsenosídeos de *Panax quinquefolius* utilizando metanol (27% mol) e DMSO (11% mol) como modificadores do CO_2 supercrítico a 110ºC e 34,5 MPa por 1,5 h, alcançando 92 e 67% da recuperação de saponinas obtido na extração por Soxhlet com metanol durante 20 h. Kim e colaboradores (2004) conseguiram a recuperação praticamente total da glicirrizina utilizando CO_2 supercrítico com 15%vol. de metanol 70% em 1 h de operação a 30 MPa e 60ºC.

A extração líquida pressurizada - ELP (ou extração acelerada por solvente) é similar ao processo supercrítico utilizando condições de temperatura e pressão elevados (50-250ºC e 10-40 MPa, respectivamente) com o objetivo de manter o solvente em estado líquido, mesmo a temperaturas maiores que o ponto de ebulição, mantendo-o abaixo do ponto crítico, aumentando a difusividade, mas possibilitando a degradação das substâncias extraídas, como flavonóides, lignanas, lipídios e terpenos. O principal solvente utilizado é a água (Wang & Weller, 2006; Teo *et al*, 2010; Carr *et al*, 2011; Mustafa & Turner, 2011).

Kim e colaboradores (2010) conseguiram extrair as saponinas de *Liriope platyphylla* através da ELP com 86% de etanol, a 130ºC durante 20 min. Benthin e colaboradores (1999) compararam a extração líquida pressurizada (140 bar, 100ºC) das sementes de castanha da índia em duas etapas (10 min com diclorometano, e a seguir 12 min com metanol 65%) com as condições operacionais relatadas pela Farmacopéia Européia (extração por Soxhlet, com diclorometano por 3 h, a seguir 3,5 h de maceração com metanol 65%, e mais 30 min sob refluxo), sendo que a ELP forneceu 42% a mais de saponinas. Mukhopahyay & Panja (2008)

realizaram a extração do ácido glicirrizico por ELP, e ao mesmo tempo, conseguiram o transformar na sua forma adoçante, o glicirrizato de amônia, utilizando como solvente uma solução aquosa de amônia (0,01% p/v) a 110ºC, 5 atm, por 90 min, obtendo 14% em saponinas. Wan e colaboradores (2006) utilizaram como condições na extração de ginsenosídeos por ELP: metanol, 150ºC, 689,5 kPa e 15 min, enquanto Chang & Chang (2007) estudaram a extração de isoflavonas e soyasaponinas por ELP utilizando 80% etanol, 110ºC, 551 kPa com um vazão de 25 mL/min, alcançando uma recuperação de 76% das saponinas.

Por outro lado, Ong e Len (2003) relataram resultados similares na utilização de ELP (água, 100ºC, 10-30 bar, 40 min) para glicirrizina em relação à extração por ultrassom (metanol 70%, 10 min), enquanto Kim e colaboradores (2009) obtiveram um resultado 53% inferior na extração de asiaticosídeos utilizando ELP (250ºC, 20 MPa, 5h) comparando a extração sob refluxo com etanol. Güçlü-Üstündag e colaboradores (2007) reportaram o estudo da ELP (10,34 MPa, 150ºC, 22 min) de saponinas de *Vaccaria segetalis* comparando com extração em banho de ultrassom, onde ambos apresentaram resultados similares com diferenças no tempo de extração (ELP foi 3 vezes mais rápida) e na escolha de solvente (o melhor solvente para ELP foi 80% etanol e para o ultrassom foi 50% etanol). Foi detectado também que, a temperaturas acima de 150ºC, ocorria a degradação das saponinas. A utilização de Triton X-100 associado à ELP (Choi *et al*, 2003) demonstrou um aumento de 10% na extração de saponinas quando comparado ao processo utilizando apenas água, mas inferior quando comparado ao uso de metanol na ELP. Engelberth e colaboradores (2010) compararam a ELP com extração assistida por ultrassom utilizando os mesmos solventes água, butanol saturado em água e água saturada em butanol, onde o ELP (110ºC, 440 kPa) obteve uma recuperação de ginsenosídeos, tendo resultados similares com água e água saturada em butanol.

2.4.4) Extração por Líquidos Iônicos

Líquidos iônicos (LI) são solventes compostos apenas por íons, cátions orgânicos, como 1-alquil-3-metilimidazolinio ($C_n$mim), pirrolidinio, piridinio e tetralquilfosfônio, e ânions orgânicos, como alquilsulfatos, alquilcarboxilatos, bis(trifluorometilsulfonil)imida (NTf_2) e dicianamida (dca), ou inorgânicos, como cloreto, brometo, hexafluorofosfato (PF_6) e tetrafluoroborato (BF_4), que apresentam ponto de fusão abaixo de 100ºC. Normalmente os LI apresentam outras propriedades comuns como pressão de vapor desprezível, alta estabilidade térmica (decompõe acima de 350ºC), e a dissolução de vários compostos, como os metabólitos presentes em organismos (Tabela 3), indicando a possibilidade do seu uso como substituto dos atuais solventes orgânicos (Wasserscheid & Welton, 2008; Weingärtner, 2008; Olivier-Bourbigou *et al*, 2010).

Tabela 3 – Exemplos de metabólitos extraídos por líquidos iônicos

Metabólito (% Extração)	Matéria-prima	Líquido Iônico	Método de Extração Associado	Referências
Lignina (34%)	*Miscanthus giganteus*	[C2mim][Ac]	60 min, 140 ºC, LI/S: 25, 100% LI	Shill *et al*, 2011
Tanshishonas (50%)	*Salvia miltiorrhiza*	[C16mim][Br]	30 min, 20ºC, LI/S: 80, 1,94% LI, 120 W ultrassom	Wu *et al*, 2009
Tanshishonas (100%)	*Salvia miltiorrhiza*	[C8mim][Cl]	80 min, 20ºC, LI/S: 40, 11,5% LI, 105 W ultrassom	Bi *et al*, 2011
Alcalóides (100%)	*Stephaniae tetrandrae*	[C4mim][BF_4]	40 min, pH9,8, LI/S: 20, 33,9% LI, 150 W ultrassom	Zhang *et al*, 2009
Shikonina (70%)	*Arnebia euchroma*	[C6mim][BF_4]	5 min, 20ºC, LI/S: 3, 100% LI, 100 W ultrassom	Xiao *et al*¸ 2011
Astaxantina (98%)	Resíduo de camarão	[C3NH_2mim][Br]	60 min, 20ºC, LI/S: 10, 11,1%(EtOH) LI, 75 W ultrassom	Bi *et al*, 2010
Lipidios (100%)	*Chlorella vulgaris*	[C4mim][CF_3SO_3]	18 h, 65ºC, LI/S: 10, 50% v/v (MeOH) LI	Kim *et al*¸ 2011
Ácido shiquimico (100%)	*Ginkgo biloba*	[C4mim][Cl]	60 min, 150ºC, LI/S: 3, 100% LI	Usuki *et al*, 2011
Piperina (100%)	*Piper nigrum*	[C4mim][BF_4]	30 min, 20ºC, LI/S: 15, 45,2% LI, 500 W ultrassom	Cao *et al*, 2009
Isoflavonas (100%)	*Iris tectorum*	[C8mim][Br]	30 min, 25 ºC, LI/S: 30, 13,75% LI, 250 W ultrassom	Sun *et al*, 2011
Magnolol (100%)	*Magnoliae officinalis*	[C4mim][PF_6]	30 min, 25 ºC, LI/S: 20, 56,8% (Etanol) LI, 200 W ultrassom	Zhang & Wang, 2010
Glabridina (73%)	*Glycyrrhiza glabra*	[C6mim][NTf_2]	40 min, 30ºC, LI/S: 100, 100% LI	Li *et al*, 2012
Taninos (85%)	*Acacia catechu*	DIMCARB	16 h, 25ºC, LI/S: 5, 100% LI	Chowdhury *et al*, 2010
Luteolina (73%)	*Apium graveolens*	[C4mim][$MeSO_4$]	90 min, pH 1,0, 25ºC, LI/S: 10, 25% LI, 200 W ultrassom	Han & Row, 2011
Alcalóides fenólicos (100%)	*Nelumbo nucifera*	[C6mim][BF_4]	1,5 min, LI/S: 10, 25,4% LI, 280 W microondas	Lu *et al*, 2008
Alcalóides indólicos (95%)	*Catharanthus roseus*	[Amim][Br]	30 min, LI/S: 10, 9,5% LI, 250 W ultrassom	Yang *et al*, 2011a
Rutina (100%)	*Saururus chinensis/ Sophora japonica*	[C4mim][Br]	12 min, 70ºC, LI/S: 25, 54,8% LI/ 8 min, 60ºC, LI/S: 35, 32,9% LI, microondas	Zeng *et al*, 2010
Rutina e Quercetina (100%)	*Sophora japonica*	[C4mim][Cl]	5 min, 120ºC, LI/S: 15, 17,5% LI, 1500 psi (ELP)	Wu *et al*¸2012
Miricetina (100%)	*Myrica rubra*	[C4mim][HSO_4]	10 min, 70ºC, LI/S: 30, 47,2% LI, microondas	Du *et al*, 2011
Aesculina (100%)	*Fraxinus rhynchophylla*	[C4mim][Br]	30 min, 20ºC, LI/S: 10, 16,4% LI, 250 W ultrassom	Yang *et al*, 2011b
Paeonol (100%)	*Cynanchum paniculatum*	[C4mim][Cl]	8 min, LI/S: 52, 14%(EtOH) LI, 136 W microondas	Jin *et al*, 2011
Lignanas (100%)	*Schisandra chinensis*	[C4mim][BF_4]	6 min, LI/S: 100, 1,5% LI, 200 W microondas	Xiao & Zhang, 2012
Lignanas e óleo essencial (100%)	*Schisandra chinensis*	[C12mim][Br]	40 min, LI/S: 12, 8,3% LI, 385 W microondas	Ma *et al*, 2011
Patchouli alcool (100%)	*Pogostemon cablin*	[C4mim][Cl]	10 min, 70ºC, LI/S: 9, 100% LI, 136 W microondas	Fan *et al*, 2011
Hemicelulose (38%)	*Piecea abies*	DBU-BuOH-CO_2	5 dias, 55ºC, LI/S: 20, 100% LI,	Anugwom *et al*, 2012
Antraquinonas (100%)	*Rheum palmatum*	[C4mim][Br]	2 min, LI/S: 15, 43,8% LI, 500 W microondas	Lu *et al*, 2011
Celulose (62%)	Pinheiro (*Pinus* sp)	[Amim][Cl]	2 h, 120ºC, LI/S: 19, 84% (DMSO) LI, 500 W microondas	Wang *et al*, 2011

Recentemente, novos LI e análogos estão sendo sintetizados com intuito de serem mais funcionais e biodegradáveis, além de menos onerosos, surgindo então os líquidos iônicos biocompatíveis, com cátions colinio (Ch), efedrínio e oxazolinio, e ânions derivados de aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos (Fukaya *et al*, 2007; Imperato *et al*, 2007; Pernak

et al, 2007); os solventes eutéticos (*deep eutectic solvents*), que se formam a partir da mistura de duas substâncias, que apresenta um ponto de fusão menor que as substancias sozinhas, tendo como exemplo a mistura molar 1/2 cloreto de colina (ChCl) e uréia (Abbott *et al*, 2003), ou de ChCl e glicerol (Shahbaz *et al*, 2011); e os líquidos iônicos reversíveis (*switchable*), que se formam com o borbulhamento de CO_2 em um líquido (ou mistura) neutro, sendo reversível com aquecimento ou passagem de N_2 ou argônio no LI, um exemplo a formação do DIMCARB (*N,N*-dimetilamonio *N',N'*-dimetilcarbamato) pela passagem de CO_2 em dietilamina, ou então a mistura de um derivado de amidina, como o DBU (1,8-diazabicicloundec-7-eno) e um álcool, como butanol ou hexanol (Blasucci *et al*, 2010; Hart *et al*, 2010; Olivier-Bourbigou *et al*, 2010). Até agora, nenhum trabalho sobre extração de saponinas de matrizes vegetais por líquidos iônicos como solventes ou co-solventes foi publicado.

2.5) MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO

Uma terceira etapa é a concentração das saponinas através da partição destas entre extratos aquosos (com álcoois já removidos por evaporação) e n-butanol. Etapas adicionais podem ser realizadas, como a precipitação por solventes, a formação de complexos, a adsorção em resinas macroporosas (Jia & Lu, 2008) ou em sílicas baseadas em líquidos iônicos (Tian *et al*, 2009), a separação por membranas, a pré-concentração por ponto de névoa (Quina & Hinze, 1999), a separação bifásica aquosa e/ou o fracionamento por coluna de espuma. Posteriormente, pode-se realizar a purificação de cada saponina através de métodos cromatográficos, sendo que estes, na sua maioria, ainda estão limitados a escala analítica (Hostettmann & Marston, 2005; Güçlü-Üstündag & Mazza, 2007). Exceções são os estudo de Du & Gao (2006), Decroos *et al* (2007) e Qi *et al* (2010) que utilizaram cromatografia preparativa para a purificação destes compostos.

A precipitação de saponinas pode ocorrer tanto em soluções etanólicas pela adição de acetona ou éter etílico quanto em soluções aquosas pelo uso de acetato de chumbo ou hidróxido de bário (Oleszek, 2000; Dobbins, 2002). Já os complexos são formados na presença de colesterol (Micich *et al*, 1992; Hwang & Damodaran, 1994) e de beta-ciclodextrina (Lee *et al*, 2006; Brewster & Loftsson, 2007). Estratégias indiretas de concentração também já foram realizadas como a utilização de PVPP (polivinilpirrolidona, Sagesaka *et al*, 1994) e a lavagem da fração butanólica com uma solução 1% p/v de NaOH (Gosmann *et al*, 1995) para remoção de compostos fenólicos.

2.5.1) Separação por Membranas

Os processos de separação por membranas, como microfiltração, diafiltração, ultrafiltração e nanofiltração são baseados na permeabilidade seletiva da membrana em relação ao tamanho do metabólito, que pode variar de 1 nm até 10 μm, ou então com massas molares entre 0,1 a 100 kDa, tendo como força-motriz a pressão de 1 a 35 bar (Kumar, 2007; Li & Chase, 2010).

Muir e colaboradores (2002) elaboraram uma patente para concentração de saponinas de quinoa testando processos de ultra- e nanofiltração, alcançando os melhores resultados com membranas de 0,3 kDa, recuperando 99% das saponinas no retentado. Yapo e colaboradores (2007) utilizaram membranas com massa molar de corte de 10 kDa em soluções ricas em pectina de beterraba para separar as saponinas no permeado, possivelmente devido a baixa concentração destas, pois San Martín e Briones (1999) afirmam que maiores concentrações saponinas possibilitam a geração de micelas, que poderiam ser retidas por membranas de ultrafiltração de 10-30 kDa. Similarmente, alguns autores como Marciani *et al* (2000), Kamstrup *et al* (2000), San Martín *et* al (2008), e Stuardo & San Martín (2008) utilizam o sistema de ultrafiltração com membranas de 10 kDa para concentração das saponinas de quilaia e de quinoa. Apenas Kim e colaboradores (2003) realizaram uma etapa de ultrafiltração (100 kDa) e uma de diafiltração (20 kDa) na concentração de saponinas de quilaia e *Yucca shidigera* , sendo a primeira para remoção de proteínas e polissacarídeos, e a segunda etapa para remoção de polifenóis, sais e açúcares.

2.5.2) Separação por Sistemas Aquosos Bifásicos

A pré-concentração por ponto de névoa é a etapa posterior à extração micelar, onde o aumento de temperatura (no caso de surfactantes não-iônicos) favorece a separação das micelas da solução formando duas fases, uma rica em surfactante (fase supramolecular) e outra rica em sal (fase salina), podendo ser necessário a adição de sal para induzir a separação. Caso a fase micelar se torne muito viscosa, podem ser empregados agentes de diluição como água, metanol, etanol e acetonitrila para facilitar sua manipulação (Quina & Hinze, 1999; Ballesteros-Gómez *et al*, 2010). Fang e colaboradores (2000) observaram que com adição de 0,5% p/v de sulfato de sódio a eficiência de extração de ginsenosídeos alcançava a 100%, obtendo uma material 7 vezes mais concentrado, enquanto que o ponto de névoa induzido apenas por temperatura só conseguia uma eficiência próxima dos 80% e uma concentração apenas 2 vezes maior do que o material inicial. Já Sun e colaboradores (2007b) utilizaram cloreto de sódio (20% p/v) para auxiliar no ponto de névoa, concentrando 13,2 vezes e recuperando 98% do ácido glicirrízico. Enquanto Choi e colaboradores (2003) adicionaram sulfato de amônio (40% p/v) ao extrato de ginseng e obtiveram um fator de concentração de 35 vezes.

A separação em sistema bifásico aquoso ocorre similarmente à extração líquido-líquido. O sistema é geralmente composto por polímeros e sal, ou dois polímeros incompatíveis (polietilenoglicol e dextrana), sendo que a partição das moléculas vai depender das suas propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade e carga, e da composição do sistema, como o tipo e a concentração do polímero e/ou do sal (Hatti-Kaul, 2000). Han e colaboradores (2008) reportaram o uso de sistema bifásico aquoso (adição de 1,12 g de PEG 4000, 1,2 g de K_2HPO_4 em 0,2 mL de etanol a 12 mL de extrato aquoso de *Momordica charantia*) onde depois de homogeneizada e centrifugada, a fase salina foi lavada com etanol 95% por três vezes. As fases alcoólicas foram reunidas e mantidas em repouso a 4ºC para precipitação de sal residual, sendo centrifugada e evaporada para isolamento das saponinas. Infelizmente, neste trabalho não há relato sobre fator de concentração nem da recuperação das saponinas.

Outras possibilidades de sistemas baseados em partição são: (i) o sistema líquido trifásico, em que se utiliza uma fase orgânica, um polímero, sal inorgânico e água, como Shen *et al* (2007), que separou ácido glicirrízico testando sistemas usando 2-etil hexanol, tributilfosfato e óxidos de trialquilfosfinas como fase orgânica, polietileno glicol e sulfato de amônio, (ii) ou então como Liu *et al* (2010b) que separou saponinas esteroidais utilizando éter de petróleo como fase orgânica, etanol 30% e sulfato de amônio; e (iii) o sistema bifásico sem adição de PEG, apenas alcoóis e sais, como descrito por Tianwei *et al* (2002), que utiliza sistemas com 60% etanol ou 2-propanol e 15% sulfato de amônio ou fosfato monobásico de potássio alcançando a recuperação de 92% de glicirrizina na fase superior etanólica.

2.5.3) Fracionamento por Coluna de Espuma

A espuma consiste em um grande número de pequenas bolhas dispersas em uma fase líquida contínua, separadas por uma fina película. Sua estabilidade depende principalmente da resistência a perda (drenagem) do solvente do filme líquido que envolve o gás (Costa, 1999). Assim, o uso de coluna de espuma (Figura 16) tem como premissa a concentração de soluções por adsorção preferencial em uma interface gás-líquido criada por aspersão de ar ou gás inerte pela solução, formando uma espuma estável rica no surfactante (Grieves, 1975; Singh & Rizvi, 1995).

Costa (1999) conseguiu concentrar em até 10 vezes as saponinas de quilaia, utilizando uma coluna de 175 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro interno com uma vazão de ar comprimido de 22,60 mL/min, passando por uma solução com concentração de 80 mg/L de saponinas a pH 3 durante 3,5h. Yan e colaboradores (2011) realizaram a separação das saponinas do chá por este método só que em 2 etapas: a primeira com vazão de ar de 150 mL/min e 65ºC obtendo uma

maior concentração (3,47), e na outra etapa, eles aumentaram a vazão para 200 mL/min e 30ºC, uma maior recuperação das saponinas (65,2%). Thompson (2004) e Backleh-Sohrt *et al* (2005) demonstraram que o uso da coluna de espuma com auxílio de saponinas também pode ser interessante para concentração de outras moléculas, como catequinas, ésteres de faradiol, carotenóides, cafeína, alcalóides indólicos e canabinóides.

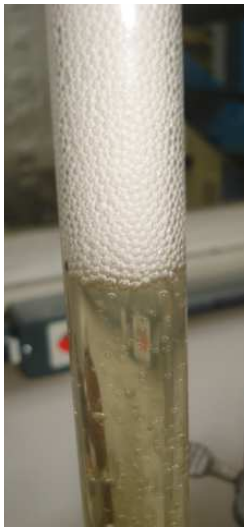


Figura 16 – Interface entre solução com bolhas e espuma em uma coluna de espuma

Utilizando esta propriedade espumógena das saponinas, uma nova abordagem tem sido utilizada, a microespuma (*colloidal gas aphrons*), gerada a partir de intensa agitação (5 a 10 mil rpm), composta normalmente de 65% gás e com diâmetro das bolhas entre 25 e 300 μm, e que tem sido utilizado como um novo solvente verde (Save & Pangarkar, 1994; Jauregi & Varley, 1999). As saponinas proporcionam uma microespuma mais estável (10 min) do que as geradas por outros surfactantes (4-5 min) (Kommalapati *et al*, 1996). A microespuma já foi utilizada para recuperação de proteínas e carotenóides (Jauregi *et al*, 1997; Alves *et al*, 2006), e até mesmo como carreador de oxigênio em cultivos de bactérias (Park *et al*, 2009).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) MATERIAIS

Ao todo 38 plantas, sob formas variadas, foram adquiridas no comércio de acordo com a Tabela 4, e tiveram suas identidades certificadas pela Profª Ana Cláudia Vieira, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRJ, através de exame microscópico das plantas, para assim poderem ser utilizadas no preparo de extratos.

Tabela 4 – Plantas utilizadas para o estudo de saponinas

Nome vulgar	Nome científico	Parte utilizada	Estado na compra	Local de obtenção
Alcaçuz	*Glycyrrhiza glabra* L.	raiz	pó	Mercado local
Alho	*Allium sativum* L.	bulbo	inteiro	Comércio popular
Alho porro	*Allium porrum* L.	bulbo (talos)	inteiro	Comércio popular
Amaranto	*Amaranthus cruentus* L.	semente	inteiro	Embrapa
Amendoim	*Arachis hypogaea* L.	semente	inteiro	Mercado local
Aveia	*Avena sativa* L.	semente	flocos	Comércio popular
Berinjela	*Solanum melongena* L.	fruto + semente	inteiro	Comércio popular
Beterraba (f)	*Beta vulgaris* L.	folha	inteiro	Comércio popular
Beterraba (t)	*Beta vulgaris* L.	tubérculo	inteiro	Comércio popular
Bucha	*Luffa cylindrica* M. Roem.	fruto	inteiro	Fazenda (MG)
Calêndula	*Calendula officinalis* L.	flores	inteiro	Mercado local
Cará	*Dioscorea alata* L.	tubérculo	inteiro	Comércio popular
Castanha-da-índia	*Aesculus hippocastanum* L.	semente	inteiro	Mercado local
Cebola	*Allium cepa* L.	bulbo	inteiro	Comércio popular
Centella	*Centella asiatica* (L.) Urb	partes aéreas	pedaços	Mercado local
Chá verde	*Camellia sinensis* (L.) Kuntze	folhas	pedaços	Mercado local
Ervilha	*Pisum sativum* L.	semente	inteiro	Mercado local
Fáfia	*Pfaffia paniculata* Kuntze.	raiz	rasurado e pó	Mercado local
Feijão azuki	*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H.Ohashi	semente	inteiro	Mercado local
Feijão preto	*Phaseolus vulgaris* L.	semente	inteiro	Comércio popular
Ginseng	*Panax ginseng* C.A.Mey	raiz	pó	Santos Flora (SP)
Girassol	*Helianthus annuus* L.	flores	inteiro	Comércio popular
Grão-de-bico	*Cicer arietinum* L.	semente	inteiro	Mercado local
Guaraná	*Paullinia cupana* Kunth.	semente	pó	Comércio popular
Hera	*Hedera helix* L.	partes aéreas	inteiro	Nova Friburgo/RJ (Fazenda Prof Daniel)
Juá	*Ziziphus joazeiro* Mart.	casca e tronco	pedaços e pó	Mercado local
Lentilha	*Lens culinaris* Medik.	semente	inteiro	Mercado local
Lírio	*Lilium pumilum* "híbrido asiático" Navona	bulbo	inteiro	Bulbos André Boersen (Sendas)
Maracujá	*Passiflora alata* Curtis	folha	pedaços	Mercado local
Mate	*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.	folha	pedaços	Mercado local
Periandra	*Periandra mediterranea* (Vell) Taub	raiz	rasurado e pó	Santos Flora (SP)
Pimenta	*Capsicum frutescens* L.	fruto + semente	inteiro	Comércio popular
Quilaia	*Quillaja saponaria* Mollina	casca tronco	rasurado	Santos Flora (SP)
Quinoa	*Chenopodium quinoa* Will.	semente	inteiro	Mercado local
Sisal	*Agave sisalana* Perrine ex Engelm.	folha	inteiro	Jardim Botânico (JBRJ)
Soja	*Glycine max* L.	semente	inteiro	Mercado local
Tribulus	*Tribulus terrestris* L.	folhas	pó	Mercado local
Unha-de-gato	*Uncaria tomentosa* DC.	casca	rasurado	Mercado local

Os solventes e reagentes utilizados foram: acetona, éter etílico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido fosfórico, clorofórmio, metanol, etanol 95%, hidróxido de sódio, vanilina e cloreto de sódio (Vetec); butanol, acetonitrila (Tedia); óleo de soja (Perdigão), Span 20 (Fluka), Tween 80 e diosgenina (Sigma), Triton X-100 (Isofar) e ácido bórico (Pró-químicos).

3.2) EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no presente trabalho estão relacionados a seguir:

- Centrífugas Fanem modelo 204-NR e Eppendorf modelo 5804R;
- Espectrofotômetros Hach modelo DR/4000 UV, Shimadzu modelo UV-1800 e BEL Photonics SP 2000 UV;
- Incubador com agitação e controle de temperatura (*Shaker*) Certomat BS-1;
- Tensiômetro Krüss K-100 com banho termostatizado Julabo F32;
- Ultrafreezer CL120-80V;
- Liofilizador Terroni Enterprise I;
- Balança analítica Ohaus Adventurer;
- Liquidificador Arno com lâminas modificadas;
- Peneira Granutest com abertura de 0,50 mm (32 Mesh Tyler ~ nº de aberturas da peneira/polegada)
- Banho termostatizado Tecnal TE-2005;
- Sistema de água ultrapura Millipore Simplicity;
- Banho de ultrassom Odontobras 2840D (40 kHz);
- Evaporador Rotativo TE-210 acoplado a bomba de vácuo TE-0581, ambos Tecnal;
- Refratômetro Abbe de Bancada, modelo Q-767B, e Estufa de secagem, Quimis;

3.3) MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1) Teor de Saponinas Totais

Para determinação das saponinas totais pelo método da vanilina-ácido sulfúrico (Makkar *et al*, 2007), é necessário que as plantas sejam secas, cominuídas e peneiradas de forma a manter a mesma granulometria para preparar em seguida os extratos butanólicos de acordo com o esquema apresentado na Figura 17. A granulometria de 32 Mesh Tyler foi escolhida por um diâmetro de partícula intermediário utilizado na literatura (Ong & Len, 2003; Zhao *et al*, 2007). Este processo têm 5 etapas principais: desengraxe, possui a função de remoção de lipídeos; extração, utilizando uma solução metanol/água (1/1) para obtenção das saponinas e outros componentes; após a remoção do resíduo sólido e do metanol, há a etapa

de lavagem com clorofórmio para remoção das possíveis agliconas formadas pela hidrólise das saponinas; partição com butanol, grande parte dos glicosídeos, saponinas e flavonóides, se distribuem para fase butanólica, permanecendo na fase aquosa apenas açúcares; e após a remoção do butanol e ressuspensão em água, a liofilização de um extrato rico em saponinas. Assim a presença de sapogeninas triterpênicas e esteroidais, além de fitoesteróis, que podem resultar em falso positivos na análise, pode ser evitada.

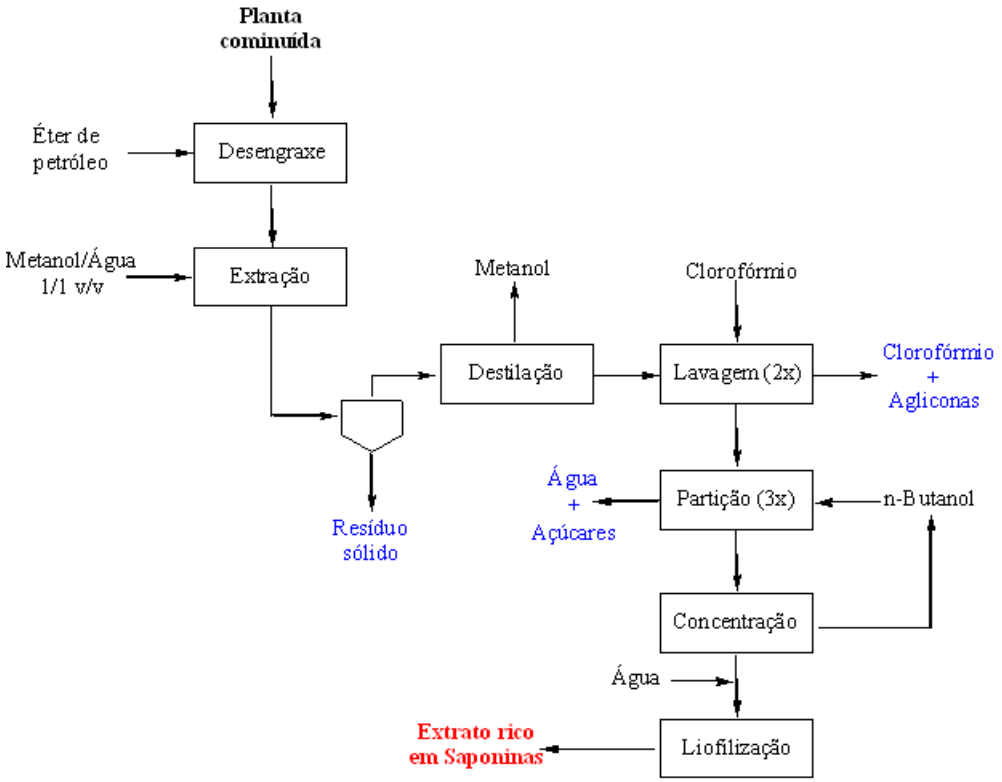


Figura 17 – Preparo do extrato rico em saponinas

Outra possível interferência nesta análise é a presença de catequinas e dihidrochalconas em proporções de compostos fenólicos no extrato butanólico acima de 15% (Sarkar & Howarth, 1976; Sun *et al*, 1998). Neste caso, há necessidade da inclusão de uma etapa logo após a partição com butanol que seria a lavagem com solução aquosa de NaOH 1% (p/v) (Gosmann *et al*, 1995), em que os flavonóides são ionizados e distribuídos para a fase aquosa.

A determinação das saponinas totais nos extratos foi efetuada pela adição de 165 µL de amostra (solução diluída 50 vezes em metanol 80%) a 165 µL de solução etanólica 8%p/v de vanilina e em seguida, a adição de 1,65 mL de solução aquosa 72% de H_2SO_4 (previamente preparada e resfriada). A solução ácida resultante foi mantida aquecida a 60ºC por 10 minutos. A curva padrão foi realizada com diosgenina 0,5g/L, sendo a absorbância detectada pelo espectrofotômetro em 544 nm.

3.3.2) Teor de Compostos Fenólicos Totais (ou Fenóis Totais)

A maioria dos extratos butanólicos pode apresentar saponinas e compostos fenólicos, e por isso a concentração de fenóis totais foi determinada (em triplicata) pelo método de Folin-Denis (Waterman & Mole, 1994). A 10 μL de amostra foram adicionados 1,69 mL de água deionizada e 0,2 mL de uma solução saturada de Na_2CO_3 (previamente preparada). A solução foi homogeneizada e a seguir foram adicionados 0,1 mL de reagente de Folin-Denis (10% p/v tungstato de sódio, 2% p/v ácido fosfomolibdico e 5% v/v de ácido ortofosfórico, previamente preparada). O sistema foi mantido na ausência de luz por exatos 30 minutos. A curva padrão foi realizada com ácido tânico 0,1g/L, sendo a absorbância detectada pelo espectrofotômetro em 760 nm.

3.3.3) Teor de Açúcares Redutores Totais

Para detectar a degradação das saponinas, foram feitas análises em triplicata de açúcares redutores totais em solução. A 1 mL de amostra (solução diluída 20 vezes) em tubo de Folin-Wu foram adicionados 1 mL da mistura 4:1 das soluções aquosas A (2% p/v $NaHCO_3$, 1,5% p/v tartarato duplo de sódio e potássio, 3% p/v Na_2CO_3 anidro e 14,25% p/v Na_2SO_4 anidro) e B (2% p/v $CuSO_4$ $5H_2O$ e 18% p/v Na_2SO_4 anidro), respectivamente. Em seguida, a mistura reacional foi aquecida a 100°C por 10 minutos exatos, resfriada, e a esta adicionados 2 mL da solução C (5%p/v $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 5%v/v H_2SO_4 concentrado e 0,6% p/v $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$, previamente preparada, mantida a 37ºC por 2 dias) com intensa agitação, até total desprendimento gasoso. O volume total foi completado a 25 mL com água destilada. A curva padrão foi realizada com glicose 1g/L, sendo a absorbância detectada pelo espectrofotômetro em 540 nm (Somogyi, 1952).

3.3.4) Índice de Emulsificação

A 4 mL de óleo de soja foram adicionados 4 mL de solução aquosa de saponinas com uma concentração de 0,1 g/L, sendo então agitados em vortex por 2 minutos (2500 rpm). Após 24 horas, o índice de emulsificação (IE) foi calculado como sendo a razão entre a altura da camada em emulsão (h_{emuls}) e a altura total da mistura (h_{total}), como descrito na equação abaixo (Cooper & Goldenberg, 1987; Sarubbo *et al*, 2006).

$$IE = \frac{h_{emuls}}{h_{total}} \times \mathbf{100}$$

3.3.5) Tensão Superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o tensiômetro segundo o método da placa. Para cada amostra analisada foram necessários 40 mL de extrato com uma concentração de 0,1 g/L de saponinas, mantidos a temperatura ambiente (25ºC). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada (Fontes, 2008).

3.3.6) Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada pela Prof Daniela Sales Alviano no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos no Instituto de Microbiologia/UFRJ. O método utilizado foi o teste de difusão em ágar (*drop test*), onde 10 μL de amostra (50 mg/mL) foram colocadas no centro de cada placa de Petri, previamente inoculadas com *Aspergillus niger, Candida albicans, Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus,* e incubadas a 30ºC por 24 h, sendo depois o diâmetro de inibição de crescimento medido em mm (Hili *et al*, 1997).

3.3.7) Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi determinada por dois métodos: o método do tensiômetro, com diluições sucessivas dos extratos de saponinas até manutenção de valor constante da tensão superficial (Sarubbo *et al*, 2006) e por espectrofotometria, conhecido como titulação turbidimétrica, através da medida da transmitância a 450 nm (Abed *et al*, 2004), sempre utilizando água como controle.

3.3.8) Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH (1,1-difenil-2-picril hidrazil). Este método mede a habilidade de captura de radicais livres, utilizando uma solução etanólica 0,3 mM de DPPH como radical livre estável e com alguma coloração (roxo) para detecção no espectrofotômetro. Assim, as amostras solubilizadas em etanol (1430 μL) são adicionadas a 570 μL de solução de DPPH, com medida da absorvância em 518 nm depois de 30 min no escuro. Para cada concentração de amostra é necessário que se realize um "ensaio em branco" para se descontar a absorvância da própria amostra, sendo preciso apenas substituir a solução de DPPH por etanol. Por outro lado, também deve ser feito um "ensaio controle", onde nesse caso, substitui-se a amostra por etanol (Silva *et al*, 2005). A porcentagem de descoloração do DPPH (%AA) pelas amostras foi calculada de acordo com a fórmula abaixo.

$$\%AA = \left[1 - \left(\frac{\overline{Abs} - Abs_{BRANCO}}{Abs_{CONTROLE}}\right)\right] \times 100$$

Assim, plotando %AA x concentraçãoes das amostras, foi obtido uma reta de regressão linear, que possibilita o cálculo do EC50, que significa qual quantidade de amostra é necessária para diminuir a absorbância do DPPH em 50%.

3.3.9) Determinação do Colesterol

A análise de colesterol foi realizada através de um método espectrofotométrico utilizando um kit enzimático que contém lipase, colesterol oxidase e peroxidase, tendo como padrão uma solução de colesterol de 200 mg/mL (Moreau *et al*, 2003). Inicialmente, 20 µL de amostra é adicionado a 2,0 mL de reativo de trabalho (0,5 mL de 4-aminofenazona 0,025 M + 19 mL água + 0,5 mL fenol 0,055 M + 0,2 mL reativo enzimático), e incubados a 37 ºC em um banho-maria por 60 minutos, e depois detectados em espectrofotômetro a 505 nm. A concentração de colesterol é calculada de acordo com a fórmula abaixo.

$$Colesterol(mg/dL) = \frac{Abs.(Amostra)}{Abs.(Padrão)} \times 200$$

3.3.10) Determinação de Triton X-100

Para detectar a concentração de Triton X-100 nos extratos, há duas possibilidades: espectrofotometria e índice de refração. Utilizando a espectrofotometria, os comprimentos de onda recomendados (254, 275, 278 e 283 nm) para determinação do Triton tem a interferência das saponinas, com a sobreposição dos valores de absorbância. Com isso, foi utilizado o índice de refração em um refratômetro. Foi feita uma curva de calibração utilizando soluções hidroalcoólicas (30% v/v) de Triton X-100 variando a concentração de 2 a 60% v/v. Nos valores obtidos no refratômetro das amostras com Triton X-100, foram descontadas os valores de índice de refração referentes às concentrações de alguns interferentes como o carbonato, as saponinas e a solução hidroalcoólica.

3.3.11) Produção de Agliconas por Hidrólise Ácida

A hidrólise das saponinas foi realizada com um método adaptado de Rothrock *et al* (1957) com a adição de 100 mL de solução HCl 8N (78,8% v/v) a 100 mL de extrato, a 60ºC por 8 h. O material em suspensão foi filtrado, ressuspenso em DMSO, particionado em clorofórmio e concentrado no rota-evaporador. O material final foi solubilizado minimamente em metanol, recristalizado em água e liofilizado.

3.3.12) Atividade Enzimática

3.3.12.1) Lipase

A atividade da lipase foi estimada mediante a variação de absorbância a 410 nm em espectrofotômetro devido à hidrólise do *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL) com uma concentração de 0,162 $mg.mL^{-1}$ em tampão fosfato de potássio (0,05 M), pH 7,0 (Meirelles, 1997). O substrato (*p*-NFL) foi preparado solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, uma alíquota foi diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio (0,05 M). Para determinação da atividade, foi adicionado 0,2 mL da solução da enzima em 1,8 mL do substrato previamente aclimatado a 37ºC por 15 minutos, e através da variação da absorvância acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco de reação, foi monitorado a quantidade de produto formado durante 100 segundos.

O cálculo da atividade foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$A = \frac{(\Delta Abs) * D * f * V_R}{(\Delta t) * V_A}$$

onde:

A = atividade da enzima ($U.L^{-1}$), onde 1 Unidade enzimática (1U) é a quantidade de enzima capaz de produzir 1μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições de ensaio;

ΔAbs = variação de absorvância no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

V_R = volume (mL) do meio reacional total.

V_A = volume (mL) da solução enzimática utilizado no ensaio.

f = fator de conversão (245,1 μmol/L)

3.3.12.2) Protease

A atividade de protease foi estimada mediante a variação de absorvância a 428 nm em espectrofotômetro devido à hidrólise da azocaseína com uma concentração de 1 $g.L^{-1}$ em tampão universal, no pH ótimo da protease. A 10 mL de substrato foram adicionados 10 mL de solução enzimática diluída 2000 vezes e incubou-se a mistura por 20 minutos a 40ºC em banho-maria, retirando 3 alíquotas de 1 mL aos 10 minutos e mais 3 alíquotas ao final da reação. A cada amostra retirada, é adicionado 0,5 mL de solução de tricloroacético (TCA) 20%, objetivando a precipitação de proteínas não hidrolisadas pelas proteases. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1358,4 g por 15 minutos (Brígida, 2010). Ao fim da

centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 1 mL de KOH 5N. A leitura de absorvância das amostras deve ser feita contra um branco no qual a solução de TCA deve ser adicionada antes da solução enzimática. O cálculo da atividade foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$A = \frac{\left(\overline{Abs}_{20\,\min} - \overline{Abs}_{10\,\min}\right)}{(\Delta t) * V_A * 0{,}01}$$

onde:

A = atividade da enzima ($U.L^{-1}$), onde 1 Unidade enzimática (1U) é a quantidade de enzima capaz de promover o aumento de 0,01 na absorvância que a amostra apresenta em relação ao branco por minuto nas condições de ensaio;

$\overline{Abs}$ = absorbância média no intervalo de tempo transcorrido durante a fase de aumento linear da absorbância;

V_A = volume (mL) da solução enzimática utilizado no ensaio.

Δt = tempo decorrido (em minutos)

3.3.12.3) Amilase

A atividade amilolítica foi medida pelo método do ácido dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores provenientes da hidrólise do amido. Depois de incubar 135 μL de uma solução de amido solúvel 1% a 40ºC junto de 15 μL de preparado enzimático, foi adicionado 400 μL de DNS a mistura, e mantidos a 90ºC por 10 min. Finalmente, foi acrescentado 1,5 mL de água destilada e a absorvância obtida foi quantificada a 540 nm em espectrofotômetro, frente a uma curva-padrão realizada com glicose (0,5 a 10 μmoles/mL). Uma unidade de atividade enzimática (U) equivale a quantidade de enzima que forma 1μmol de glicose (produto) em 1 minuto (Castro, 2010).

3.3.13) Determinação do Grau de Hidrólise (e Síntese)

3.3.13.1) Materiais Hidrofóbicos

Para determinar o grau de hidrólise e de síntese dos materiais hidrofóbicos por lipases na presença de saponinas, transcorrido 4 horas de reação, os experimentos foram realizados em triplicatas, e cada réplica foi utilizada na titulação potenciométrica para determinar no caso da hidrólise os ácidos graxos livres (AGL) sendo gerados, e no caso de síntese, quanto de AGL está sendo consumido. A titulação foi realizada adicionando as amostras em álcool quente neutralizado, completando 50 mL de solução, e os grupos ácidos são neutralizados com solução 1M NaOH até detecção do ponto final a pH 10,2 (no caso do uso de óleos

vegetais ou do próprio ácido esteárico possuidor deste pK_a) (Kanicky & Shah, 2002; Osawa & Gonçalves, 2006) ou até pH 4,8, que é o pK_a do ácido acético. O grau de hidrólise (GHL) foi calculado segundo a equação abaixo, tendo como base ácido oleico:

$$\%GHL = \frac{AGL_t - AGL_0}{M} \times 28{,}2$$

onde o branco, AGL_0, correspondeu ao volume (mL) de NaOH 1 M necessário para neutralização do material hidrofóbico sem hidrólise; AGL_t foi o volume (mL) de NaOH 1M para neutralização do material que foi hidrolisado em determinado tempo após a adição da enzima e M foi a quantidade (g) do material hidrofóbico inicial.

Já o rendimento da síntese (RS) foi calculado segundo a equação abaixo:

$$\%RS = \left(1 - \frac{A_R}{A_0}\right) \times 100$$

onde o branco, A_0, correspondeu ao volume (mL) de NaOH 1 M necessário para neutralização do material hidrofóbico sem ação da lipase; A_R foi o volume (mL) de NaOH 1M para neutralização do material que ainda não foi utilizado para síntese do éster em determinado tempo após a adição da enzima.

3.3.13.2) Materiais Protéicos

Para determinar o grau de hidrólise das proteínas pelas proteases na presença de saponinas, transcorrido 2 horas de reação, alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram inativadas pela adição de 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% e centrifugadas para remoção do material insolúvel precipitado pelo TCA. Neste sobrenadante e no hidrolisado proteico foram determinados o teor de proteínas solúveis no filtrado utilizando o método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), expresso em mg/L de albumina de soro bovino. O grau de hidrólise (GHP) foi calculado segundo a equação abaixo:

$$\%GHP = \frac{(PS_t - PS_0)}{(P_{Total} - PS_0)} * 100$$

onde o branco, PS_0, correspondeu à quantidade de proteína solúvel no substrato apenas na presença de água, nas condições do ensaio; PS_t foi a quantidade de peptideos solúveis no hidrolisado em determinado tempo após a adição da enzima e P_{Total} foi a quantidade de proteína total no hidrolisado em determinado tempo após a adição da enzima.

3.3.13.3) Materiais Amiláceos

Para determinar o grau de hidrólise dos materiais amiláceos pelas amilases na presença de saponinas, transcorrido 2 horas de reação, alíquotas de 1 mL de hidrolisado foram centrifugadas, e o sobrenadante foi analisado para determinação do teor de açúcares redutores por DNS, expresso em μmol/L de glicose. O grau de hidrólise (GHA) foi calculado segundo a equação abaixo:

$$\%GHA = \frac{(GR_t - GR_0) * V}{M * P * T * f} * 100$$

onde o branco, GR_0, correspondeu à concentração (mg/mL) de açúcar redutor soluvel no substrato apenas na presença de água, nas condições do ensaio; GR_t foi a concentração de açúcares redutores totais no hidrolisado em determinado tempo após a adição da enzima; V, volume de solução (mL); M, massa (g) de substrato; P, teor de amido determinado na literatura; T, teor de massa seca; f , é o fator de conversão de amido em glicose (1,111 g glicose/g amido).

3.4) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1) Screening de matérias-primas

Nesta etapa inicial, foram preparados 38 extratos das plantas escolhidas obtidos de acordo com a Figura 17 (subitem 3.3.1). Os extratos liofilizados (5 mg) foram ressuspensos em 2 mL de solução metanol/água (80/20), permitindo avaliar o teor de saponinas totais e de fenóis no extrato butanólico, e por conseqüência a porcentagem de saponinas na planta, que seria a porcentagem de extrato butanólico obtido multiplicado pela proporção de saponinas neste, conforme a equação abaixo:

$$\%Saponinas = \frac{Massa_{Extr.But.}}{Massa_{Mat.Deseng.}} \times \frac{Conc_{SapTot}}{2{,}5} \times 100$$

Além da porcentagem de saponinas nas plantas, outros critérios foram estudados para pré-seleção das plantas como a redução da tensão superficial da água (72 mN/m) e o índice de emulsificação, utilizando dois surfactantes comerciais, Span 20 e Tween 80, como padrão de comparação. Os extratos que apresentaram resultados superiores em pelo menos um dos critérios estudados seguiram para a determinação de atividade antimicrobiana. Ao final, os dois extratos escolhidos, juá e sisal, atenderam os critérios selecionados, além de pertencerem a agrobiodiversidade brasileira e possibilitarem a idéia de desenvolvimento sustentável das espécies.

3.4.2) Caracterização das Saponinas

3.4.2.1) Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para avaliação da atividade superficial dos extratos ricos em saponinas foi feita a determinação de CMC dos extratos escolhidos de juá e sisal, e de mais dois, ginseng e quilaia, já que estes apresentam vasta documentação na literatura. No presente trabalho, foram comparados os resultados obtidos pelo método do tensiômetro com os obtidos pelo método espectrofotométrico (turbidimétrico). Como ambos apresentaram resultados similares, com uma variação de 10 a 20% entre os métodos, os testes seguintes, onde se estudaram as alterações da CMC das saponinas do juá e do sisal em função da variação da temperatura, do pH e da concentração de NaCl (%p/v) nos extratos foram realizados pelo método turbidimétrico utilizando 26 diluições desde 10 g/L até 0,001 g/L, com detecção da tensão superficial da CMC e das variações de ± 20% de sua concentração. Para a variação de pH, foi utilizado o tampão universal (Britton & Robinson, 1931) que apresenta uma ampla faixa de pH (3 a 11).

Para realização destes testes, foi feito um planejamento experimental composto central, constituído de 17 experimentos para cada extrato, como mostrado na Tabela 5. Este tipo de planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k (neste caso k = 3, pois são três fatores), com 8 (2^3) ensaios fatoriais, 6 (2k) ensaios axiais e 3 ensaios no ponto central. Os valores dos níveis associados aos ensaios axiais (-1,68 e +1,68) são calculados a partir da rotabilidade (α): $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Já os pontos centrais são incluídos para possibilitar a estimativa do erro do planejamento, em um número entre 3 e 5 (Calado & Montgomery, 2003). Os resultados foram analisados através do *software* STATISTICA 6.0.

Tabela 5 – Análise da variação de CMC utilizando planejamento composto central

Ensaios	-1,68	-1	0	+1	+1,68
T (ºC)	23,2	30,0	40,0	50,0	56,8
pH	3,6	5	7	9	10,4
% NaCl	0	1	2,5	4	5

3.4.2.2) Atividade Antioxidante

O teste de atividade antioxidante foi realizado tanto no extrato bruto (saponinas + compostos fenólicos) quanto no extrato purificado (saponinas), de juá e sisal, tendo como padrões ácido ascórbico, ácido tânico, Epigalocatequina galato (EGCG) e diosgenina. As amostras solubilizadas em etanol em concentrações variando de 1 a 10000 μg/mL.

3.4.2.3) Complexação com Colesterol

Inicialmente foi preparada uma solução etanólica de 2 g/L de colesterol a qual foi adicionada uma solução também etanólica de saponinas de juá e de sisal em concentrações variando de 0,1, 0,5, 1, 2, 5 e 200 g/L, sendo homogeneizadas no vortex a 2500 rpm por 2 min.

Depois o material foi centrifugado a 10000 rpm, o sobrenadante separado e analisado quanto ao teor de colesterol.

3.4.2.4) Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima dos extratos butanólicos e das saponinas de juá e de sisal foram realizados com base na metodologia padrão internacional das Normas M27-A2 (NCCLS, 2002a), M38-A (NCCLS, 2002b) e M7-A6 (NCCLS, 2003), do CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute) descrita para cada um dos microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Aspergillus niger* (ATCC 16404) e *Candida albicans* (ATCC 10231), tendo ciprofloxacina e anfotericina B como padrões antimicrobianos controle. Todos os testes foram conduzidos pela Prof Daniela Sales Alviano no Laboratório de Estruturas de Superfície de Microrganismos no Instituto de Microbiologia/UFRJ.

Para observação da CIM sobre os microrganismos, foram feitas diluições seriadas (1:2) dos extratos butanólicos, das saponinas e das substâncias padrão com concentração inicial de 12,5 mg/mL em meio de cultivo RPMI – 1640 (DIFCO) com glutamina e sem bicarbonato, tamponado a pH 7,0 em 25ºC com MOPS (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico) para fungos e Mueller Hinton – 2 g de infusão de carne, 17,5 g de caseína e 1,5 g de amido por litro - para bactérias.

As bactérias foram crescidas em BHI sólido por 24 horas a 37ºC. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar a D.O. de 0,08 – 0,1 em 625nm ($1x10^8$UFC/mL), e depois feitas diluições do inóculo inicial (1:20 de meio de cultura líquido Mueller Hinton) para obtenção do inóculo final de $5x10^6$ UFC/mL. A cada poço foi adicionado 10µL do inóculo em um volume final de 110µL de meio líquido Mueller Hinton adicionado em cada extrato e saponina nas suas respectivas diluições, onde foi obtida uma suspensão de $5x10^5$ UFC/mL.

Os fungos foram crescidos em ágar Sabouraud por 48 horas em temperatura ambiente. O inóculo inicial foi obtido através de suspensão em água para determinar a D.O. de 0,08 – 0,1 em 530nm. Foram feitas diluições do inóculo 1:50 (10µL em 500µL de meio de cultura RPMI) e 1:20 (100µL em 2000µL de meio). Em cada poço foi adicionado 100µL do inóculo, em um volume final de 200µL de meio de cultura RPMI adicionado com cada extrato e saponina em suas respectivas diluições, obtendo uma suspensão de $5,0x10^2$ a $2,5x10^3$ UFC/mL.

Após o período de incubação, a CIM é determinada visualmente pela turvação e pela adição de Resazurina (0,005% em PBS pH 7.2) para todos os microrganismos testados.

3.4.2.5) Composição das Saponinas

A análise da composição das saponinas foi realizada por espectrometria de massas em ressonância ciclotrônica de íons por Transformada de Fourier com ionização por eletrospray (ESI FT-ICR MS), conduzida pela consultora Rosana Cardoso e Boniek Gontijo da Gerência de Química do CENPES/PETROBRAS. Uma amostra de 2 mg das saponinas liofilizadas de juá e sisal (com todos os fenóis removidos por lavagem com NaOH 1%) foi dissolvida em 10 mL de metanol. Desta solução, 500 μL foram transferidos para um frasco de 1 mL, e diluídos com metanol contendo 0,1% de hidróxido de amônio apara análise no modo negativo (ESI (-)). Esta solução resultante foi injetada no espectrômetro LTQ FT Ultra (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), nas seguintes condições:

Parâmetros	ESI (-)
Iso Spray Voltage	3,10 kV
Tube Lens	-39 V
Voltagem do Capilar	-100 V
Temperatura do Capilar	275ºC

3.4.3) Extração das Saponinas

3.4.3.1) Extração com solventes orgânicos verdes

Como a intenção desta tese é utilizar estratégias verdes e limpas de processamento, os solventes escolhidos foram água e etanol 95%. Para determinar qual a melhor proporção entre esses solventes na extração das saponinas do juá e do resíduo mucilaginoso do sisal, foram fixados alguns parâmetros como: relação matéria-prima/solvente de 1/5 (0,2); temperatura, 50ºC; velocidade de agitação, 200 rpm; e tempo, 4 horas. As variações foram de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 e 100% v/v etanol. De forma a evitar interferências nas análises de saponinas e fenóis totais, estas foram realizadas com as amostras previamente lavadas com clorofórmio para remoção de agliconas.

Após a seleção da melhor composição de solventes, foi realizado um novo planejamento experimental composto central variando alguns parâmetros como temperatura, velocidade de agitação e relação matéria-prima/solvente, como demonstrado pela Tabela 6, em um total de 4 horas de extração. As variáveis de resposta avaliadas foram o teor de saponinas, fenóis e açúcares redutores totais.

Tabela 6 – Otimização da extração de saponinas do juá utilizando planejamento composto central

Ensaios	T (°C)	Agitação (rpm)	Juá/ Solvente
1	38	140	0,20
2	38	140	0,30
3	38	260	0,20
4	38	260	0,30
5	62	140	0,20
6	62	140	0,30
7	62	260	0,20
8	62	260	0,30
9	30	200	0,25
10	70	200	0,25
11	50	100	0,25
12	50	300	0,25
13	50	200	0,166
14	50	200	0,334
15 (C)	50	200	0,25
16 (C)	50	200	0,25
17 (C)	50	200	0,25

Com os principais parâmetros otimizados, foi realizado o estudo da cinética da extração das saponinas do juá e do sisal, analisando as mesmas variáveis de resposta anteriores em intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 480 e 1440 minutos, que depois foram comparados com dois experimentos realizados no Soxhlet usando água e etanol 95% separadamente. Além disso, foi feito um ensaio para avaliar quantas extrações seriam necessárias para alcançar o máximo de recuperação de saponinas.

3.4.3.2) Extração com líquidos iônicos e análogos

Nesta etapa foram preparados líquidos iônicos biocompatíveis e solventes eutéticos com intuito de serem alternativas mais eficientes na extração de saponinas do que água e etanol. Os líquidos iônicos foram preparados através da adição lenta de um ácido orgânico sobre bicarbonato de colina ($ChHCO_3$ 76%) sob agitação durante 12h, e depois mantida agitação para finalizar a reação por mais 48h. Como a reação é estequiométrica, foi calculada a proporção de água presente nos LI, com exceção do acetato de colina (ChAc, 2,08%), que grande parte da água foi removida por rotaevaporação a vácuo: salicilato de colina (ChSal, 22,4%); citrato de colina (ChCit, 19,14%); succinato de colina (ChSuc, 24%); lactato de colina (ChLac, 29,32%); hexanoato de colina (ChHex, 24,19%); benzoato de colina (ChBz, 23,61%); butirato de colina (ChBut, 26,72%); malonato de colina (ChMal, 25,15%); oxalato de colina (ChOx, 26,5%); propionato de colina (ChProp, 28,21%); e fenilacetato de colina (ChPhAc, 23,61%).

Os solventes eutéticos foram preparados adicionando um composto doador de hidrogênio a ChCl em um proporção molar de 2/1, e aquecendo a mistura até 100ºC. As misturas utilizadas como solventes foram apenas as que se mantiveram liquefeitas a temperatura de 25ºC, como as que utilizaram glicerol, uréia, etileno glicol, ácido acético, ácido malônico, ácido oxálico, ácido fenilacético, ácido propiônico e ácido láctico, sendo esta última com presença de 5,84% de água.

Após o preparo dos líquidos iônicos e análogos, foram fixados alguns parâmetros para escolha do solvente mais efetivo na extração de saponinas de juá e do resíduo mucilaginoso seco de sisal, como temperatura 40ºC, agitação 200 rpm, tempo 24h, relação matéria-prima/solvente 1/5, conteúdo de co-solvente de 50%, sendo comparados com água e etanol 30%. Assim, com o líquido iônico ou seu análogo escolhido, foi realizado um planejamento de misturas (Tabela 7) para determinar qual seria a melhor proporção entre este solvente, água e etanol para extração das saponinas.

Tabela 7 – Planejamento de misturas de extração de saponinas por líquidos iônicos ou análogos

Ensaios	Água	Etanol	Solvente
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,33	0,67	0
5	0,33	0	0,67
6	0	0,33	0,67
7	0,67	0,33	0
8	0,67	0	0,33
9	0	0,67	0,33
10	0,33	0,33	0,33
11	0,67	0,167	0,167
12	0,167	0,67	0,167
13	0,167	0,167	0,67
14	0,33	0,33	0,33

Com a melhor proporção definida, foi realizado o estudo da cinética da extração das saponinas do juá e do sisal, analisando as mesmas variáveis de resposta anteriores em intervalos de tempo de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 480 e 1440 minutos. Depois foram avaliadas a relação matéria-prima/solvente (1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 e 1/50) e a temperatura (30, 40, 50, 60 e 70ºC), com as condições anteriores fixas.

3.4.3.3) Comparação dos métodos de extração

Com intuito de comparar a extração orbital simples com outros métodos de extração, o estudo da cinética de extração foi repetido, mantendo o tempo de 3 horas, com o auxílio de ultrassom. A influência do tensoativo Triton X-100 (5% v/v) na extração também foi testada. Os intervalos de tempo adotados no experimento com o *shaker* foram 15, 30, 60, 120 e 180 minutos, e no experimento com o ultrassom foram de 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Com as condições escolhidas anteriormente fixadas, as concentrações de Triton X-100 foram variadas de 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 e 30% v/v para se maximizar a recuperação de saponinas.

3.4.4) Concentração das Saponinas

3.4.4.1) Pré-concentração por Ponto de Névoa

Após a extração micelar das saponinas, a próxima etapa é a concentração dessas e posterior remoção do Triton X-100. Para isso, um total de 22 sais foram testados, em uma concentração de 20% p/v, para auxiliar a separação de uma fase rica em surfactantes (saponinas e Triton X-100) e outra fase rica em sais. Estes sais foram escolhidos por ter um custo baixo e serem amplamente utilizados em alimentos e cosméticos, como: $MgCl_2$, $MgSO_4$, Na_3PO_4, Na_2SO_4, NaCl, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, NH_4NO_3, K_2CO_3, K_2SO_4, KNO_3, KCl, $KHCO_3$, $CaCl_2$, citrato de sódio, acetato de sódio, citrato de potássio, acetato de potássio e acetato de amônio. Para cada sal foi determinado em que temperatura ocorria a separação de fase (*cloud point*). Para cada fase, foi analisado o teor de compostos fenólicos e saponinas, além de medido o volume, e portanto, possibilitando o cálculo de três coeficientes: K, coeficiente de partição; α, fator de concentração; e V, razão volumar.

$$K_{SAP} = \frac{C_{TOPO}\ (g/L)}{C_{FUNDO}\ (g/L)}\ ;\ \ \alpha_{SAP} = \frac{C_{TOPO}(g/L)}{C_{INICIAL}(g/L)}\ ;\ V = \frac{Vol_{TOPO}}{Vol_{FUNDO}}$$

Depois que o sal responsável pela maior concentração de saponinas foi escolhido, foram testadas diferentes concentrações deste sal, como 5, 10, 15, 20, 25 e 30% p/v, repetindo as mesmas análises, e também verificando a variação do *cloud point*.

Com a concentração do sal definida, foram testados alguns adsorventes, como Sílica gel 60 e Amberlites XAD-2 e FPX-66 com o objetivo de remover o máximo de Triton X-100 dos extratos concentrados. As condições destes ensaios foram: 4 mL dos extratos concentrados, 0,8 g de adsorvente, 50ºC, 2h, 200 rpm (Cheetham, 1979). Ao escolher o adsorvente que promove maior remoção de Triton X-100, foi realizado um planejamento composto central variando

parâmetros como temperatura e concentração do adsorvente, como demonstrado pela Tabela 8, mantendo fixos tempo e agitação do ensaio anterior.

Tabela 8 – Otimização da adsorção de Triton dos extratos concentrados utilizando planejamento composto central

Ensaios	Concentração (%)	T (ºC)
1	10	30
2	10	50
3	30	30
4	30	50
5	5,86	40
6	34,14	40
7	20	25,86
8	20	54,14
9 (C)	20	40
10 (C)	20	40
11 (C)	20	40

Com estes parâmetros otimizados, foi realizado o estudo da cinética de adsorção de Triton X-100 dos extratos concentrados de juá e de sisal, analisando as mesmas variáveis de resposta anteriores em intervalos de tempo de 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 minutos. Também foi verificada a possibilidade de reutilização do adsorvente, sendo que após seu uso, este foi lavado sucessivamente por 2 vezes com etanol 95% por 30 minutos e nas mesmas condições ótimas de adsorção de cada extrato, para promover a dessorção de Triton X-100, e depois reciclando o adsorvente limpo para remoção de mais Triton dos extratos concentrados.

Como o Triton X-100 tem um custo elevado, outros surfactantes como Span 20 e 80, Tween 20 e 80, além de PEG 1500, 4000 e 6000, foram testados com objetivo de comparar o fator de concentração e o coeficiente de partição na extração bifásica aquosa. As condições do ensaio foram: a adição de 2,5 mL solução hidroalcoólica (30% v/v) do surfactante ou polímero em concentrações de 15% p/v e 1 g de carbonato de sódio anidro a 2,5 mL extrato hidroalcoolico (30% v/v) de resíduo mucilaginoso de sisal, com posterior homogeneização em vortex a 2500 rpm. No caso do juá, a concentração do polímero ou surfactante utilizada é de 30% p/v.

3.4.4.2) Coluna de Espuma

Foi realizado um planejamento experimental composto central, com intuito de explorar quais seriam os limites de alguns parâmetros como volume inicial de extrato, vazão de ar e concentração relativa de saponinas no extrato, onde 100% seria o extrato sem diluição com etanol 30%, durante 15 min de processamento, podendo ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 – Planejamento composto central exploratório da concentração de saponinas por coluna de espuma

Ensaios	Volume (mL)	Vazão Ar (mL/min)	Conc. Saponinas (%)
1	70	600	25
2	70	600	75
3	70	1000	25
4	70	1000	75
5	100	600	25
6	100	600	75
7	100	1000	25
8	100	1000	75
9	60	800	50
10	110	800	50
11	85	460	50
12	85	1140	50
13	85	800	8
14	85	800	92
15 (C)	85	800	50
16 (C)	85	800	50
17 (C)	85	800	50

A partir disso, foram realizados mais 2 planejamentos composto central, uma para o sisal e outro para juá, sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Planejamento composto central da concentração de saponinas por coluna de espuma

Ensaios	SISAL			JUÁ		
	Volume (mL)	Vazão Ar (mL/min)	Conc. Saponinas (%)	Volume (mL)	Vazão Ar (mL/min)	Conc. Saponinas (%)
1	85	800	70	85	400	20
2	85	800	90	85	400	40
3	85	1200	70	85	800	20
4	85	1200	90	85	800	40
5	115	800	70	115	400	20
6	115	800	90	115	400	40
7	115	1200	70	115	800	20
8	115	1200	90	115	800	40
9	75	1000	80	75	600	30
10	125	1000	80	125	600	30
11	100	660	80	100	260	30
12	100	1340	80	100	940	30
13	100	1000	63,2	100	600	13,2
14	100	1000	96,8	100	600	46,8
15 (C)	100	1000	80	100	600	30
16 (C)	100	1000	80	100	600	30
17 (C)	100	1000	80	100	600	30

Com as condições definidas, outros parâmetros foram testados com intuito de aumentar o fator de concentração das saponinas, como testar outros valores para vazão de ar (400, 600 e 800 mL/min para o juá, e 1000, 1200 e 1400 mL/min para o sisal); pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 ajustado com NaOH 6M ou HCl 8N), e a presença dos anéis de Raschig (5, 15 e 25g). Com esses dados obtidos, foram realizados estudo da cinética de concentração durante 6 horas (sisal) e 9

horas (juá) em duas concentrações: no caso do sisal, o extrato etanólico do resíduo mucilaginoso e o próprio resíduo líquido do sisal; no caso do juá, o extrato etanólico e o extrato pré-concentrado com adição de 20% carbonato de sódio. Além disso, a vazão de ar foi diminuída até um valor mínimo que produzisse alguma bolha na coluna, sendo aumentado em sistema gradiente apenas quando a taxa de saída de espuma não permanecia constante.

3.4.4.3) Separação por Membranas

A concentração pelo sistema de membranas foi realizada com apoio de Bruno Santos e da Prof Denise Freire do Laboratório de Biotecnologia Microbiana, do Instituto de Química/UFRJ. Foi utilizado o Millipore Labscale TFF System UF (Millipore, Billerica, USA), com as membranas Biomax 10 (50 cm², Millipore, Pellicon XL) para ultrafiltração com corte de 10 kDa, e Durapore 0,45 (50 cm², Millipore, Pellicon XL) para microfiltração. As membranas foram lavadas antes e depois de seu uso com NaOH 0,1M por 20 minuros, e depois com água destilada. Foram utilizados volumes de 100 mL de extrato, onde todos foram filtrados para remover particulados, e no caso do resíduo líquido de sisal também passaram por microfiltração (25 psi, 30 min). Com a membrana de ultrafiltração (30 psi) foi realizado um estudo da cinética de concentração dos extratos.

3.4.5) Aplicação das Saponinas

3.4.5.1) Alteração de Atividade Enzimática

Com objetivo de investigar a possibilidade do uso de saponinas em aplicações relacionadas à área de alimentos, foi feito um estudo sobre como estas poderiam atuar sobre um complexo enzimático do trato digestivo, a pancreatina, que possui ação amilásica, proteásica e lipásica. Para isso, foi comparada a alteração de várias concentrações de saponinas (0.001, 0.005, 0.01, 0.1 e 0.5%) sobre atividade da pancreatina (0,05%) atuando sobre vários substratos (amido, azocaseína e p-nitrofenil laurato) também em várias concentrações distintas. Também foi feita uma hidrólise ácida das saponinas, simulando as condições no estômago, com concentrações de substratos fixas (amido, 0,1%; azocaseína, 0,025%; p-NFL, 0,504 mM), e de agliconas (diosgenina, juá e sisal) com as mesmas variações das saponinas.

Similarmente, com intuito de verificar o uso de saponinas em cosméticos foi feito o mesmo estudo em relação a atuação destas sobre a colagenase, normalmente presente nas matrizes extracelulares junto com proteínas e glicosaminoglicanas que podem atuar sobre a microcirculação (Wilkinson & Brown, 1999).

3.4.5.2) Hidrólise e/ou Síntese enzimática

Já que as saponinas proporcionam alguma modificação na atividade enzimática foi verificado então como seria a ação da pancreatina e alguma enzima com função similar (Stargen, amilase, Genencor; Papaína, protease, Vetec; Lipozyme CALB, lipase, Novozymes) sobre alguns substratos cotidianos como:

- Carne, leite, soja, feijão preto, gelatina, farinha de trigo, gema e clara de ovo → Proteases
- Milho, arroz, farinha de trigo, batata, mandioca e amido → Amilases
- Azeite, óleo de soja e manteiga → Lipases

As condições de reação foram 2 g de substrato, 10 mL água a 200 rpm durante 2 horas no caso de amilases e proteases, e de 4 horas para as lipases. A temperatura foi de 40ºC para pancreatina, Stargen e Lipozyme CALB, e de 50ºC para a papaína.

No caso da síntese foram utilizados as lipases Lipozyme TL e Novozym 435, ambas da Novozymes, para produção de acetato de butila, a partir de ácido acético e n-butanol relação molar 1/1, adicionado de água (45% volume total), 37ºC, 200 rpm, 4h (Salah *et al*, 2007), e para produção de biodiesel, a partir de ácido esteárico e etanol, na relação molar 1/3, 37ºC, 200 rpm, 4h (Ribeiro *et al*, 2011).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) SCREENING DE MATÉRIAS-PRIMAS

4.1.2) Seleção preliminar dos extratos

A viabilidade do uso de saponinas em aplicações diversas está diretamente relacionada a disponibilidade de plantas facilmente cultiváveis com altas concentrações de saponinas. Assim, a seleção preliminar dos extratos teve como critérios a apresentação de teores de saponinas iguais ou superiores a 2%; índices de emulsificação acima de 50% e tensão superficial abaixo de 46 mN/m, que foram os valores obtidos de uma solução 0,1 g/L de Span 20. Os resultados obtidos foram organizados na Tabela 11, onde os destacados em negrito atenderam a pelo menos 1 critério, e os destacados em vermelho atenderam os 3 critérios (Figura 72, Anexo).

Os resultados relativos ao teor de saponinas, quando comparado com os dados de literatura, foram bastante variados, sendo que os teores obtidos para as amostras de alho, amaranto, aveia, berinjela, calêndula, cará, girassol, juá, maracujá, mate, periandra, quilaia e tribulus encontravam-se nas faixas de valores das referências. Esta variação pode ter ocorrido devido à utilização de extratos butanólicos brutos, que em alguns casos podem apresentar agliconas (triterpenos e esteróides) possivelmente geradas durante o processamento dos materiais. Outra explicação possível é a falta de clareza da maioria dos artigos em relatar o teor de saponinas em suas matérias-primas, já que muitos visam o estudo fitoquímico de saponinas desconhecidas, fazendo seu isolamento, purificação e determinação estrutural, informando apenas quantidade de matéria-prima utilizada, de extrato butanólico e das saponinas isoladas, o que nem sempre representa a quantidade total presente no extrato.

Para se realizar os testes de atividade surfactante foi mantida a concentração de 0,1 g/L, pois esta concentração já seria ou estaria bem próxima da CMC (Mitra & Dungan, 1997; Decroos *et al*, 2007) e proporcionaria alterações significativas na tensão superficial e provavelmente no índice de emulsificação. Como existem poucos dados na literatura avaliando o poder surfactante das saponinas, foram introduzidos dois surfactantes comerciais para se ter uma comparação. Decroos e colaboradores (2007) citaram valores de tensão superficial de soyasaponinas entre 50,1 e 54,7 mN/m nas concentrações entre 0,085 e 0,19 g/L, que são muito próximos do encontrado (49,19 mN/m) para a soja neste trabalho. Já Mitra & Dungan (1997) relataram uma tensão superficial para quilaia de 43,5 mN/m, similar ao obtido nesta tese (42,56 mN/m), sendo ambos na mesma concentração. Van de Ven e colaboradores (2011) obtiveram para as saponinas da castanha da índia na concentração de 0,1 g/L uma tensão superficial de 52,2 ± 0,8 mN/m, próximo ao valor encontrado neste trabalho (54,60 mN/m ± 0,63).

Tabela 11 – Comparação do teor e atividade surfactante das saponinas das matérias-primas utilizadas

	Extrato butanolico		Saponinas final (%)	Índice de Emulsificação (%)	Tensão superficial (mN/m)
	% Saponinas Totais	% Fenóis			
Alcaçuz	52,32 ± 3,26	37,8 ± 4,55	**2,70 ± 0,30**	47,70 ± 0,84	**46,76 ± 0,77**
Alho	75,05 ± 4,36	16,74 ± 0,82	0,18 ± 0,01	46,95 ± 1,69	47,92 ± 0,45
Alho poro	66,53 ± 4,72	24,93 ± 0,59	**3,10 ± 0,22**	**51,72 ± 2,44**	**45,45 ± 0,56**
Amaranto	88,23 ± 7,11	3,29 ± 0,50	0,10 ± 0,01	47,00 ± 0,64	46,85 ± 0,52
Amendoim	76,44 ± 5,43	13,39 ± 1,31	0,89 ± 0,06	47,41 ± 1,22	**41,52 ± 0,15**
Aveia	70,32 ± 2,75	0	0,21 ± 0,01	44,94 ± 2,27	**46,14 ± 0,20**
Berinjela	77,89 ± 1,00	2,49 ± 0,55	0,41 ± 0,01	47,46 ± 2,40	49,40 ± 0,38
Beterraba (f)	73,57 ± 6,12	19,62 ± 2,05	0,92 ± 0,08	47,80 ± 0,75	48,30 ± 0,15
Beterraba (t)	86,26 ± 4,58	0	0,50 ± 0,03	47,36 ± 0,13	**42,52 ± 0,41**
Bucha	61,2 ± 5,49	16,74 ± 1,80	0,19 ± 0,02	43,10 ± 2,44	**37,81 ± 0,30**
Calêndula	46,37 ± 3,43	47,91 ± 3,95	0,68 ± 0,05	**53,39 ± 1,20**	**36,12 ± 0,32**
Cará	65,58 ± 1,60	25,28 ± 1,47	0,10 ± 0,02	**50,00 ± 0,78**	48,72 ± 0,53
Castanha-da-índia	80,38 ± 3,54	15,24 ± 1,55	**3,60 ± 0,23**	45,48 ± 0,73	54,60 ± 0,63
Cebola	63,34 ± 1,92	30,24 ± 1,63	0,43 ± 0,01	46,99 ± 0,99	59,83 ± 0,27
Centella	73,36 ± 0,93	19,92 ± 1,84	**1,96 ± 0,12**	45,56 ± 0,97	**44,85 ± 0,85**
Chá verde	47,35 ± 1,29	45,88 ± 1,26	0,68 ± 0,13	45,35 ± 0,10	**40,79 ± 0,51**
Ervilha	84,58 ± 3,25	5,19 ± 0,64	0,94 ± 0,04	48,27 ± 1,28	**42,50 ± 0,52**
Fáfia	89,46 ± 0,14	5,31 ± 0,73	1,74 ± 0,01	**52,12 ± 3,00**	**42,99 ± 0,04**
Feijão azuki	77,49 ± 5,38	11,84 ± 1,30	0,79 ± 0,05	47,89 ± 1,74	52,29 ± 0,60
Feijão preto	84,00 ± 7,60	9,42 ± 0,78	0,64 ± 0,06	48,24 ± 1,24	**37,12 ± 0,18**
Ginseng	86,45 ± 0,50	11,43 ± 1,50	**8,86 ± 0,01**	47,84 ± 0,53	**44,29 ± 0,56**
Girassol	74,15 ± 6,77	16,68 ± 1,70	0,50 ± 0,10	44,19 ± 0,10	51,56 ± 0,72
Grão-de-bico	88,69 ± 7,90	3,72 ± 0,60	**2,03 ± 0,18**	47,85 ± 1,84	52,83 ± 0,73
Guaraná	55,35 ± 1,98	43,31 ± 1,64	0,04 ± 0,01	45,24 ± 0,10	**43,63 ± 1,14**
Hera	72,49 ± 5,71	19,51 ± 2,30	1,26 ± 0,10	**52,59 ± 1,22**	**44,83 ± 1,11**
Juá	77,42 ± 5,21	16,00 ± 1,75	**3,88 ± 0,26**	**50,88 ± 2,48**	**38,03 ± 0,61**
Lentilha	76,99 ± 5,62	13,71 ± 1,25	0,83 ± 0,06	**49,97 ± 2,40**	**41,57 ± 0,41**
Lírio	91,51 ± 8,97	7,62 ± 0,95	0,67 ± 0,07	**50,00 ± 1,20**	49,54 ± 0,94
Maracujá	71,02 ± 1,10	19,02 ± 0,78	0,82 ± 0,01	**48,57 ± 3,22**	**43,32 ± 0,71**
Mate	65,26 ± 2,21	33,14 ± 4,26	0,65 ± 0,10	43,65 ± 0,56	**39,02 ± 0,65**
Periandra	79,02 ± 5,42	19,93 ± 2,50	1,49 ± 0,38	45,45 ± 0,10	53,06 ± 1,10
Pimenta	78,74 ± 3,95	13,57 ± 1,70	0,60 ± 0,10	42,54 ± 0,22	**39,94 ± 0,45**
Quilaia	77,52 ± 0,65	21,6 ± 0,77	**7,16 ± 0,06**	**54,24 ± 2,40**	**42,56 ± 0,10**
Quinoa	79,05 ± 5,40	16,81 ± 1,60	0,64 ± 0,04	49,14 ± 0,02	51,04 ± 0,44
Sisal	62,43 ± 2,99	31,69 ± 2,60	**2,87 ± 0,14**	**50,38 ± 3,06**	**45,05 ± 1,02**
Soja	78,26 ± 7,48	12,93 ± 1,71	**7,28 ± 0,70**	**50,00 ± 0,02**	49,19 ± 0,17
Tribullus	70,72 ± 3,36	21,21 ± 2,00	1,16 ± 0,05	**50,95 ± 2,51**	47,74 ± 0,93
Unha-de-gato	51,26 ± 4,83	47,00 ± 1,17	0,92 ± 0,10	43,02 ± 0,11	**34,30 ± 0,82**
Span 20	-	-	-	**53,04 ± 0,58**	**40,53 ± 0,57**
Tween 80	-	-	-	**53,09 ± 0,51**	**31,40 ± 0,21**

Em uma correlação mais geral, cerca de 71% dos extratos ricos em saponinas conseguiram promover uma diminuição na tensão superficial de 25 a 35 mN/m, comparando-se com a água pura (72 mN/m), mas apenas 47% destes conseguiram promover uma emulsificação com índice maior que 50%. Isso indica que apesar das saponinas conseguirem diminuir a tensão superficial, estas sozinhas não mantêm um grande volume emulsificado. Talvez com concentrações maiores de saponinas, ou menor quantidade de fase hidrofóbica, ou com auxílio de outros surfactantes e/ou espessantes, estas possam estabilizar melhor um sistema em emulsão.

4.1.3) Atividade Antimicrobiana

A partir da seleção preliminar das plantas, foi realizado o teste de atividade antimicrobiana em alguns dos extratos, utilizando 10 μL de uma solução com uma concentração de 50 mg/mL do extrato liofilizado, utilizando como controle positivo a anfotericina B (1 mg/L). A anfotericina B foi escolhida como controle positivo por ser um antifúngico macrocíclico poliênico capaz de promover a morte celular pela interação com o ergosterol presente na membrana fúngica, aumentando sua permeabilidade (Martinez, 2006), ação esta muito semelhante à das saponinas. Para garantir que apenas as saponinas estariam sendo avaliadas em sua atividade antimicrobiana, sem influência dos compostos fenólicos, que podem gerar um falso positivo por possivelmente terem este tipo de atividade principalmente antibacteriana (Cushnie & Lamb, 2005), o extrato liofilizado foi solubilizado em metanol e a este foi adicionada uma mistura de acetona/éter etílico (1/1 v/v) para precipitação das saponinas, que foram separadas e novamente liofilizadas para a análise. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 12.

As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foram testadas, mas não foi observado nenhum halo de inibição para os 21 extratos avaliados. Além do controle positivo (anfotericina B), os extratos de alcaçuz, castanha-da-índia, ginseng, hera, quilaia e tribulus foram utilizados como referências externas já que não integram a agrobiodiversidade brasileira.

A atividade antimicrobiana do extrato de juá era esperada, já que Alviano e colaboradores (2008) relataram atividade antibacteriana contra *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* em uma concentração de 20 mg/mL. Cruz e colaboradores (2007) também verificaram a ação antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Trichophyton rubrum* em uma concentração de 1 mg/mL, apesar de neste caso ter sido utilizado extrato aquoso, o que poderia sugerir ação antimicrobiana de outros compostos, como flavonóides, triterpenos e alcalóides, além das saponinas. No caso do alho poró, Carotenuto e colaboradores (1999) determinaram o ED_{50} (concentração de extrato que causa 50% de redução no crescimento fúngico) das saponinas isoladas de 30-35 μg/mL contra o fungo *Fusarium culmorum*, enquanto Matsuura *et al* (1988) obtiveram um CIM de 25 e 400 μg/mL contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger* para o erubosídeo B, e um CIM > 800 μg/mL para o proto-erubosído B, ambas saponinas do alho. Apenas Sagesaka e colaboradores (1996) citam a ação das saponinas de chá verde contra o fungo *Microsporum audouinii* tendo uma CIM de 10 μg/mL.

Tabela 12 – Atividade antimicrobiana dos extratos por difusão em ágar

Matérias-primas	*Candida albicans*	*Aspergillus niger*
Alcaçuz	-	-
Alho	1,3 cm	1,3 cm
Alho poró	0,8 cm	-
Amaranto	-	-
Amendoim	-	-
Aveia	-	-
Berinjela	-	-
Beterraba folha	-	-
Beterraba tuberculo	-	-
Bucha	-	-
Calêndula	-	-
Castanha-da-índia	1,4 cm	1,1 cm
Cebola	-	-
Centella	-	-
Chá verde	-	0,5 cm
Ervilha	-	-
Fáfia	-	-
Feijão Azuki	-	-
Feijão preto	-	-
Ginseng	-	1,3 cm
Grão-de-bico	-	-
Hera	-	-
Juá	1,1 cm	0,5 cm
Lentilha	-	-
Lírio	-	-
Maracujá	-	-
Mate	-	-
Periandra	-	-
Pimenta	-	-
Quilaia	-	1,8 cm
Quinoa	-	-
Sisal	-	-
Soja	-	-
Tribulus	-	-
Unha-de-gato	-	-
Anfotericina B	1,8 cm	2,0 cm

(-) não houve inibição no crescimento microbiano

Em relação às referências externas, Chapagain e colaboradores (2007) observaram o percentual de inibição de crescimento (17,72 a 59,12%) dos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum*, *Alternaria solani*, *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* pela ação das saponinas de quilaia em concentração variando de 0,1 a 4% p/v. Sung e Lee (2008) testaram a ação antibacteriana dos ginsenosídeos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio vulnificus*, e também o efeito sinérgico destes com antibióticos comerciais (canamicina e cefotaxima). Já para as escinas não há nenhum dado sobre atividade antimicrobiana na literatura.

De maneira geral as saponinas têm um poder antimicrobiano limitado, quando comparadas a outros metabólitos tais como óleos essenciais. Isso pode ser evidenciado pelo trabalho de Hili e colaboradores (1997) que também realizaram o teste antimicrobiano por difusão em ágar de óleos essenciais contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Torulopsis utilis*. Neste teste, os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) apresentaram um halo de inibição de crescimento variando de 1,45 a 5,13 cm para as bactérias, e de 3,43 a 8,00 cm para os fungos.

4.1.4) Seleção Final

De acordo com os resultados acima obtidos de seleção preliminar e de atividade antimicrobiana, há uma drástica redução no número de matérias-primas, de 38 para apenas 8, os quais de acordo com os critérios estabelecidos seriam: alho poró, juá, quilaia e sisal pela seleção preliminar, e alho, alho poró, castanha-da-índia, chá verde, ginseng, juá e quilaia pela atividade antimicrobiana. Contudo castanha-da-índia, ginseng e quilaia são apenas referências externas, pois não pertencem a agrobiodiversidade brasileira, por isso foram retiradas da seleção final. Considerando que os dados da seleção preliminar têm um peso maior que os de atividade antimicrobiana, pois as principais aplicações das saponinas estão relacionadas às suas propriedades micelares, ambos chá verde e alho também foram retirados, já que possuíam teor de saponinas e índice de emulsificação abaixo do pré-estabelecido. Assim, os extratos escolhidos para continuação do trabalho foram juá e sisal, dado que ambos poderiam incentivar a conservação e a utilização sustentável da agrobiodiversidade brasileira.

4.2) CARACTERIZAÇÃO DAS SAPONINAS

4.2.1) Concentração Micelar Crítica (CMC)

Inicialmente, foi feita a determinação de CMC utilizando o tensiômetro pelo método de placa plana (Figura 18) comparando com o turbidimétrico (Figura 19) dos extratos escolhidos, juá e sisal, e de duas referências externas, ginseng e quilaia. A comparação dos valores da CMC obtidos pelos dois métodos demonstra uma similaridade entre os resultados, com variações observadas na faixa entre 4 e 20%, o que pode ser visualizado na Tabela 13. Além da similaridade dos resultados, fatores como maior simplicidade operacional e menor quantidade de matéria-prima utilizada, permitiram a escolha do método turbidimétrico para avaliação de como pH, temperatura e concentração de sal em solução podem afetar a CMC.

Mitra & Dungan (1997) relataram que a CMC de saponinas de quilaia de diferentes fontes comerciais variam entre 0,51 a 0,77 g/L, a 25ºC, mas podendo alcançar 0,35 g/L a 34ºC. Já Stanimirova e colaboradores (2011) obtiveram 0,25 g/L como CMC da saponinas de extratos comerciais de quilaia, muito similar aos dados aqui encontrados. Essa diferença nos valores de CMC deve estar relacionado as metodologias utilizadas: solubilização de diclorofluoresceína (Mitra & Dungan, 1997) e tensão superficial. O dado de CMC mais próximo do ginseng foi o trabalho de Xiong e colaboradores (2008) obtendo o valor de 0,34 g/L para as saponinas de *Panax notoginseng*, que por apresentar proporções diferentes de cada ginsenosídeo pode justificar as diferenças em relação a este trabalho que utilizou extrato butanólico de *Panax ginseng*.

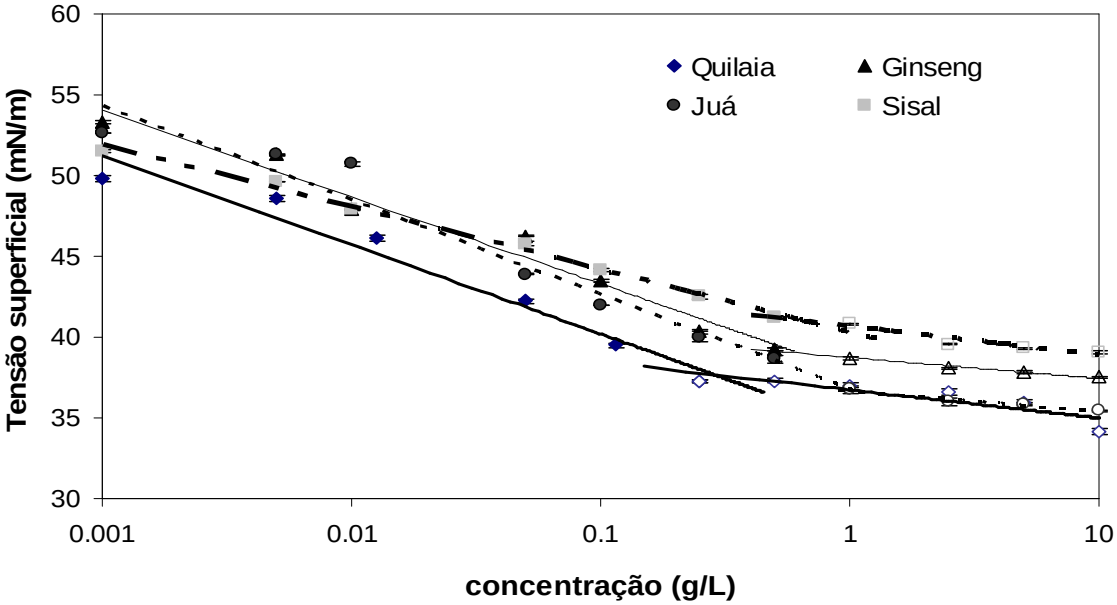


Figura 18 – Determinação de CMC dos extratos ricos em saponinas através do tensiômetro

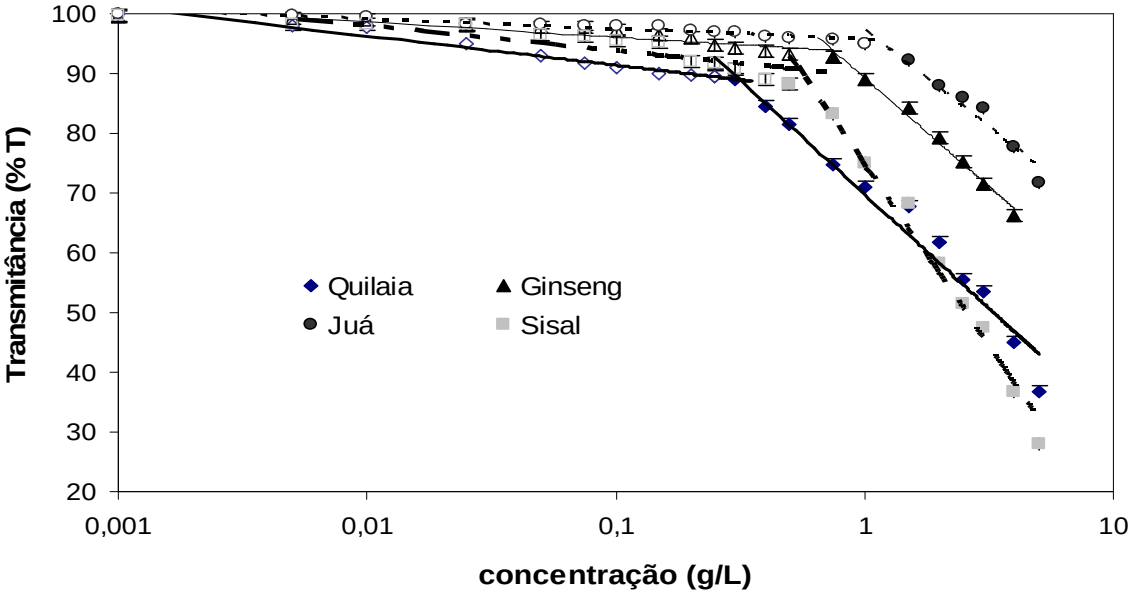


Figura 19 – Determinação de CMC dos extratos ricos em saponinas pelo método turbidimétrico

Tabela 13 – Comparação dos CMC dos extratos ricos em saponinas obtidos por dois métodos distintos

Matérias-primas	CMC (g/L) [1]	CMC (g/L) [2]	Desvio (%)
Quilaia	0,284	0,315	10,72
Ginseng	0,627	0,747	19,08
Juá	1,064	1,110	4,39
Sisal	0,684	0,545	20,37

[1] Método pelo tensiômetro; [2] Método turbidimétrico

Os resultados da influência de fatores como pH, temperatura e concentração salina sobre a CMC podem ser visualizados na Tabela 14. Para cada CMC calculada pelo método turbidimétrico, foi medida a tensão superficial relacionada (tensão crítica) ao CMC e às suas variações de ± 20%. Assim o extrato de sisal teve uma variação de CMC entre 0,15 a 0,45 g/L, com tensões críticas de 33,57 a 45,13 mN/m, enquanto a CMC do extrato de juá flutuou entre 0,08 e 0,55 g/L e a tensão correlacionada entre 33,94 e 46,52 mN/m.

Para melhor avaliar a influência dos três fatores citados e suas interações sobre a CMC dos extratos de juá e sisal no planejamento experimental composto central, foi necessária a utilização de ferramentas estatísticas fornecidas pelo programa STATISTICA 6.0.

Tabela 14 – Resultados da análise da variação de CMC e tensão crítica dos extratos de juá e sisal utilizando planejamento composto central descrito na Tabela 5

Ensaios	Juá		Sisal	
	CMC (g/L)	Tensão crítica (mN/m)	CMC (g/L)	Tensão crítica (mN/m)
1	0,27 ± 0,03	37,28 ± 1,73	0,40 ± 0,08	41,75 ± 0,73
2	0,18 ± 0,02	41,53 ± 0,43	0,25 ± 0,05	39,63 ± 2,47
3	0,33 ± 0,03	38,77 ± 1,25	0,45 ± 0,09	41,46 ± 3,84
4	0,19 ± 0,02	43,95 ± 0,44	0,40 ± 0,08	40,78 ± 1,04
5	0,32 ± 0,03	35,87 ± 0,14	0,37 ± 0,07	39,43 ± 1,08
6	0,25 ± 0,03	36,15 ± 0,60	0,28 ± 0,06	35,53 ± 0,26
7	0,40 ± 0,04	34,96 ± 0,84	0,27 ± 0,06	40,20 ± 2,28
8	0,39 ± 0,04	38,21 ± 0,43	0,15 ± 0,03	37,14 ± 1,09
9	0,08 ± 0,01	46,52 ± 1,84	0,29 ± 0,06	45,13 ± 0,80
10	0,31 ± 0,03	33,94 ± 0,99	0,24 ± 0,05	33,57 ± 2,49
11	0,39 ± 0,04	34,33 ± 1,14	0,23 ± 0,05	43,61 ± 1,37
12	0,53 ± 0,05	38,85 ± 0,70	0,30 ± 0,06	41,66 ± 1,04
13	0,55 ± 0,05	35,35 ± 0,74	0,44 ± 0,08	42,45 ± 2,62
14	0,22 ± 0,02	43,52 ± 1,61	0,23 ± 0,05	40,84 ± 0,65
15 (C)	0,12 ± 0,01	37,71 ± 0,88	0,34 ± 0,07	36,50 ± 1,81
16 (C)	0,21 ± 0,02	35,96 ± 0,71	0,27 ± 0,05	37,99 ± 1,00
17 (C)	0,17 ± 0,02	36,93 ± 0,71	0,31 ± 0,06	40,06 ± 0,45

Primeiramente, depois de selecionado o modelo estatístico mais completo (nesse caso, possui termos lineares, quadráticos e a interação dos termos lineares), gera-se a tabela de ANOVA (Análise de Variância Univariável), que fornece duas informações como o R^2 (coeficiente de determinação), que permite verificar o ajuste do modelo; e o p-valor (probabilidade de significância), que é função de alguns parâmetros da tabela da ANOVA como SS (soma dos

quadrados da variação dos termos), df (grau de liberdade), MS (quadrados médios), MS Erro Puro (quadrado médio devido aos erros de ajuste) e F (parâmetro relacionado a distribuição de Fisher-Snedecor), e indica quais termos são relevantes (estatisticamente significativos), ocorrendo quando o p-valor do termo for inferior ao α (nível de significância) de 0,05 (Calado & Montgomery, 2003; Rodrigues & Iemma, 2005).

Com a tabela de ANOVA gerada, e percebidos quais termos são estatisticamente signficativos, um ajuste ao modelo é realizado, retirando os termos irrelevantes, e por conseqüência uma nova tabela é produzida com R^2 mais próximo de 1 do que o anterior. Como este planejamento foi realizado para investigar qual a influência dos fatores externos na CMC das saponinas, o nível de significância foi aumentado para 0,1, permitindo que termos marginalmente significativos (p-valor entre 0,05 e 0,1) sejam mantidos no modelo final. Nas Tabelas 15 e 16, os modelos completo e ajustado da ANOVA podem ser observadas para as CMCs dos extratos de juá e sisal, respectivamente.

Tabela 15 - ANOVAs com modelo completo e ajustado para variação do CMC do extrato de juá

R-sqr=,88509; Adj:,73735

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) T (°C) L	0,041213	1	0,041213	18,34612	0,050421
T (°C) Q	0,000242	1	0,000242	0,10741	0,774236
(2) pH L	0,020005	1	0,020005	8,88301	0,096547
pH Q	0,087347	1	0,087347	37,78551	0,024827
(3 %Sal L	0,054398	1	0,054398	24,15462	0,038994
%Sal Q	0,043956	1	0,043956	19,51828	0,047605
1L x 2L	0,002982	1	0,002982	1,32395	0,368884
1L x 3L	0,002527	1	0,002527	1,12191	0,400528
2L x 3L	0,000031	1	0,000031	0,01358	0,917886
Falta de Ajuste	0,027278	5	0,005456	2,42249	0,317545
Erro Puro	0,004504	2	0,002252		
SS Total	0,276585	16			

Ajuste

R-sqr=,86419; Adj:,80246

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) T (°C) L	0,041316	1	0,041316	18,34612	0,050421
(2) pH L	0,020005	1	0,020005	8,88301	0,096547
pH Q	0,098863	1	0,098863	43,89906	0,022030
(3 %Sal L	0,054398	1	0,054398	24,15462	0,038994
%Sal Q	0,050208	1	0,050208	22,29424	0,042046
Falta de Ajuste	0,033059	9	0,003673	1,63104	0,437174
Erro Puro	0,004504	2	0,002252		
SS Total	0,276585	16			

No caso da CMC das saponinas de juá, os termos linear e quadrático da concentração salina e do pH, além do termo linear da temperatura se mostraram relevantes e incluídos no modelo final. Pela Figura 20, foi observado que em pH neutro, temperatura próxima da ambiente (25-30ºC) e concentração salinas entre 2 e 4% p/v, há maior redução nos valores de CMC.

Este comportamento diretamente proporcional entre a CMC e a temperatura indica características iônicas das saponinas do juá, o que corresponde aos dados de literatura que cita a presença de grupos sulfatos. No caso do pH, a variação do CMC está correlacionada ao pKa dos grupos ácidos presentes na saponina, podendo gerar repulsão eletrostática entre os grupos iônicos, e assim, aumentando a CMC. Já na presença de NaCl, essa repulsão eletrostática é diminuída, e os surfactantes iônicos tem sua CMC reduzida (Mitra & Dungan, 1997).

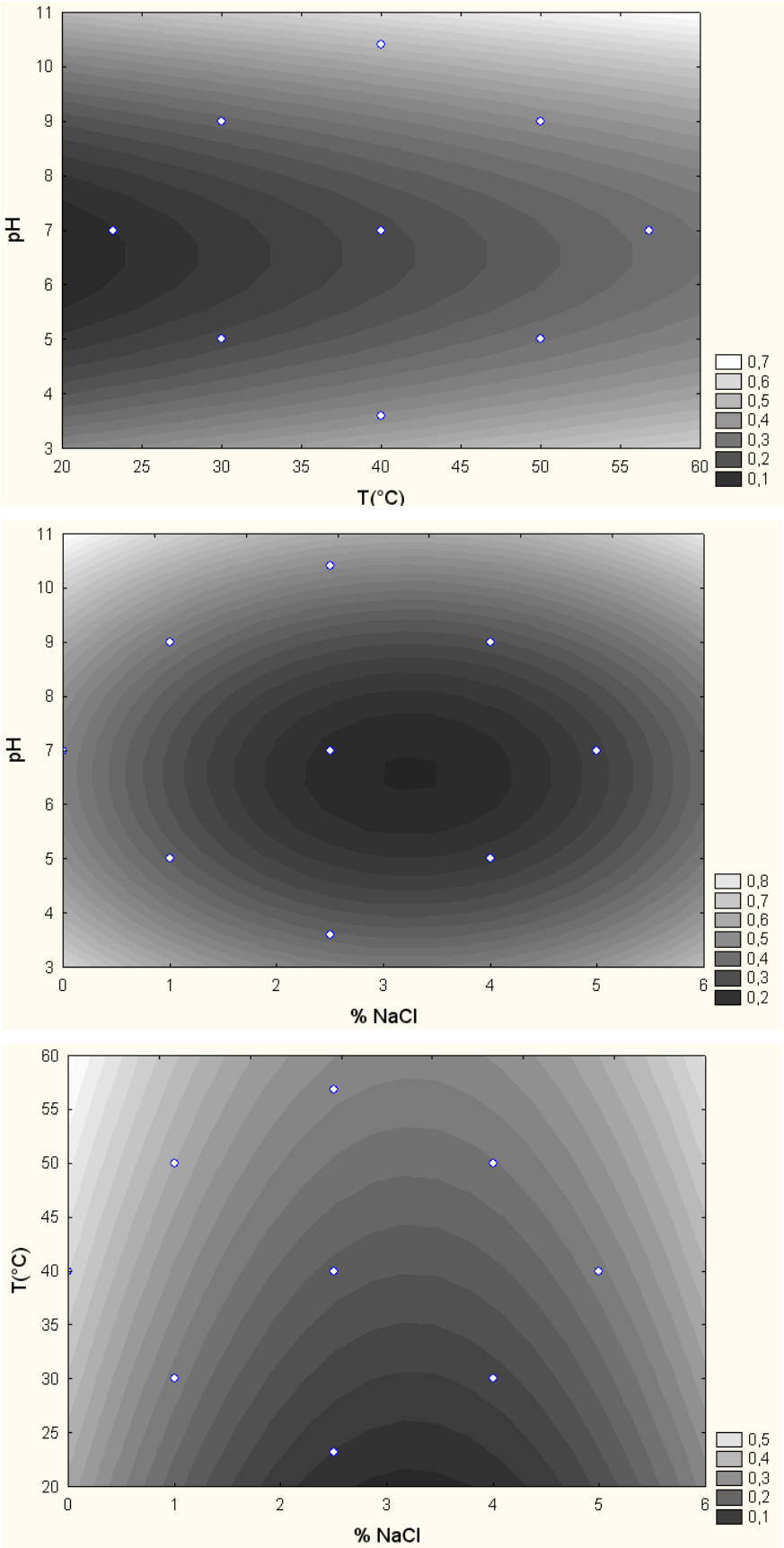


Figura 20 - Curvas de contorno fixadas no ponto médio: efeitos de pH, temperatura e concentração salina sobre o CMC das saponinas de juá

Tabela 16 - ANOVAs com modelo completo e ajustado para variação do CMC do extrato de sisal

R-sqr=,85726; Adj:,67373

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) T (°C) L	0,018734	1	0,018734	16,71748	0,054935
T (°C) Q	0,000435	1	0,000435	0,38854	0,596679
(2) pH L	0,000575	1	0,000575	0,51302	0,548175
pH Q	0,000825	1	0,000825	0,73665	0,481174
(3) %Sal L	0,042149	1	0,042149	37,61254	0,025571
%Sal Q	0,003352	1	0,003352	2,99162	0,225837
1L x 2L	0,023283	1	0,023283	20,77703	0,044912
1L x 3L	0,000011	1	0,000011	0,00971	0,930483
2L x 3L	0,000449	1	0,000449	0,40086	0,591386
Falta de Ajuste	0,013030	5	0,002606	2,32561	0,327514
Erro Puro	0,002241	2	0,001121		
SS Total	0,106988	16			

Ajuste

R-sqr=,84369; Adj:,77264

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) T (°C) L	0,018734	1	0,018734	16,71748	0,054935
(2) pH L	0,000575	1	0,000575	0,51302	0,548175
(3) %Sal L	0,042149	1	0,042149	37,61254	0,025571
%Sal Q	0,005524	1	0,005524	4,92962	0,156564
1L x 2L	0,023283	1	0,023283	20,77703	0,044912
Falta de Ajuste	0,014482	9	0,001609	1,43597	0,476643
Erro Puro	0,002241	2	0,001121		
SS Total	0,106988	16			

Para a CMC das saponinas de sisal, o termo linear da concentração salina em conjunto com a interação dos termos lineares de pH e temperatura foram estatisticamente significativos, sendo também o termo linear da temperatura como marginalmente significativo. O termo linear do pH não foi retirado do modelo devido a sua interação ser importante para este. Já a retirada do termo quadrático da concentração salina provocou uma diminuição no R^2 ajustado, sendo por isso mantido no modelo final. Pela Figura 21, foi observado que, em pH entre 3 e 4 associado a temperatura próxima da ambiente, pH entre 10 e 11 em conjunto com temperaturas entre 55 e 60ºC e concentração salinas entre 2 e 6%, há maior redução nos valores de CMC.

Alguns trabalhos, como o de Han e Kim (1984) e de Xiong e colaboradores (2008), estudaram a influência da concentração salina (9, 11,7 e 29,2 g/L) sobre ginsenosídeos, detectando diminuição da CMC e da tensão superficial, além da precipitação das saponinas. Sua justificativa foi que a presença de íons afeta a hidratação do surfactante em solução, diminuindo a sua solubilidade. Este fato é também corroborado por Mitra & Dungan (1997) ao estudar as saponinas de quilaia, mas ao estudar os efeitos de temperatura e pH verificaram que estes influenciavam, aumentando a CMC. Nenhum destes trabalhos, entretanto, demonstrou simultaneamente os efeitos destes três fatores, não permitindo a visualização das interações entre estes e qual sua real relevância para a CMC das saponinas.

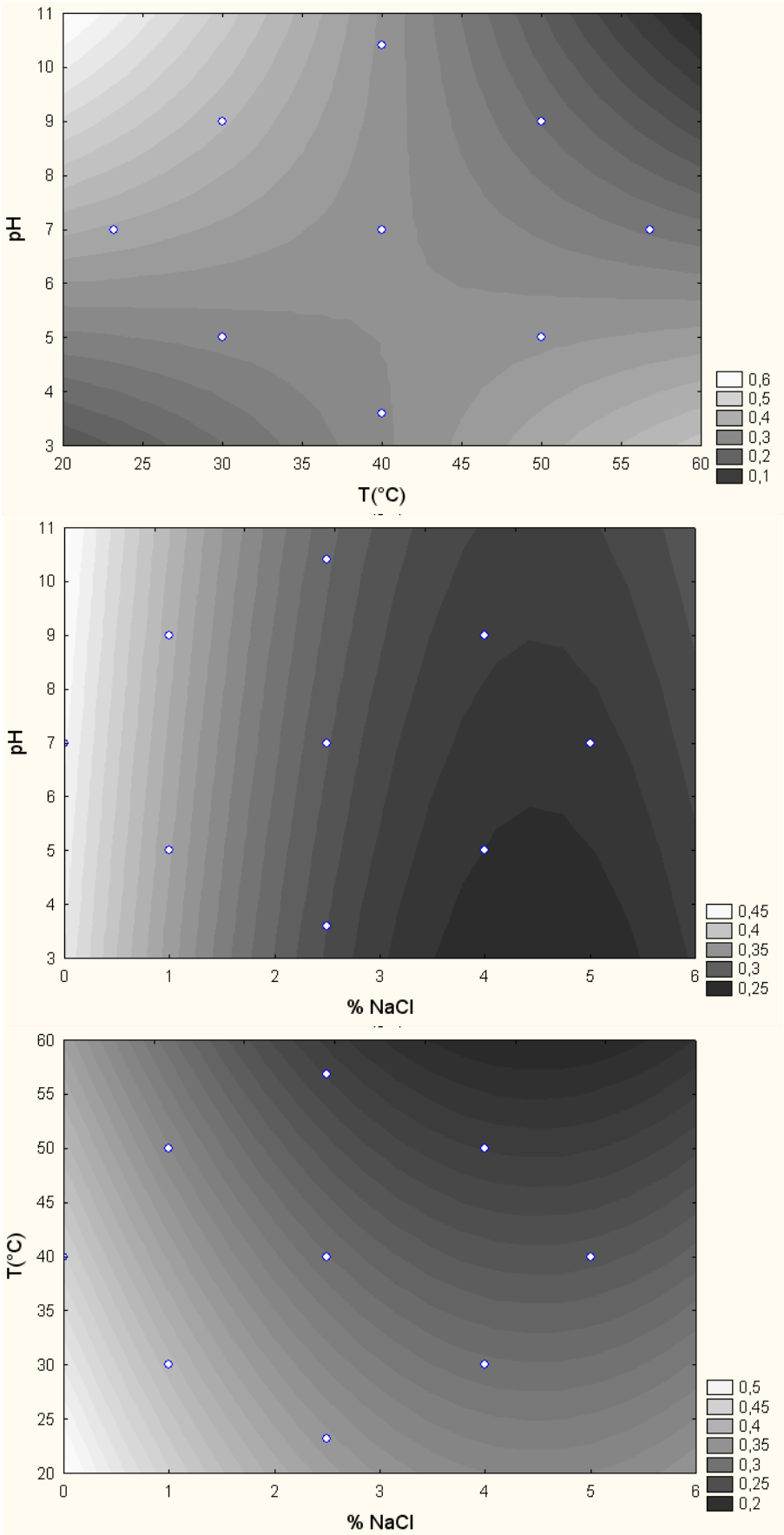


Figura 21 - Curvas de contorno fixadas no ponto médio: efeitos de pH, temperatura e concentração salina sobre o CMC das saponinas de sisal

Com os modelos ajustados, podemos definir as expressões relativas às CMCs das saponinas de juá e de sisal a partir dos coeficientes da curva de regressão, em termos das variáveis originais. Nas equações 1 e 2, T é a temperatura, pH é o próprio e S é a concentração salina (em %NaCl).

$$CMC_{JUÁ} = 1{,}174 + 0{,}0055T - 0{,}288pH + 0{,}022pH^2 - 0{,}186S + 0{,}029S^2 \quad (1)$$

$$CMC_{SISAL} = -0{,}188 + 0{,}015T + 0{,}111pH - 0{,}084S + 0{,}009S^2 - 0{,}0027(T \times pH) \quad (2)$$

Comparando os dados calculados pelos modelos ajustados com os dados experimentais no ponto central (T = 40ºC, pH = 7 e % Sal = 2,5), foram obtidos os valores de CMC de 0,17 e 0,28 g/L para as saponinas de juá e de sisal, respectivamente, que estão dentro das faixas de valores determinados experimentalmente.

4.2.2) Atividade Antioxidante

Antioxidantes naturais geralmente estão associados a compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, e vitaminas, como ácido ascórbico, tocoferóis e carotenóides. Por isso, como há compostos fenólicos nos extratos de juá e de sisal, foi realizado o teste de atividade antioxidante tanto no extrato bruto (saponinas + compostos fenólicos) quanto no extrato purificado (saponinas), como observado na Tabela 17.

Tabela 17 – Atividade Antioxidante dos extratos de juá e de sisal

Amostras	EC50 (µg/mL)
Ácido ascórbico	5,17
Acido tânico	4,37
Galato 3-epigalocatequina (EGCG)	4,47
Diosgenina	>10000
Juá Saponinas + Fenóis	664
Juá Saponinas	>10000
Sisal Saponinas + Fenóis	1452
Sisal Saponinas	>10000

Ambos os extratos apresentam valores de EC50 muito altos, quer dizer, necessitam de muita quantidade de extrato para se ligar aos radicais livres em solução, indicando um poder antioxidante baixo. As saponinas do sisal e do juá representaram 25% da atividade antioxidante dos extratos brutos correspondentes. Comparando a atividade antioxidante da diosgenina com as das saponinas de juá e de sisal na concentração de 10000 µg/mL, estas perderam cerca de 35 e 43% da atividade. Isso deve ter ocorrido provavelmente pelas saponinas terem a hidroxila do C-3 glicosilada, o que não acontece na diosgenina que é uma aglicona.

Poucas pesquisas relataram atividade antioxidante de saponinas utilizando métodos variados de análise, o que dificulta a comparação. Como exemplo, há os trabalhos de Huong *et al* (1998) que investigaram a atividade antioxidante das saponinas do ginseng (*Panax ginseng*); Sur e colaboradores (2001), que reportaram a atividade antioxidante de duas saponinas extraídas das raízes de chá (*Camellia sinensis*); Gulçin *et al* (2004), compararam vários métodos de análise de atividade antioxidante das saponinas de hera com EC50 variando entre 41 e 82 μg/mL; Li *et al* (2009), que relataram a variação da atividade antioxidante de saponinas da semente de chá com o pH, que ao ser mais básico aumenta a atividade antioxidante; Chen *et al* (2010), que determinaram atividade antioxidante de extratos de *Sapindus mukorossi*, rico em saponinas, entre 5 e 34%, em uma concentração de 10μg/mL; e Xi *et al* (2008) obtiveram, utilizando extratos brutos butanólicos de várias plantas chinesas, os seguintes valores de EC50 (μg/mL): *Acanthopanax senticosus*, 28,12; *Aralia taibaiensis*, 13,25; *Ophiopogon japocicus*, 92,68; *Panax notoginseng*, 37,84; *Polygonatum odoratum*, 36,39 e *Poria cocos*, 33,61.

4.2.3) Complexação com Colesterol

Interações de saponinas com esteróis são responsáveis pelas várias atividades biológicas das saponinas, como atividade hemolítica e antifúngica. Além disso, as saponinas tem apresentado um efeito hipocolesterolêmico em animais e humanos, inibindo sua absorção no intestino pela formação de complexos destas com colesterol e sais biliares (Cheeke, 2000; Shi *et al*, 2004). Por isso, foi testado a formação de complexos insolúveis de saponinas de juá e de sisal com colesterol, mas em nenhuma concentração de saponina testada foi observada redução da quantidade de colesterol, alcançando uma relação em massa saponina/colesterol de 100. Mitra & Dungan (2001) corroboraram a idéia da solubilização do colesterol pelas saponinas invés da formação de um complexo insolúvel, indicando uma relação saponina/colesterol maior que 500.

Micich *et al* (1992) propôs a utilização de polímeros ligados covalentemente a saponinas em leitos fixos para remoção de colesterol de manteigas solubilizadas em hexano, e precisou de uma relação em massa saponina/colesterol de até 211. Neste trabalho eles utilizaram digitonina, um glicosídeo cardiotônico, e tomatina, um alcalóide esteroidal, ambos tóxicos, mas que eram considerados tipos de saponinas na época. Sundfeld *et al* (1993) testaram a remoção de colesterol de manteiga com saponinas de quilaia em uma concentração de 400 g/L, tendo por isso um relação saponina/colesterol de 166. Nas condições reacionais, utilizando uma solução de saponinas em pH 4,5, adicionados de 25% p/v de Celite 545 a 280 rpm, 55ºC, 30 mim conseguiram a remoção de 75% do colesterol. Neste experimento, a sinergia de Celite e saponina de quilaia foi que proporcionou os melhores resultados, pois, ainda com o pH 4,5, apenas com o Celite, a remoção de colesterol não ocorre, e só com a solução de saponinas, a remoção é de 16%.

4.2.4) Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de difusão por ágar é normalmente utilizado para avaliações qualitativas de atividade antimicrobiana, apesar de alguns trabalhos indicarem o uso de modelos não-lineares para determinação de CIM associando diâmetro da zona de inibição e coeficiente de difusão do antibiótico no ágar (Bonev *et al*, 2008). Mesmo assim, o método de diluição sucessivas com adição de um corante que indique viabilidade celular é o mais utilizado para uma análise quantitativa (Andrews, 2001).

Poucas saponinas apresentam atividade antimicrobiana, um exemplo disso é que, das 38 plantas estudadas nesta tese, apenas 7 apresentaram alguma atividade antimicrobiana, e mesmo assim em concentrações elevadas (50 mg/mL, ver Anexo, Figura 73). Na determinação da concentração mínima inibitória dos extratos butanólicos e das saponinas de juá e de sisal, foram utilizados microorganismos recomendados por associações internacionais que regulamentam formulações cosméticas (Geis, 2006), incluindo apenas a *Salmonella* por ser uma bactéria comum em contaminações de alimentos (Tabela 18).

Tabela 18 – Concentração inibitória mínima das saponinas de juá e de sisal

Espécies	Anfotericina B (µg/mL)	Juá (µg/mL)	Sisal (µg/mL)
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	-	> 12500	> 12500
Escherichia coli ATCC 8739	-	> 12500	> 12500
Staphylococcus aureus ATCC 6538	-	> 12500	> 12500
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	> 12500	> 12500
Salmonella choleraesuis ATCC 10708	-	> 12500	> 12500
Candida albicans ATCC 10231	0,19	156	> 12500
Aspergillus niger ATCC 16404	0,38	312,5	> 12500

Na literatura, Alviano e colaboradores (2008) relataram atividade antibacteriana de um extrato aquoso de juá com CIM variando de 1,0 a 16,0 mg/mL, e Cruz e colaboradores (2007) identificaram atividade antifúngica de extrato similar de juá com CIM variando de 6,25 a 400 µg/mL. Por ser um extrato aquoso, outros constituintes também devem ter sidos extraídos, como os compostos fenólicos, alcalóides e triterpenos, que também apresentam atividade antimicrobiana (Cushnie & Lamb, 2005).

Em relação ao sisal a falta de atividade antibacteriana também foi relatada por Santos *et al* (2009) que testaram vários micro-organismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*, utilizando 1 mg/mL, e apenas contra levedura teve resultado, alcançando um CIM de 390 µg/mL, utilizando o resíduo líquido do sisal e um extrato hidroalcoolico (3/7), indicando provavelmente que a aglicona tenha sido responsável pela ação antifúngica.

4.2.5) Composição de Saponinas

Vários métodos cromatográficos, como cromatografia em camada fina bidimensional (TLC-2D) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), podem ser utilizados para determinação da composição de saponinas de uma matriz vegetal, porém é sempre necessária a utilização de padrões e o uso de métodos de detecção diferentes do UV-Vis (ultravioleta-vísivel), já que a ausência de cromóforos em saponinas, só permite sua detecção entre 200 e 210 nm, o que limita os solventes disponíveis para fase móvel (Oleszek, 2002; Oleszek & Bialy, 2006). Assim, o uso de técnicas hifenadas, associando HPLC com espectrometria de massas, ou até espectrômetros de massas em sequência (MS/MS), começou a ser mais freqüente para análise de saponinas (Van Setten *et al*, 1998; De Combarieu *et al*, 2002; Liu *et al*, 2004; Kite *et al*, 2007; Montoya *et al*, 2009; Sagratini *et al*, 2009; Foubert *et al*, 2010; Montoro *et al*, 2010; Wu *et al*, 2010).

A espectrometria de massas é baseada na ionização de um composto, que em seguida é separado com base da razão massa/carga (m/z), e o número de íons que correspondem a cada unidade de m/z é registrado na forma de um espectro. Na espectrometria de massas em sequência MS/MS, um íon é selecionado na fragmentação inicial, e se fragmenta novamente, gerando íons filhos, obtendo informações estruturais da molécula, permitindo assim o uso de amostras complexas sem uso prévio de técnicas cromatográficas (Silverstein *et al*, 2006). Na literatura foram identificadas algumas estruturas de saponinas de sisal e de juá (Tabela 19, Figuras 22 e 23), que foram tomadas como base na busca da composição de saponinas por espectrometria de massas.

Tabela 19 – Dados de m/z de saponinas de juá e de sisal

Plantas	Saponinas	m/z	Referências
Juá (1)	Jujubogenina 3-O-α-L-arabinofuranosil-(1→2)-[β-D-glucopiranosil (1→3)]-α-arabinopiranosídeo	937 $[M(C_{46}H_{74}O_{17})+ K]^+$, ou 921,4 $[M(C_{46}H_{74}O_{17})+ Na]^+$	Higuchi *et al*, 1984; Schühly *et al*, 2000
Juá (2)	Jujubogenina 3-O-α-L-arabinofuranosil-(1→2)-[β-D-glucopiranosil-4-O-sulfato (1→3)]-α-arabinopiranosídeo	1055 $[M(C_{46}H_{73}O_{17}\ SO_3K)+ K]^+$	Higuchi *et al*, 1984
Juá (3)	Jujubogenina 3-O-α-L-arabinofuranosil-(1→2)-[β-D-glucopiranosil-4-O-sulfato (1→3)]-α-arabinopiranosídeo-3-Osulfato	1173 $[M(C_{46}H_{72}O_{17}\ 2SO_3K)+ K]^+$	Higuchi *et al*, 1984
Juá (4)	Joazeirosídeo A	689,0 $[M(C_{37}H_{63}O_{10})+ Na]^+$	Schühly *et al*, 2000
Juá (5)	Joazeirosídeo B	1115,4 $[M(C_{53}H_{88}O_{23})+ Na]^+$	Schühly *et al*, 2000
Juá (6)	Lotosídeo A	1101,3 $[M(C_{52}H_{86}O_{23})+ Na]^+$	Schühly *et al*, 2000
Sisal (1)	Dongnosídeo E	1033 $[M - H]^-$	Ding *et al*, 1989
Sisal (2)	Dongnosídeo D	1165 $[M - H]^-$	Ding *et al*, 1989
Sisal (3)	Dongnosídeo C	1179 $[M - H]^-$	Ding *et al*, 1989
Sisal (4)	Dongnosídeo B	1209 $[M - H]^-$	Ding *et al*, 1993

Sisal (5)	Dongnosídeo A	1341 $[M - H]^-$	Ding *et al*, 1993
Sisal (6)	(25*S*)-26-(β-D-glucopiranosil)-22-ξ-hidroxifurost-12-ona-3β-il-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[*O*-b-D-glucopiranosil-(1→2)]-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	1409,5 $[M + Na]^+$	Zou *et al*, 2006
Sisal (7)	(25*S*)-26-(β-D-glucopiranosil)-22-ξ-hidroxifurost-5-en-12-ona-3β-il-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[*O*-b-D-glucopiranosil-(1→2)]-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosídeo	1407,4 $[M + Na]^+$	Zou *et al*, 2006
Sisal (8)	Hecogenina 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→3)-β-D-xilopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→3)]-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosideo	1349,6 $[M + Na]^+$	Chen *et al*, 2010
Sisal (9)	Hecogenina 3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→3)]-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosideo	1048,1	Chen *et al*, 2010
Sisal (10)	Neotigogenina 3-O-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil-(1→3)]-β-Dglucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosideo	1365,6 $[M + Na]^+$	Chen *et al*, 2010
Sisal (11)	Cantalasaponina 1	773,9	Chen *et al*, 2010
Sisal (12)	Poliantosídeo E	1542,6	Chen *et al*, 2010

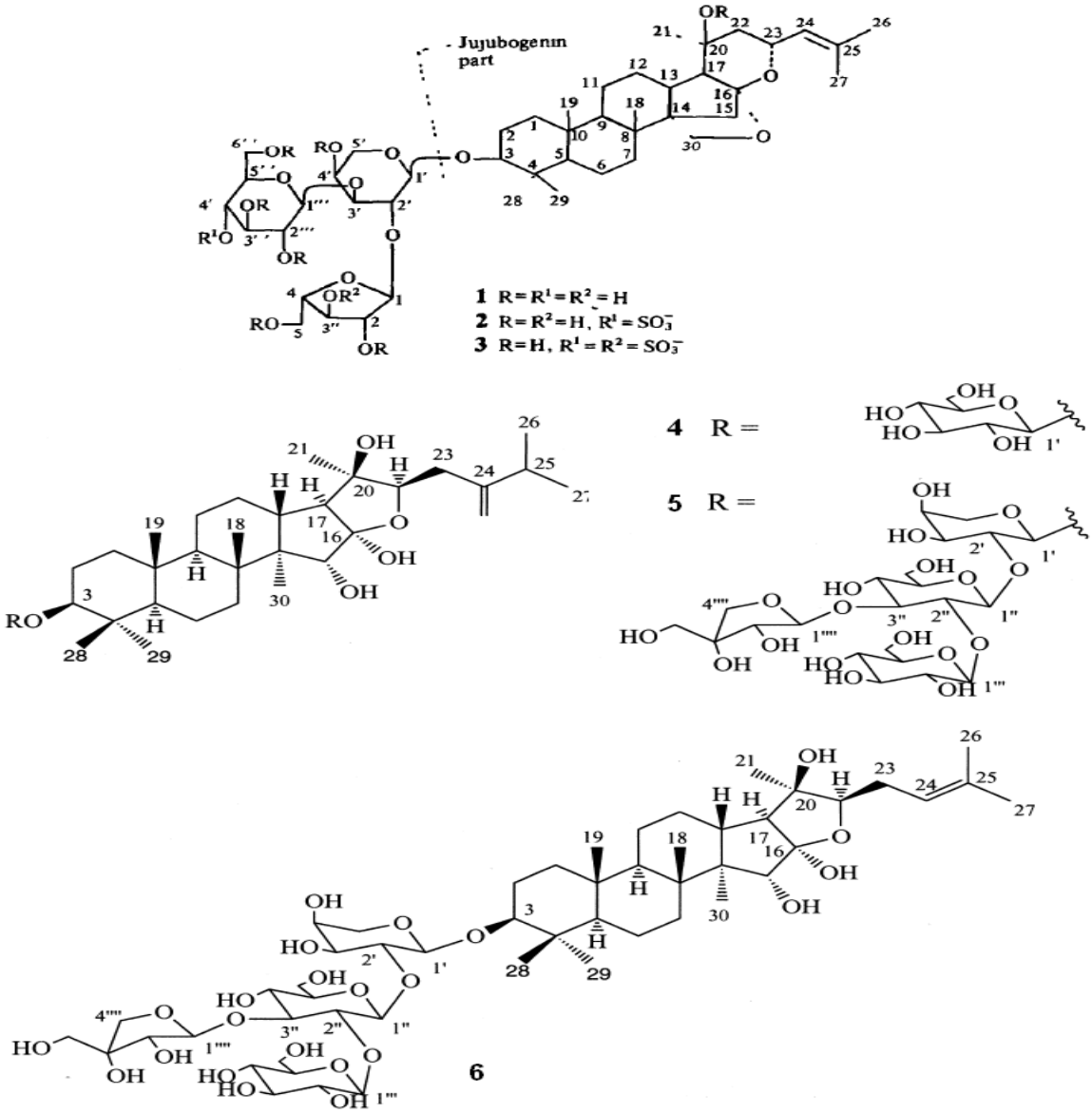
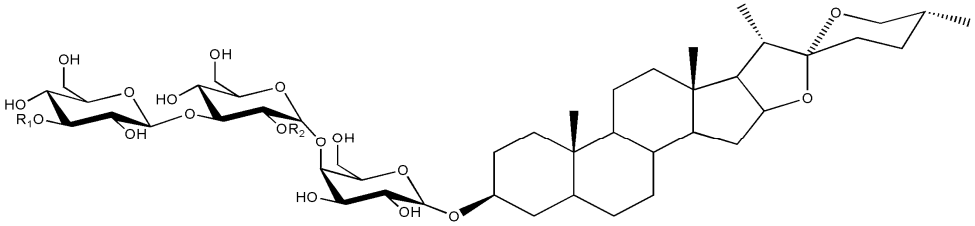
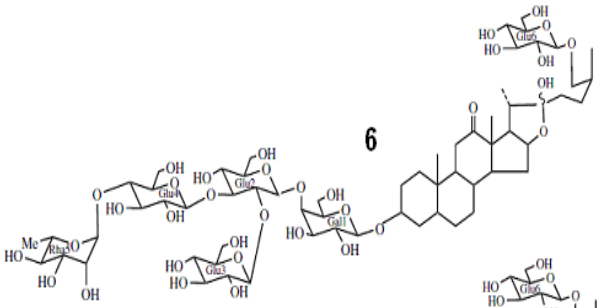
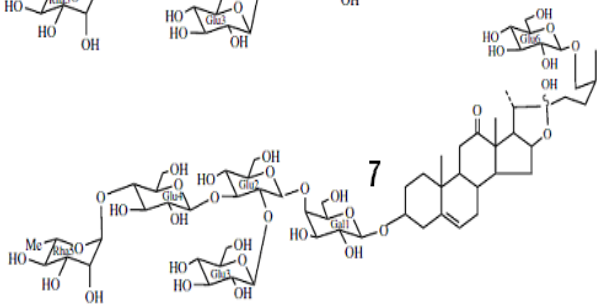


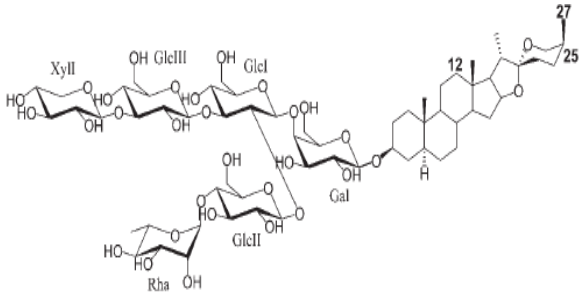
Figura 22 – Saponinas do juá (Tabela 19)

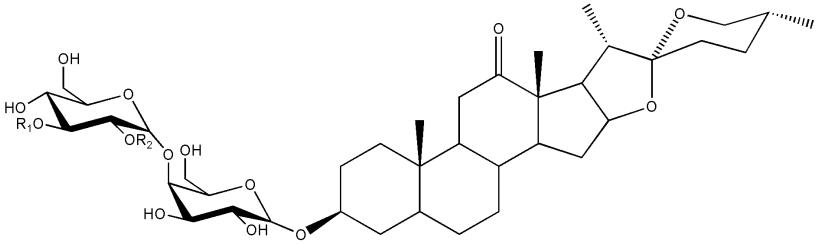


	R_1	R_2		R_1	R_2
1	H	Xilose	4	H	Ramnose (1-->4)Glicose
2	H	Xilose (1-->3)Xilose	5	Xilose	Ramnose (1-->4)Glicose
3	H	Ramnose (1-->4)Xilose			

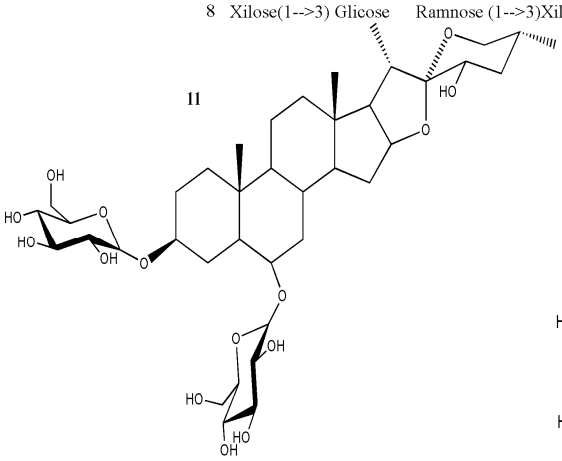








	R_1	R_2		R_1	R_2
8	Xilose(1-->3) Glicose	Ramnose (1-->3)Xilose	9	Xilose	Glicose



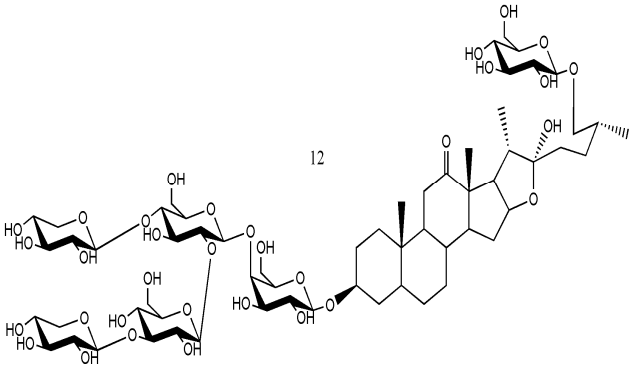


Figura 23 – Saponinas do sisal (Tabela 19)

A partir do íon molecular (M), foram simuladas todas as possíveis degradações das saponinas, removendo os açúcares um por um, até sobrar a aglicona, que neste trabalho, foi tomada como exemplo e padrão a diosgenina (Figura 24).

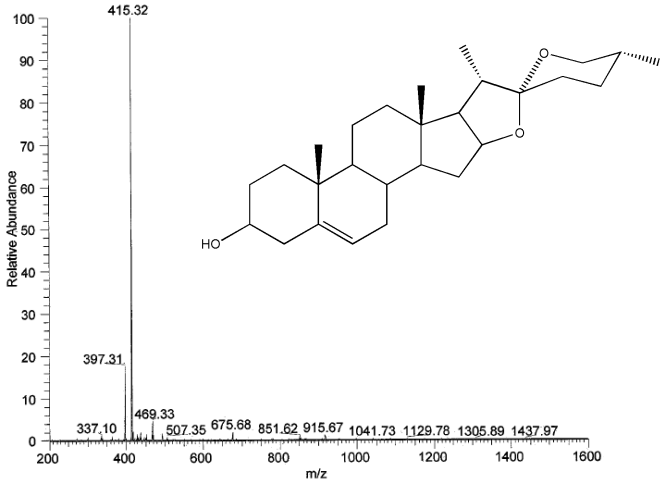


Figura 24 – Espectro de massas da diosgenina

Para melhor compreensão, foram gerados espectros de massas tanto no modo positivo como no negativo. Durante a ionização por "*electrospray*", três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares (M+•) ou (M–•), a partir de reações redox; moléculas protonadas/desprotonadas (íons quasi-moleculares, $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), a partir de reações ácido/base; e moléculas cationizadas ou anionizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou $[M+Cl]^-$), por coordenação com os íons (Crotti *et al*, 2006). Assim, dados de m/z que apresentarem uma variação de 1, 23, 32 e 39 pode resultar da presença de H, Na, CH_3OH e K, respectivamente.

Os espectros de massa no modo negativo das saponinas do juá são vistos na Figura 25. No ESI (-), a faixa de m/z 470 até 510 indicaria a hidrólise da saponinas, formando as agliconas, e m/z 560 até 940 seria a hidrólise parcial das saponinas. Assim, foi verificado o pico m/z 455,35 pode representar a ebelin lactona, um derivado da hidrólise ácida da jujubogenina, e o pico m/z 471,35 foi identificado como a jujubogenina. Os demais picos estão todos na região acima de m/z 900 apontando para picos de saponinas, onde entre m/z 900 e 1100 podem estar as saponinas descritas na literatura, como o pico m/z 977,44, a saponina 2 do juá, m/z 1077,42, a saponina 6 do juá, e m/z 1093,54, saponina 5 do juá; e acima de m/z 1100 são saponinas ainda desconhecidas.

Alguns picos foram selecionados para investigação da estrutura por MS/MS (ver Anexo, Figura 74): m/z 991, possivelmente presença de uma pentose e de um grupo sulfato;

m/z 1009, pelo menos uma pentose; m/z 1139, uma hexose, uma ramnose e um grupo sulfato; m/z 1167, uma ramnose e um grupo sulfato; m/z 1193, uma ramnose, pentose e um grupo sulfato.

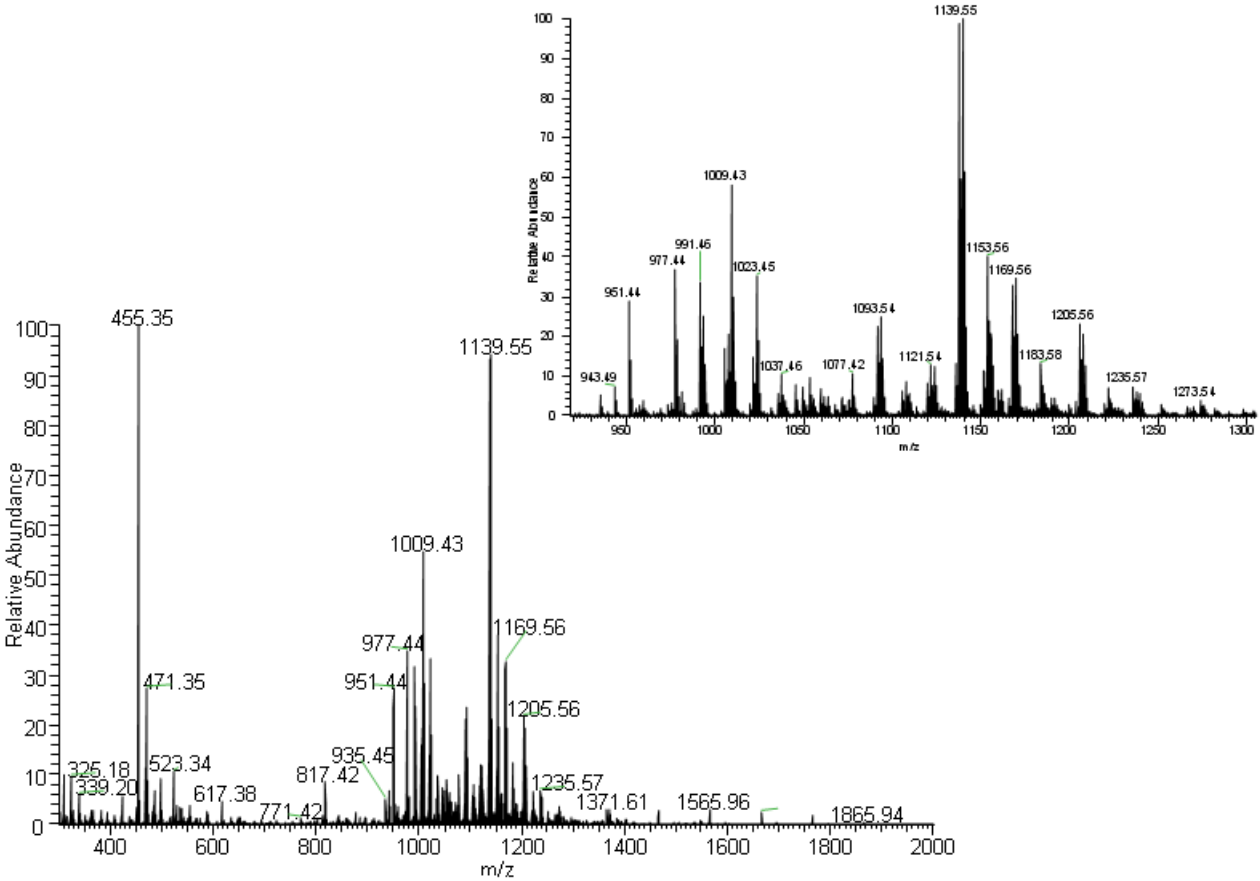


Figura 25 – Espectro de massa das saponinas do juá

Já no espectro de massa no modo negativo das saponinas de sisal (Figura 26), como há uma variedade de massas molares, as faixas de m/z são mais relativas, limitando apenas uma faixa inicial de m/z 400 até 440 indicando a geração das agliconas. Assim, foi verificado o pico m/z 771,42 como a saponina 11 do sisal (cantalasaponina 1); pico m/z 1047,50, pode ser associada a saponina 9 do sisal; pico m/z 1179,54, seria o dongnosídeo C; pico m/z 1193,56, pode ser identificado como o dongnosídeo A, sem xilose; pico m/z 1209,56, seria o dongnosídeo B; e pico m/z 1325,60 relativo a saponina 8 de sisal.

Alguns picos também foram selecionados para investigação da estrutura por MS/MS (ver Anexo, Figura 75), como m/z 771, 1047, 1193 e 1325, mas estes já foram correlacionados com os dados da literatura.

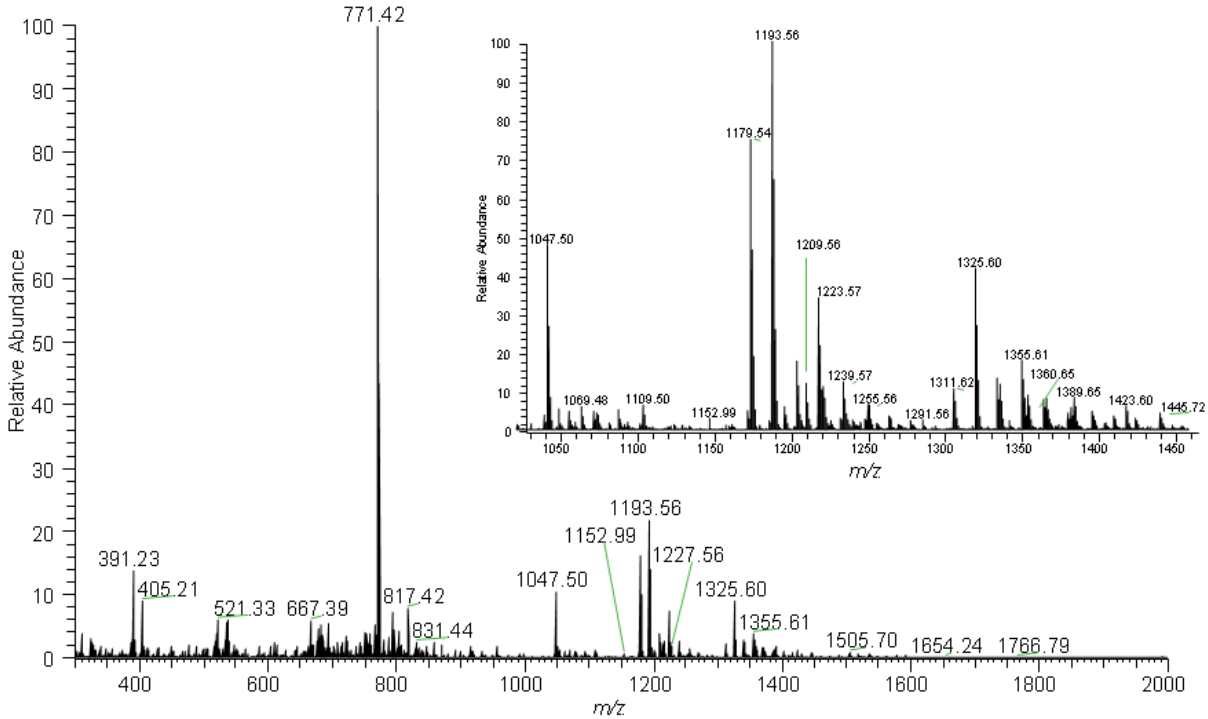


Figura 26 - Espectro de massa das saponinas do sisal

4.3) EXTRAÇÃO DE SAPONINAS

4.3.1) Extração com solventes orgânicos verdes

Como nesta etapa, a matéria-prima relacionada ao sisal foi substituída (do sisal inteiro cominuído para o resíduo mucilaginoso de sisal), foi determinado o teor de água e de saponinas neste resíduo e também no resíduo líquido de sisal, resultando em valores de 89,42 e 91,50% de água, e 0,92 e 2,44% de saponinas, respectivamente.

4.3.1.1) Avaliação da Composição do Solvente

Para extração das saponinas do juá e do sisal foram utilizados água e etanol 95% como solventes verdes, variando a proporção entre estes de 0 a 100% v/v etanol, como é mostrado pela Figura 27 e 28, e avaliando o teor de saponinas e fenóis totais obtidos.

A maioria dos trabalhos utiliza uma faixa de 40 a 80% de etanol para extração de saponinas, valores próximos ao encontrado neste trabalho, que variam de 25 a 85% de etanol, no caso do juá. Já para o resíduo mucilaginoso de sisal, muito das saponinas permaneceram no resíduo líquido de sisal, gerando um perfil diferente com maior extração de saponinaas em 30% de etanol e na faixa de 80 a 100% de etanol. A proporção escolhida nos dois casos foi de 30% de etanol, já que possui maior quantidade de água, o que favorece uma menor extração de fenóis e gera um menor custo com o solvente.

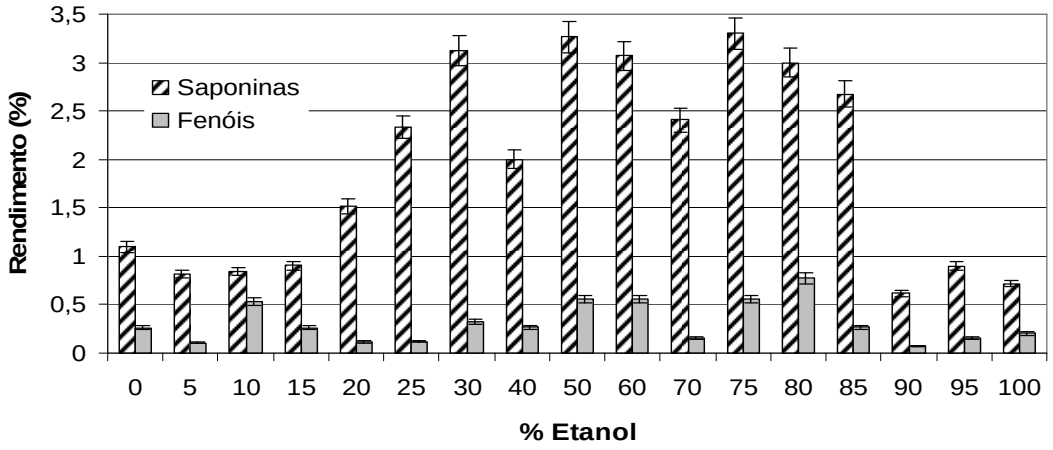


Figura 27 – Avaliação das proporções entre água e etanol na extração das saponinas do juá. Parâmetros fixos deste ensaio de extração: Relação matéria-prima/solvente de 1/5 (0,2); 50ºC; 200 rpm; 4 horas.

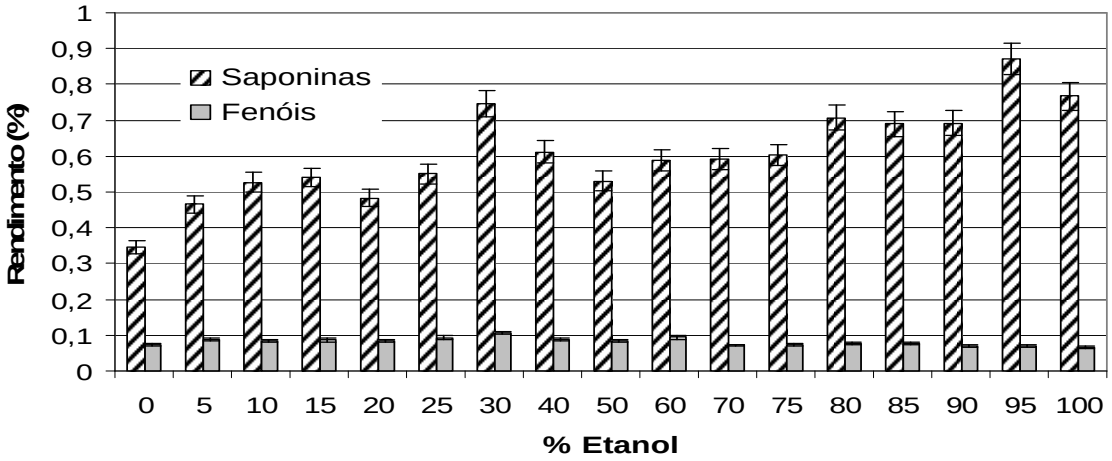


Figura 28 – Avaliação das proporções entre água e etanol na extração das saponinas do resíduo mucilaginoso de sisal. Parâmetros fixos deste ensaio de extração: Relação matéria-prima/solvente de 1/5 (0,2); 50ºC; 200 rpm; 4 horas.

4.3.1.2) Otimização da Extração por Planejamento Composto Central

Com a composição do solvente já escolhida, foi feito um planejamento experimental composto central para otimizar o rendimento na extração de saponinas do juá, avaliando parâmetros como temperatura (ºC), velocidade de agitação (rpm) e relação juá/solvente, com resultados visualizados na Tabela 20. Outras análises como fenóis e açúcares redutores totais foram realizadas para percepção se os parâmetros avaliados influenciam em uma maior extração de compostos fenólicos e se há degradação das saponinas.

Neste caso também foi necessária a utilização de ferramentas estatísticas fornecidas pelo programa STATISTICA 6.0, gerando uma tabela ANOVA que foi ajustada com a retirada de termos não estatisticamente significativos (Tabelas 20 e 21), que neste caso são os termos com p-valor acima de 0,05.

Tabela 20 – Comparação dos rendimentos (saponinas, fenóis e açúcar redutores totais) da extração de saponinas de juá e de sisal utilizando planejamento composto central

Ensaios	T (°C)	Agitação (rpm)	M.P./ Solvente	Rendimento Juá (%)			Rendimento Sisal (%)		
				Saponinas	Fenóis	Açúcar	Saponinas	Fenóis	Açúcar
1	38	140	0,20	2,52	0,66	1,36	0,27	0,020	0,47
2	38	140	0,30	3,68	0,52	1,05	0,32	0,024	0,57
3	38	260	0,20	2,55	0,76	1,35	0,45	0,023	0,45
4	38	260	0,30	3,33	0,56	1,06	0,74	0,022	0,47
5	62	140	0,20	1,22	0,65	0,90	0,91	0,030	0,43
6	62	140	0,30	1,78	0,57	0,74	1,04	0,030	0,53
7	62	260	0,20	1,30	0,77	1,18	0,83	0,034	0,46
8	62	260	0,30	1,68	0,17	0,74	0,91	0,028	0,29
9	30	200	0,25	2,74	0,20	1,28	0,93	0,025	0,49
10	70	200	0,25	0,92	0,21	0,87	0,92	0,037	0,63
11	50	100	0,25	1,62	0,58	1,28	0,89	0,036	0,51
12	50	300	0,25	4,48	0,64	1,09	1,03	0,036	0,61
13	50	200	0,166	1,17	0,61	1,34	1,20	0,031	0,66
14	50	200	0,334	1,92	0,91	1,51	0,64	0,023	0,57
15 (C)	50	200	0,25	3,06	0,59	1,00	0,79	0,025	0,58
16 (C)	50	200	0,25	3,00	0,58	1,18	0,75	0,028	0,64
17 (C)	50	200	0,25	2,94	0,60	1,30	0,85	0,030	0,76

A) Juá

Na Tabela 21 da ANOVA é verificado que o termo linear e quadrático da temperatura e da relação juá e solvente, além do termo linear da velocidade de agitação e da interação dos termos lineares de temperatura e relação juá e solvente são os mais relevantes para a extração de saponinas do juá, apesar do valor do R^2 ajustado demonstrar um baixo ajuste dos dados ao modelo. Pela Figura 29, foi observado que em temperaturas entre 25 e 50ºC, velocidades de agitação entre 200 e 300 rpm e relação juá/solvente de 0,2 a 0,35 há uma maior rendimento na extração das saponinas do juá. Os valores ótimos encontrados foram: temperatura, 38,8ºC; relação juá/solvente, 0,272 e agitação, 300 rpm.

Tabela 21 - ANOVA com modelo ajustado para extração de saponinas do juá

R-sqr=,80832; Adj:,69331

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura L	6,16177	1	6,161772	1627,662	0,000614
Temperatura Q	1,87833	1	1,878333	496,171	0,002009
(2) Agitação L	1,44372	1	1,443720	381,366	0,002612
(3) Juá/Solvente L	1,25762	1	1,257624	332,208	0,002997
Juá/Solvente Q	2,97001	1	2,970011	784,543	0,001272
1L x 3L	0,12707	1	0,127068	33,566	0,028524
Falta de Ajuste	3,06956	8	0,383695	101,355	0,009806
Erro Puro	0,00757	2	0,003786		
SS Total	16,05362	16			

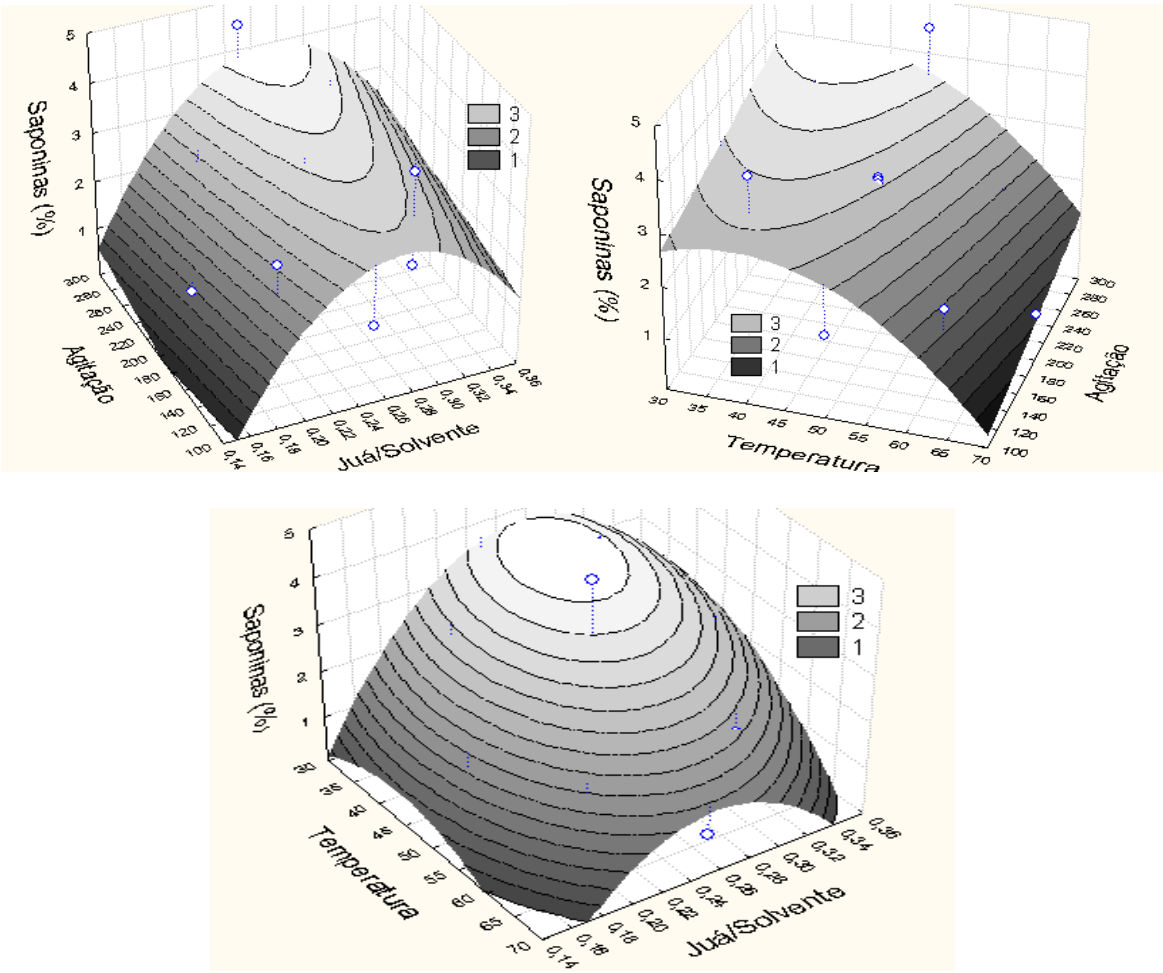


Figura 29 – Superfícies de resposta fixadas no ponto ótimo: efeitos de temperatura, relação juá/solvente e velocidade de agitação sobre a extração das saponinas de juá

Güçlü-Üstündag & Mazza (2007) comentam que temperaturas acima de 70ºC podem causar a diminuição no rendimento de extração de saponinas pela degradação destas, e que as relações de matérias-primas e solvente podem ser diretamente proporcionais ao rendimento de extração, variando de 0,067 a 0,167. A maior velocidade de agitação provavelmente causa maior aeração no extrato, gerando mais espuma, e elevando a extração das saponinas.

B) Resíduo Mucilaginoso de Sisal

Nesta Tabela 22, com os resultados obtidos para análise ANOVA do sisal é verificado que o modelo não tem ajuste com os valores experimentais, dado o valor do R^2 ajustado ser de 0,197. Com isso, foi decidido que as condições ótimas seriam as do ensaio com maior rendimento em saponinas, já que a variação nos teores de compostos fenólicos e açúcares redutores foram irrelevantes. Assim, as condições são: temperatura, 50ºC; relação sisal/solvente, 0,166 e agitação, 200 rpm.

Tabela 22 - ANOVA com modelo ajustado para extração de saponinas do sisal

R-sqr=,39758; Adj:,19677

Fatores	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura L	0,278598	1	0,278598	397,9965	0,002503
(2) Agitação L	0,028663	1	0,028663	40,9473	0,023562
(3) Sisal/Solvente L	0,011241	1	0,011241	16,0579	0,057002
1L x 2L	0,082013	1	0,082013	117,1607	0,008428
Falta de Ajuste	0,605463	10	0,060546	86,4947	0,011482
Erro Puro	0,001400	2	0,000700		
SS Total	1,007376	16			

4.3.1.3) Cinética da Extração

Com parâmetros de composição de solvente, temperatura, velocidade de agitação e relação matéria-prima/solvente definidos, foi feita a avaliação da cinética de extração, como pode ser visto nas Figuras 30 e 31. No caso do juá, com 2 horas de extração, a concentração de saponinas no extrato chega ao seu máximo, mantendo-se constante por mais 3 horas, tendendo a leve diminuição. Isso deve ocorrer muito provavelmente por geração de agliconas já que a concentração de açúcares aumenta com o tempo. A concentração de compostos fenólicos permanece praticamente inalterada durante as 24 h de extração.

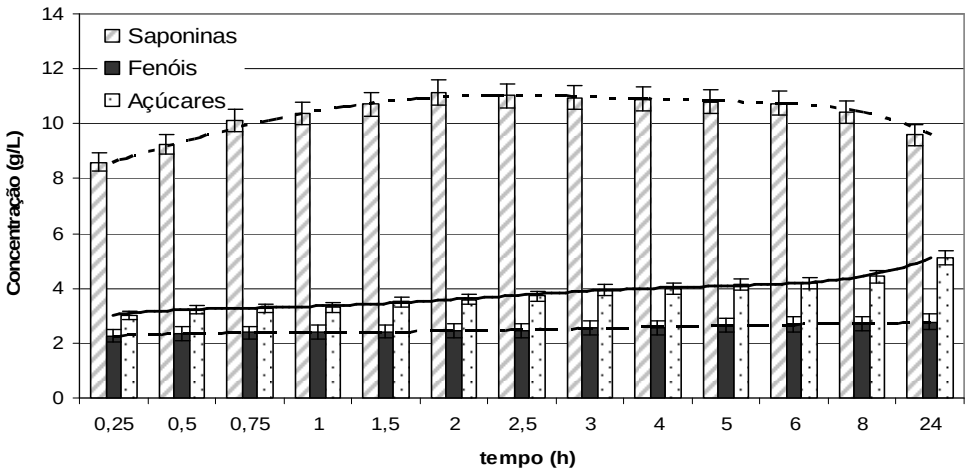


Figura 30 – Avaliação da cinética de extração de saponinas do juá

Já com o sisal, foram necessárias 4 horas de extração para que a concentração de saponinas no extrato chegasse ao seu valor máximo, também apresentando uma leve diminuição ao final das 24 h. Isso deve ocorrer muito provavelmente por geração de agliconas já que a concentração de açúcares aumenta com o tempo. A concentração de compostos fenólicos permanece praticamente inalterada durante as 24 h de extração.

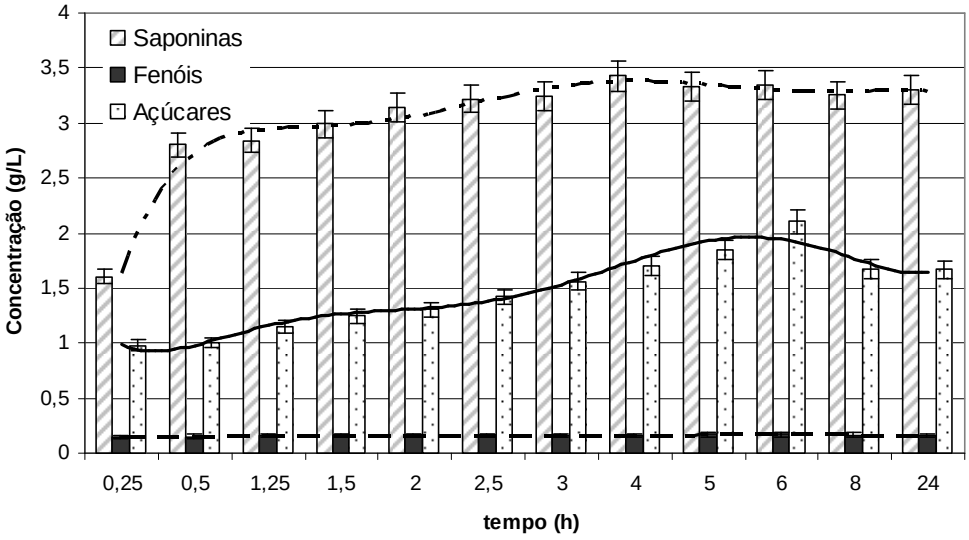


Figura 31 – Avaliação da cinética de extração de saponinas do sisal

Na Tabela 23, foi feita a comparação da extração orbital simples no tempo escolhido para cada matéria-prima com extração por Soxhlet tanto com água quanto com etanol 95%, sendo que a recuperação das saponinas, compostos fenólicos e açúcares redutores para extração por Soxhlet utilizando água foram considerados como 100% para padronização.

Tabela 23 – Comparação dos métodos de extração orbital simples e Soxhlet das saponinas de juá e de sisal

	Extração	Saponinas	Fenóis	Açúcares
Juá	Soxhlet Água	100,0	100,0	100,0
	Soxhlet Etanol	95,9	58,9	36,3
	Orbital Simples	45,6	42,9	91,4
Sisal	Soxhlet Água	100,0	100,0	100,0
	Soxhlet Etanol	94,5	55,6	91,4
	Orbital Simples	38,6	27,2	24,5

Tian e colaboradores (2008a) relataram a extração de ácido glicirrizico e glabridina (saponina e flavonóide) verificando que uma solução 30% de etanol seria o melhor solvente utilizando o método de extração orbital simples a 50ºC por 1 h com recuperação de 89,7% para a saponina.

Como a recuperação de saponinas se demonstrou baixa com apenas uma extração, foram realizadas 2 re-extrações com o objetivo de maximizá-la, sendo os resultados apresentados na Figura 32, com cerca de 3 extrações sucessivas se alcança 100% de recuperação das saponinas de juá, e para o sisal são necessárias 4 extrações sucessivas.

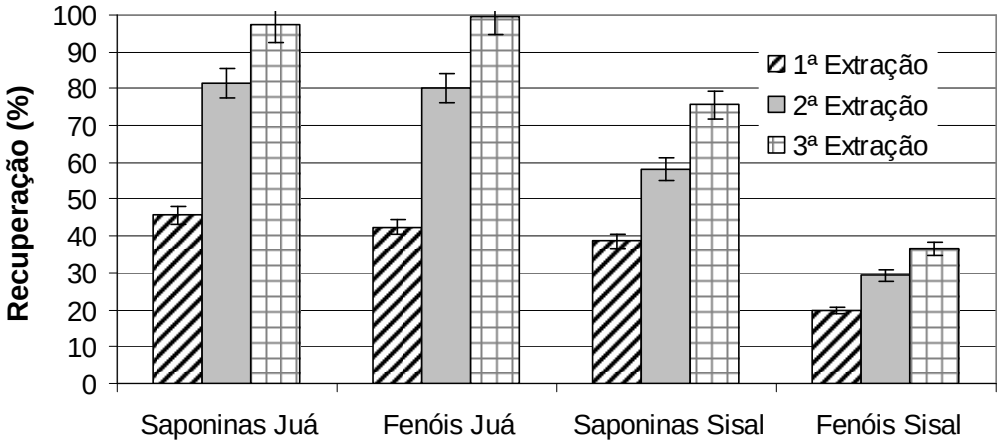


Figura 32 – Avaliação do número de reextrações de saponinas do juá e do sisal

4.3.2) Extração com líquidos iônicos e análogos

4.3.2.1) Seleção dos líquidos iônicos e análogos

Uma das vantagens em se trabalhar com líquidos iônicos é a possibilidade de modificação das suas propriedades fisico-químicas, apenas com a troca dos ânions (Olivier-Bourbigou *et al*, 2010). Assim, foram testados vários líquidos iônicos biocompatíveis baseados no íon colínio, tendo como co-solvente água e a solução etanol 30%, que é o solvente utilizado na extração orbital simples. Este procedimento teve alguns detalhes diferentes da extração orbital simples, como a quantidade de solvente utilizada (1 mL ao invés de 15 mL), devido ao custo elevado dos LI, mas com a relação matéria-prima/solvente mantida em 1/5; e agitação, que diminuiu para 120 rpm, mas para não ter problemas de transferência de massa, os ensaios foram todos homogeneizados em vortex (2500 rpm) por 30 s; e o tempo de extração, que foi aumentado para 24 h, tentando garantir a saturação da difusão das saponinas para o meio. Foram avaliados 4 variáveis de resposta: o teor de recuperação de saponinas (%); teor de recuperação de açúcares redutores totais (%), verificando uma possível degradação das saponinas; a razão entre saponinas e compostos fenólicos, investigando a seletividade do solvente; e o custo, relacionando o solvente com quanto de saponinas foi extraída (ver Anexo, Figura 76). No caso do custo, como grande parte destes LI e análogos não são comercializados, foi feito uma estimativa usando os preços das materias-primas e o percentual em que cada uma seria responsável na constituição do LI .

Os LI e análogos com a presença de grupos aromáticos (ChSal, ChBz, ChPhAc e ChCl/HPhAc) apresentaram uma recuperação de saponinas superior ao dos solventes orgânicos (Tabela 24), com exceção do eutético em presença de água, mas com seletividade baixa, provavelmente devido a presença de grupos aromáticos também nos compostos fenólicos. Dentre os LI e análogos com ânions derivados de ácidos orgânicos lineares (ChAc, ChProp, ChBut, ChHex, ChCl/HAc e ChCl/HProp), o uso de etanol 30% como co-solvente aumentou a

seletividade para saponinas, sendo superior com os eutéticos, com exceção do ácido acético em relação ao juá em que a seletividade do ChAc foi superior. Na recuperação das saponinas, o aumento da cadeia hidrofóbica influencia ligeiramente de modo positivo nas saponinas do juá, mas com o sisal os eutéticos e ChProp foram os mais representativos.

Tabela 24 - Comparação do poder extrativo de líquidos iônicos e análogos em relação a saponinas

LI ou Eutéticos	Co-Solvente	Juá				Sisal			
		% Sap	% Açúcar	Sap/ Fen	Custo (R$/ton Sap)	% Sap	% Açúcar	Sap/ Fen	Custo (R$/ton Sap)
-	Agua	50.89	82.84	4.17	0,04	40.77	25.87	1.16	0,06
-	EtOH 30%	45.60	91.40	4.13	6,41	38.60	24.50	2.12	8,83
ChCl	Agua	56.71	88.55	**9.69**	2050,63	28.82	24.65	**3.61**	4707,11
ChCl	EtOH 30%	54.46	81.13	**8.80**	2138,10	29.37	21.67	**5.86**	4624,95
ChAc	Agua	57.03	82.11	**9.90**	14220,26	39.43	30.58	2.48	23993,04
ChAc	EtOH 30%	52.80	81.94	**10.31**	15360,24	34.55	22.11	2.34	27378,46
ChSal	Agua	**73.23**	99.80	4.86	11838,19	**61.38**	50.57	2.28	16475,71
ChSal	EtOH 30%	**65.80**	85.53	3.74	13177,47	50.02	40.10	2.35	20220,11
ChCit	Agua	57.43	79.66	4.10	13152,87	**65.90**	28.32	2.18	13370,31
ChCit	EtOH 30%	58.42	78.68	4.70	12931,67	51.11	28.30	1.56	17242,23
ChSuc	Agua	56.46	90.58	4.51	15943,84	**65.11**	30.94	2.00	16125,48
ChSuc	EtOH 30%	50.69	81.78	3.89	17759,22	**68.38**	21.67	2.66	15357,21
ChLac	Agua	57.59	97.35	5.49	16935,48	54.14	34.05	2.27	21009,86
ChLac	EtOH 30%	**61.75**	93.19	5.27	15796,93	49.35	28.22	2.16	23056,05
ChHex	Agua	**65.46**	111.13	4.66	13721,06	54.42	31.55	1.72	19249,22
ChHex	EtOH 30%	**67.19**	103.95	5.79	13368,83	52.29	22.77	2.93	20037,44
ChBz	Agua	**64.62**	120.01	4.88	14118,85	54.07	30.26	2.12	19680,45
ChBz	EtOH 30%	**65.74**	111.94	4.20	13882,04	44.72	24.64	2.09	23801,90
ChBut	Agua	58.09	126.62	4.46	16763,73	45.00	27.18	1.89	25257,93
ChBut	EtOH 30%	**63.59**	106.40	4.94	15314,90	58.73	26.03	2.51	19340,05
ChMal	Agua	57.47	103.63	4.77	17065,55	39.24	28.16	1.45	29151,55
ChMal	EtOH 30%	**61.07**	91.16	3.54	16062,77	50.84	23.49	1.84	22504,96
ChOx	Agua	54.23	103.22	5.81	18542,25	**62.77**	24.79	**3.06**	18686,04
ChOx	EtOH 30%	48.86	96.29	3.70	20581,18	**60.93**	21.38	2.36	19252,77
ChProp	Agua	40.09	96.13	3.14	25465,89	50.84	24.81	2.59	23422,43
ChProp	EtOH 30%	49.76	110.07	4.36	20519,37	**72.99**	22.67	**3.46**	16316,45
ChPhAc	Agua	**65.14**	117.32	4.01	12450,32	**68.61**	24.84	2.09	13787,89
ChPhAc	EtOH 30%	54.49	103.87	4.18	14884,08	**70.35**	21.72	2.61	13447,17
ChCl/Glicerol	Agua	52.18	119.03	3.82	**1800,46**	**62.51**	28.60	2.56	**1753,06**
ChCl/Glicerol	EtOH 30%	52.34	109.50	2.71	**1797,76**	58.94	19.58	2.38	**1862,09**
ChCl/EtGlicol	Agua	**60.09**	124.01	**6.45**	**1543,56**	53.33	23.83	2.70	2028,57
ChCl/EtGlicol	EtOH 30%	53.12	108.84	5.09	**1748,98**	**61.77**	20.65	**3.50**	**1754,23**
ChCl/Uréia	Agua	**62.46**	121.48	**6.44**	**1608,08**	**74.87**	26.02	2.92	**1564,76**
ChCl/Uréia	EtOH 30%	**61.21**	109.25	**6.19**	**1643,34**	**64.46**	22.56	2.70	**1820,02**
ChCl/HAc	Agua	55.56	102.08	4.56	**1333,96**	**67.70**	18.62	2.30	**1276,87**
ChCl/HAc	EtOH 30%	**67.66**	93.44	**6.82**	**1097,52**	**62.14**	16.09	2.66	**1393,90**
ChCl/HMal	Agua	49.22	44.69	2.37	3376,74	40.82	9.78	1.21	4749,05
ChCl/HMal	EtOH 30%	48.01	47.63	3.22	3464,56	37.78	10.17	1.24	5135,20
ChCl/HOx	Agua	53.83	144.47	4.34	2715,51	53.61	30.11	1.86	3180,03
ChCl/HOx	EtOH 30%	42.55	42.41	3.63	3438,92	39.05	15.50	1.51	4370,43
ChCl/HPhAc	Agua	36.43	86.67	2.11	4452,24	30.25	38.42	1.84	6254,74
ChCl/HPhAc	EtOH 30%	52.06	61.89	4.79	3115,43	**70.12**	26.43	2.69	2698,03
ChCl/HLac	Agua	54.51	63.52	3.33	2206,75	55.98	24.70	1.78	2506,47
ChCl/HLac	EtOH 30%	52.02	58.47	4.93	2314,90	47.79	23.53	1.95	2939,10
ChCl/HProp	Agua	51.63	53.66	4.70	**1504,08**	49.35	24.57	2.43	**1835,41**
ChCl/HProp	EtOH 30%	48.57	44.28	5.82	**1601,84**	**67.47**	21.20	**3.13**	**1344,86**

Os LI e análogos derivados de ácidos orgânicos hidroxilados e dicarboxilados apresentaram resultados de recuperação de saponinas e seletividade similares ao dos solventes orgânicos, com exceção do ChOx, provavelmente pela maior viscosidade destes solventes. Em relação aos solventes eutéticos clássicos (ChCl/Uréia, ChCl/Glicerol e ChCl/Etileno Glicol), vários apresentaram resultados com recuperação de saponinas acima de 60%, e seletividade alta, com destaque para ChCl/Uréia.

No caso do juá, o solvente com maior poder extrativo foi salicilato de colina (ChSal) em água com uma recuperação de 73,23% de saponinas, mas algumas saponinas podem ter sido degradadas (99,80% de açúcares redutores), seletividade similar a da água, e um custo elevado. O mais seletivo foi o acetato de colina (ChAc), obtendo uma relação saponina/fenóis 2,5 vezes superior ao dos solventes orgânicos, sem nenhuma degradação aparente das saponinas, mas com uma recuperação de saponinas apenas 15% superior, e com um custo maior que o ChSal. Assim, o solvente escolhido foi o eutético ChCl/HAc 1/2 em 30% etanol, pois apresentou respostas intermediárias com 48% a mais de recuperação de saponinas, seletividade superior (1,65 vezes), praticamente sem degradação das saponinas, e com o custo mais baixo dentre todos os solventes.

No caso do sisal, o solvente com maior poder extrativo foi o eutético ChCl/Uréia 1/2 em água com uma recuperação de 74,87% de saponinas, praticamente sem degradação das mesmas, seletividade 2,5 vezes superior a da água, e um custo menor que dos LIs. O mais seletivo foi o cloreto de colina (ChCl), obtendo uma relação saponina/fenóis de 5,86, sem nenhuma degradação aparente das saponinas, mas com uma recuperação de saponinas cerca de 30% inferior a dos solventes orgânicos, e com um custo maior que o ChCl/Uréia. Assim, o solvente escolhido foi o eutético ChCl/HProp 1/2 em 30% etanol, pois apresentou respostas intermediárias com 75% a mais de recuperação de saponinas, seletividade superior 1,48 vezes, sem degradação das saponinas, e com o custo baixo.

4.3.2.2) Planejamento de misturas

Como foi visto na Tabela 24, o uso de etanol pode influenciar na extração das saponinas, tanto que os solventes eutéticos escolhidos obtiveram melhores resultados na sua presença. Por isso, foi avaliado através do planejamento de misturas qual seria a melhor proporção entre água, etanol e solvente eutético para uma maior recuperação de saponinas e seletividade, com baixo custo. Similarmente a extração com solventes orgânicos verdes, foi necessária o uso das ferramentas estatísticas do programa STATISTICA 6.0, removendo termos não estatisticamente significativos (p-valor acima de 0,05) para melhor ajuste do R^2.

Para o juá, foi utilizado um modelo cúbico completo, com termos de interação tripla (ABC) e interação relativa entre etanol e eutético removidos (BC(B-C)), obtendo R^2 iguais a 0,8909 e 0,9851 para as variáveis de recuperação de saponinas e seletividade, respectivamente. Na Figura 33, pode ser observado através dos diagramas de Pareto quais parâmetros e interações tem efeitos sinérgicos e positivos nas variáveis de resposta, onde o solvente eutético, água e etanol tem efeito positivo na recuperação de saponinas e na seletividade. Na Figura 34, observa-se a variação da composição da mistura de solventes para maximizar as variáveis de resposta. O valor ótimo da composição da mistura, incluindo a minimização do custo, foi 81% do eutético ChCl/HAc 1/2 e 19% água.

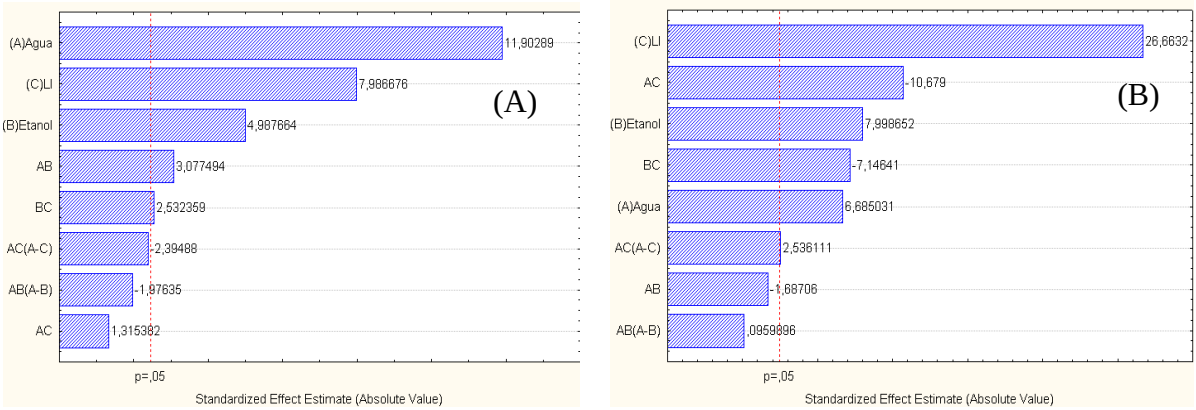


Figura 33 – Diagramas de Pareto do planejamento de mistura para extração de saponinas de juá. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)

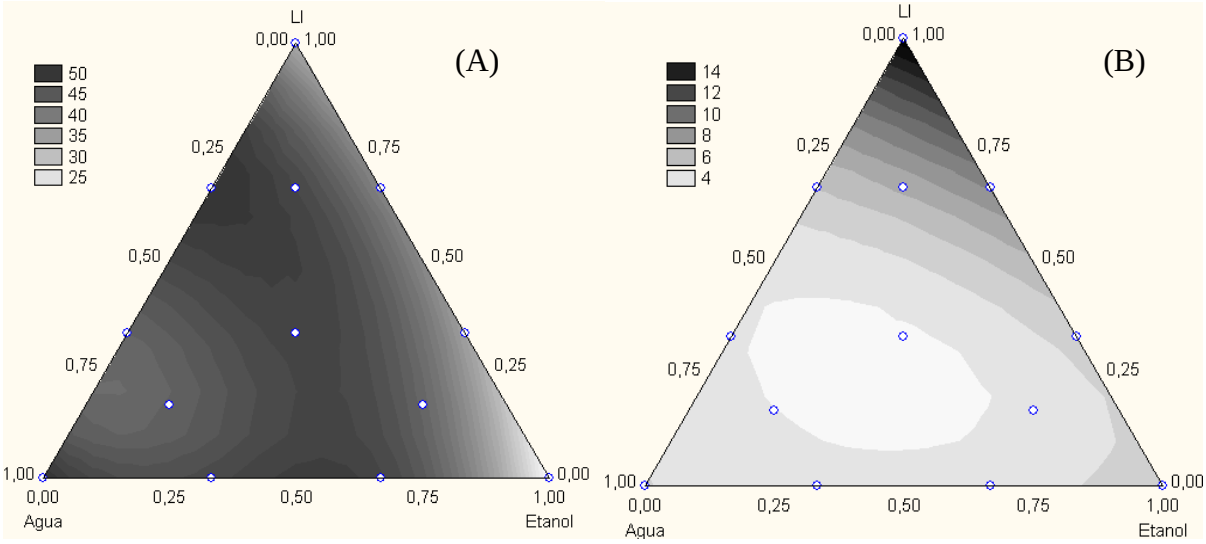


Figura 34 – Curvas de contorno do planejamento de mistura para extração de saponinas de juá. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)

Para o sisal, também foi utilizado um modelo cúbico completo, mas com termos de interação relativa entre etanol e eutético (BC(B-C)), e água e eutético (AC(A-C)) removidos, obtendo R^2 iguais a 0,881 e 0,9483 para as variáveis de recuperação de saponinas e seletividade, respectivamente. Na Figura 35, são apresentados nos diagramas de Pareto quais parâmetros e interações tem efeitos sinérgicos e positivos nas variáveis de resposta, onde o solvente eutético, água e etanol tem efeito positivo na recuperação de saponinas e na seletividade. Na Figura 36, a variação da composição da mistura de solventes é analisada de forma a maximizar as variáveis de resposta, sendo que em concentrações altas de eutético, a seletividade é alta, e em concentração entre 50 a 75% de etanol a recuperação é alta. Assim, o valor ótimo da composição da mistura foi 58% do eutético ChCl/HProp 1/2 e 42% etanol.

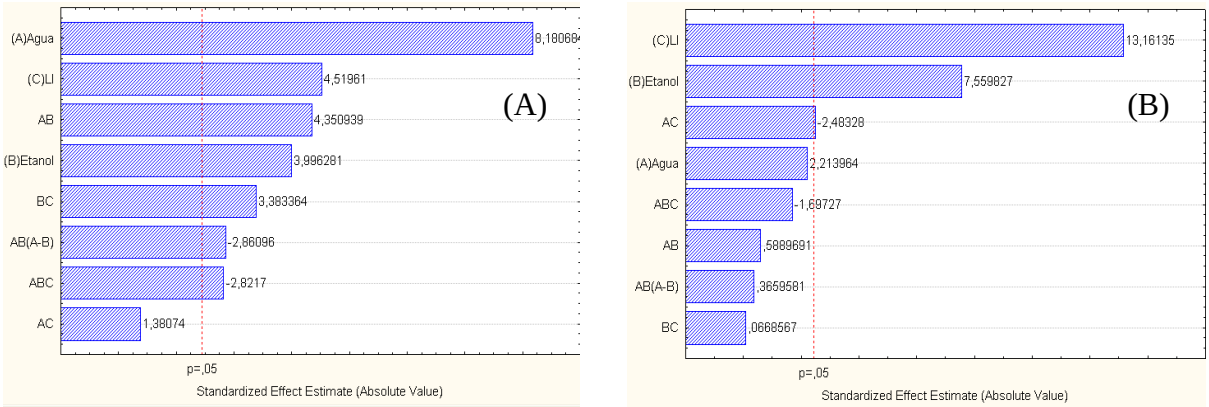


Figura 35 - Diagramas de Pareto do planejamento de mistura para extração de saponinas de sisal. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)

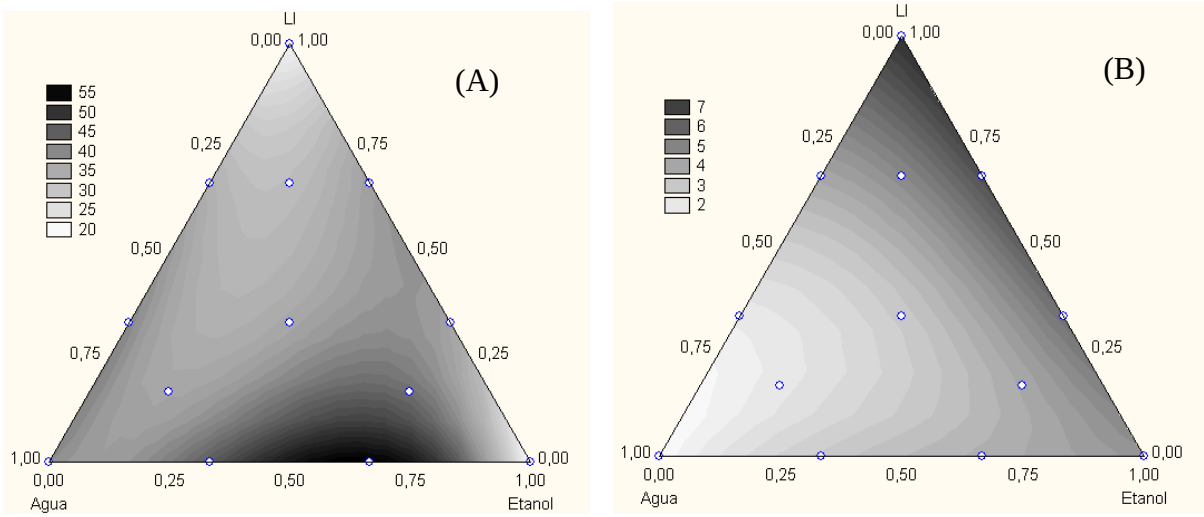


Figura 36 - Curvas de contorno do planejamento de mistura para extração de saponinas de sisal. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)

4.3.2.3) Otimização Seqüencial da Extração

Com a composição da mistura de solventes definida, foi inicialmente verificado se a difusão de saponinas para o meio extrator poderia ser realizada em tempos menores que 24 h, mantendo uma recuperação de saponinas e seletividade altas. Nas Figuras 37A e B, pode ser verificado que em 1,5 h de extração foi obtida uma recuperação de saponinas de 58 e 61% do sisal e do juá, respectivamente, com uma seletividade de 7,36 e 9,30. Para as saponinas do juá, o máximo de recuperação ocorre em 24 h, mas com menor seletividade (3,10), sendo mantido 1,5 h.

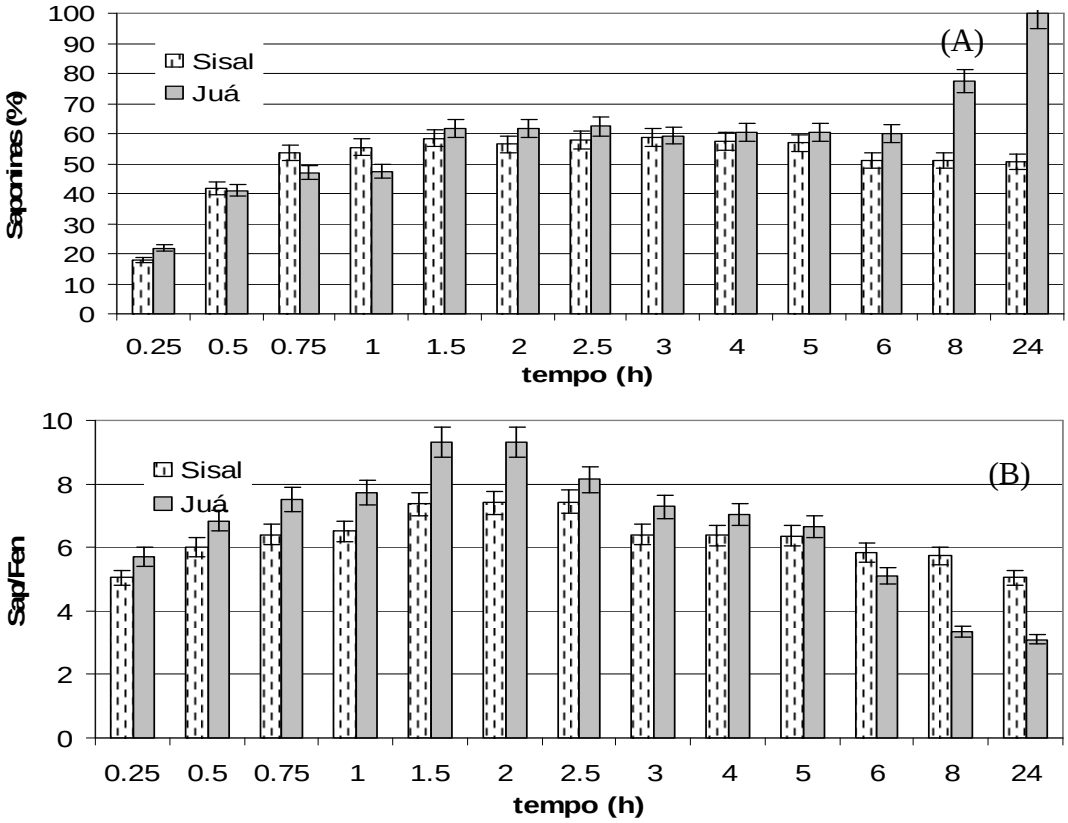
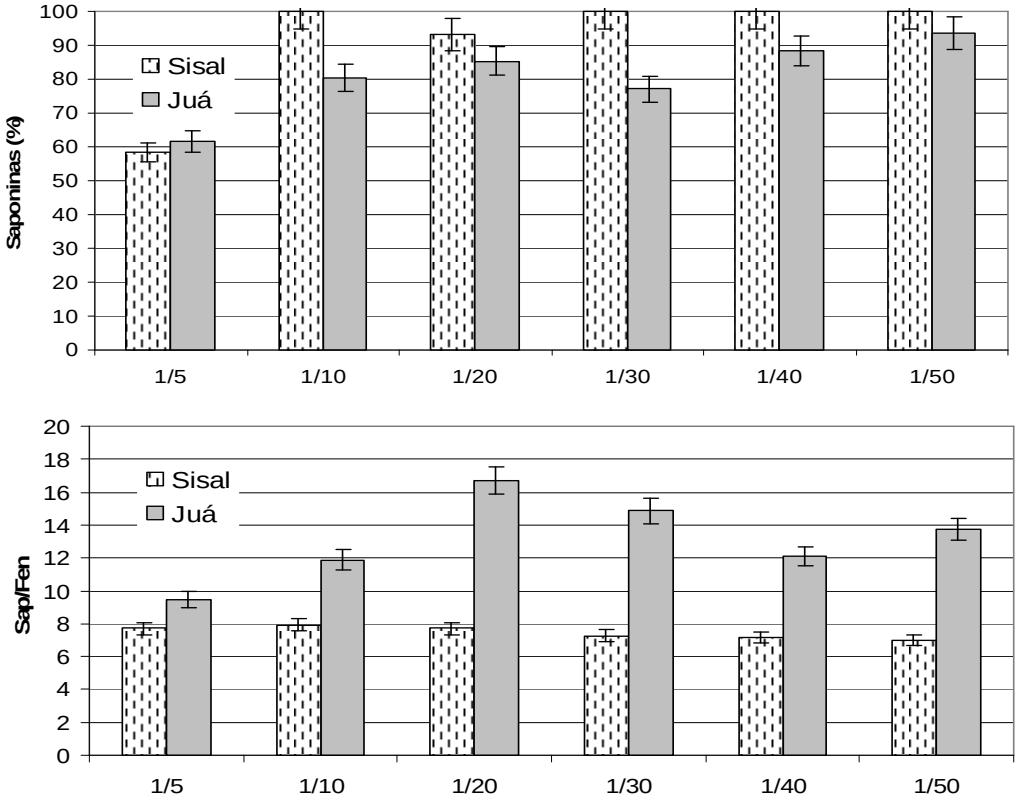


Figura 37 – Cinética de extração de saponinas por solventes eutéticos. (A) Recuperação de Saponinas (%), (B) Seletividade (Relação Saponinas/Compostos fenólicos)

Mantendo as condições anteriores (40ºC, 200 rpm), e com um tempo de extração de 1,5h, foram realizados ensaios para verificar a influência da relação matéria-prima/solvente sobre a extração de saponinas. Assim, foi obtida recuperação de saponinas de 100% e uma seletividade de 7,94 com uma relação de 1/10 para o sisal, e com uma relação de 1/20 para o juá, foram alcançados valores de 85% e 16,73, respectivamente (Figuras 38A e B).

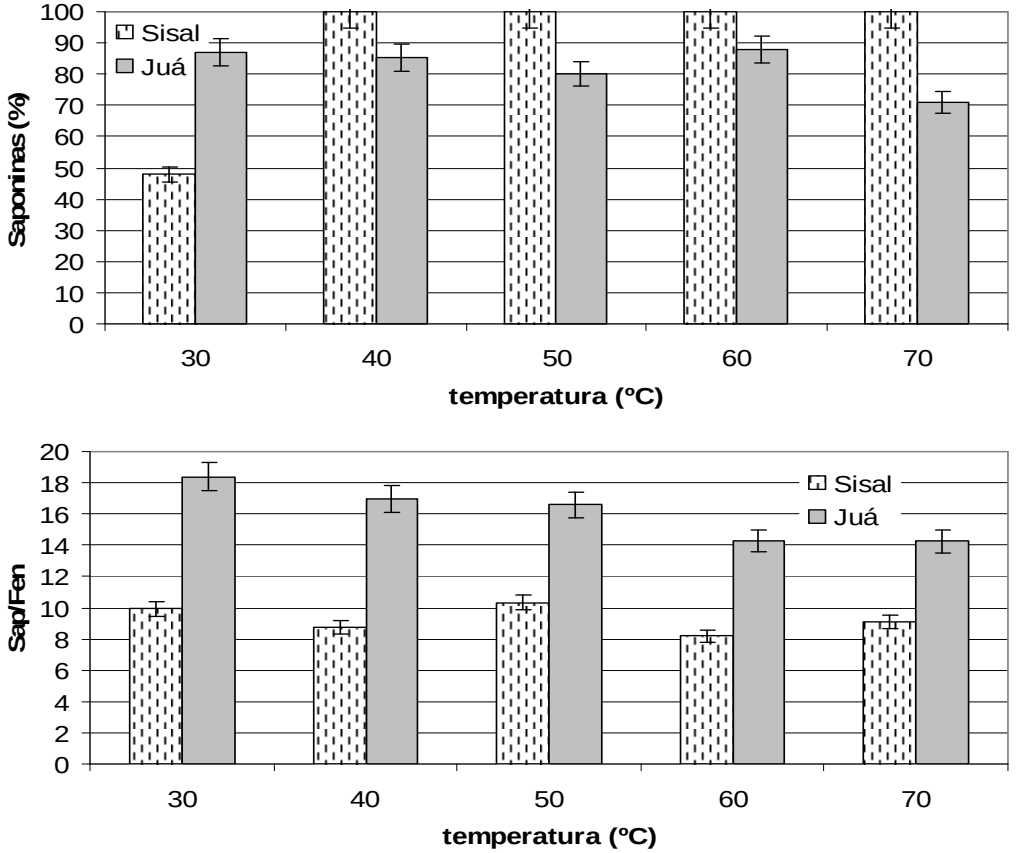
Mantendo as condições (200 rpm, 1,5h), e relação matéria-prima/solvente de 1/10 para o sisal, e 1/20 para o juá, foi estudado o comportamento da extração das saponinas frente a variação de temperatura (Figuras 39A e B). À temperatura de 50ºC, a recuperação obtida de saponinas do sisal foi de 100% com uma seletividade de 10,34, enquanto a temperatura de 30ºC já é suficiente para a extração das saponinas do juá, obtendo 87% de recuperação e 18,39 de seletividade.



(A)

(B)

Figura 38 – Influência da relação matéria-prima/solvente na extração de saponinas



(A)

(B)

Figura 39 - Influência da temperatura na extração de saponinas

4.3.3) Comparação dos Métodos de Extração

Foram testadas outros métodos de extração, como a extração micelar utilizando 5% de Triton X-100, a extração com auxílio de ultrassom e uma combinação de ambas a fim de comparar com a extração orbital simples (Figuras 40, 41 e 43).

4.3.3.1) Juá

Os melhores resultados foram obtidos na extração micelar em 1 hora de processamento, alcançando 79% na recuperação de saponinas, e da mesma com auxílio de ultrassom após 2 h de extração com 81% de saponinas. Porém, após o ápice de recuperação de saponinas, há certa redução destas e com concomitante aumento do teor de açúcares redutores podendo indicar certa degradação das saponinas.

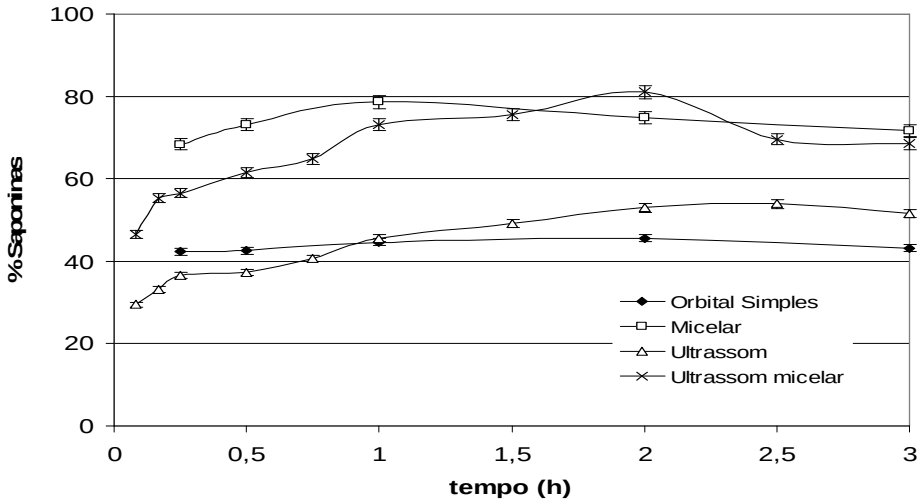


Figura 40 – Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de saponinas do juá

Resultados similares foram obtidos por Fang e colaboradores (2000) na extração micelar de ginsenosídeos utilizando uma solução aquosa 10% de Triton X-100, temperatura de 40ºC, relação matéria-prima/solvente de 0,005, por 1 hora de extração obtendo 99% de recuperação de saponinas, comparado com recuperações de 87 e 88% ao se utilizar como solvente água e metanol, respectivamente.

Sem a adição de Triton X-100, a recuperação máxima de saponinas foi de 45,6 e 53,9% para a extração orbital simples e com auxílio de ultrassom, respectivamente. Em ambos, há um aumento de açúcares redutores totais após 1 h de extração, indicando uma possível hidrólise dos polissacarídeos da casca do juá, já que a recuperação de saponinas permanece praticamente constante, demonstrando que não estão sendo afetadas. A

recuperação dos compostos fenólicos se manteve praticamente invariável e similar a todos os métodos de extração testados. Tian e colaboradores (2008b) relataram que ao usar metanol na extração de ácido glicirrizico com auxílio de ultrassom a extração foi pelo menos 4 vezes mais rápida.

Zhao e colaboradores (2008) também compararam a extração orbital simples com a extração empregando transdutor de ultrassom para saikosaponinas obtendo uma recuperação de 38 e 56%, respectivamente. Posteriormente os parâmetros para máxima recuperação das saikosaponinas foram obtidos para o método por ultrassom, sendo o solvente uma solução aquosa de etanol a 50% (v/v) durante 30 minutos a 80ºC, com uma relação matéria-prima/solvente de 0,04, uma potência de ultrassom de 21W e uma granulometria do material entre 0,3 a 0,45 mm (35 a 48 Mesh Tyler).

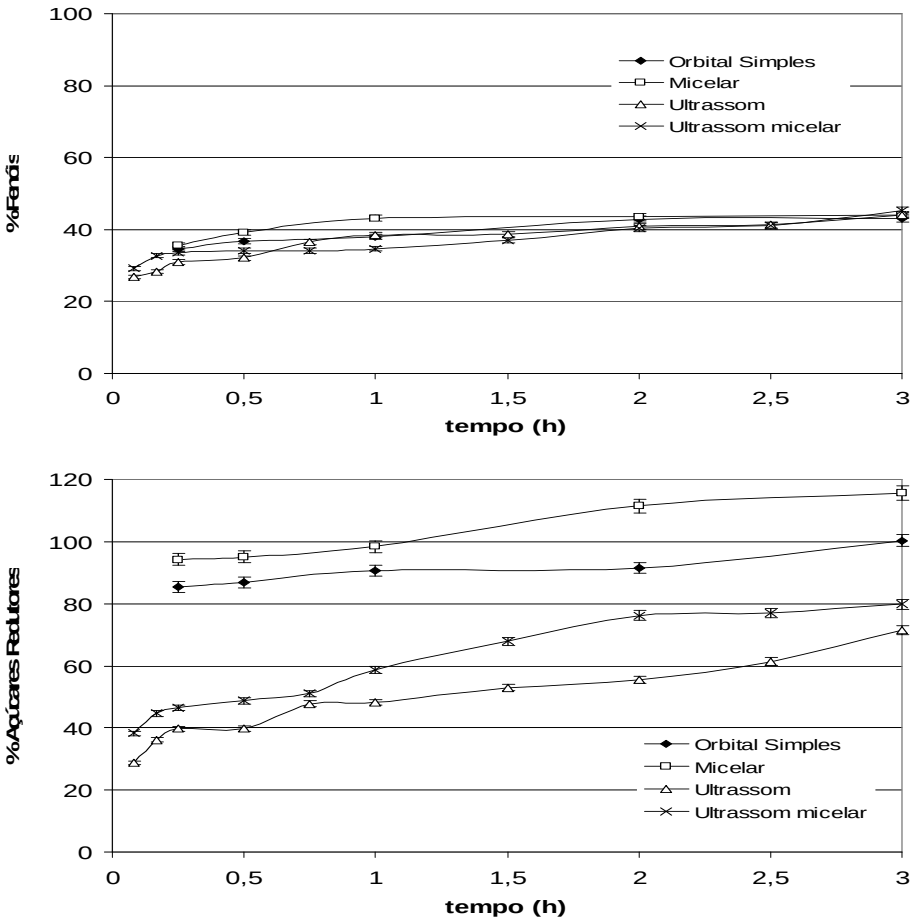


Figura 41 - Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de (a) fenóis e (b) açúcares redutores

Como a extração micelar foi a que obteve maior recuperação de saponinas em menor tempo, foram testadas várias concentrações de Triton X-100 para maximizar a recuperação de saponinas. Na Figura 42 foi observado que com o aumento da concentração de Triton X-100, há

um maior seletividade das saponinas em relação aos compostos fenólicos e açúcares, provavelmente pela alteração da composição de micelas simples (só Trtion X-100) para mistas (Triton+saponinas), encontrando uma saturação na extração a partir de 15% v/v de Triton obtendo 90,8% de recuperação. Este resultado difere do relatado por Sun e colaboradores (2007a) que alcançaram o máximo de rendimento em saponinas na concentração de 5% de Triton X-100.

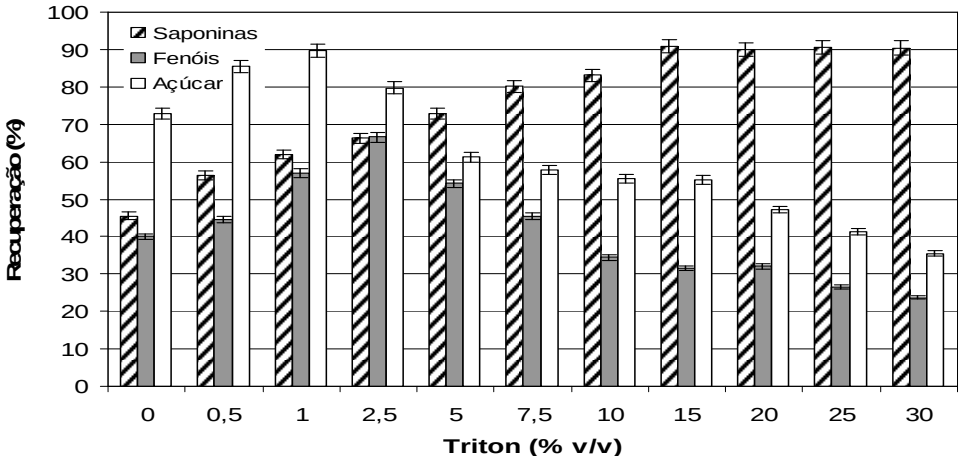


Figura 42 – Avaliação da variação da concentração de Triton X-100 sobre a recuperação de saponinas de juá

4.3.3.2) Resíduo Mucilaginoso de Sisal

Os melhores resultados foram obtidos na extração micelar em 4 horas de processamento, alcançando 89% na recuperação de saponinas, e da mesma com auxílio de ultrassom após 1 h de extração com 78% de saponinas. Sem a adição de Triton X-100, a recuperação máxima de saponinas foi de 38,6 e 14,8% para a extração orbital simples e com auxilio de ultrassom, respectivamente. Em ambos, não há variação na recuperação de compostos fenólicos e de açúcares redutores totais, e já que a recuperação de saponinas permanece praticamente constante, demonstra que não estão sendo afetadas.

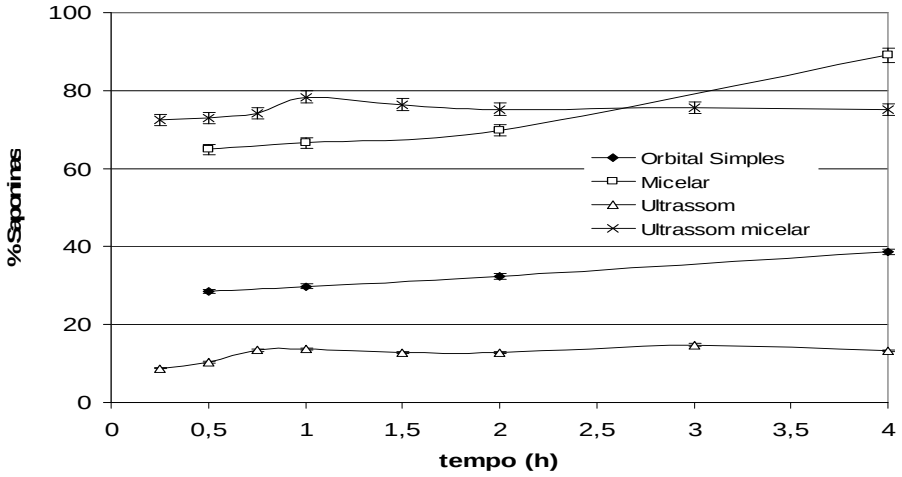


Figura 43 – Comparação dos métodos de extração em relação à recuperação de saponinas do sisal

Como a extração micelar foi a que obteve maior recuperação de saponinas, foram testadas várias concentrações de Triton X-100 para maximizar a recuperação de saponinas, obtendo 98,4% utilizando 7,5% v/v de Triton (Figura 44). Neste caso, houve a necessidade de menor concentração de Triton para saturação na extração devido a um menor teor de saponinas presente no resíduo de sisal, mas mantendo o mesmo aumento de seletividade devido a formação de micelas mistas.

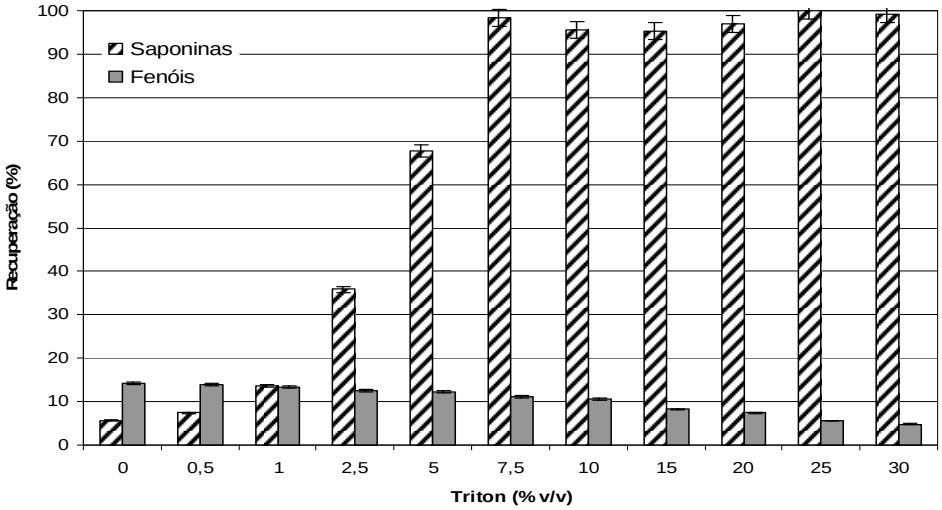


Figura 44 – Avaliação da variação da concentração de Triton X-100 sobre a recuperação de saponinas de sisal

4.3.3.3) Resumo

Comparando a extração orbital simples com re-extração, a extração micelar e a com solventes eutéticos (Tabela 25), utilizando como parâmetros a recuperação de saponinas (Sap %), a seletividade (Sap/Fen) e o custo (quanto seria gasto de solvente, em reais, para obtenção de 1 ton de saponinas) foi verificado que a extração orbital simples com reextração é a possibilidade com menor custo, só sendo prejudicada no sisal pelo fato de ser resíduo com muito água. Por este motivo, esse extrato foi utilizado em etapa de concentração por coluna de espuma e por membranas. Para a separação bifásica aquosa por ponto de névoa, o extrato trabalhado foi o obtido pela extração micelar pelo menor custo no caso do juá e pela maior seletividade no caso do sisal, além de o solvente eutético ter uma recuperação difícil.

Tabela 25 – Resumo da comparação dos métodos de extração das saponinas

Métodos de Extração	JUÁ			SISAL		
	Sap (%)	Sap/Fen	Custo (R$/ton Sap)	Sap (%)	Sap/Fen	Custo (R$/ton Sap)
Orbital (3 Extrações)	97,25	8,28	20,71	75,68	2,38	145,93
Micelar	90,8	11,32	200,47	98,4	93,10	190,92
Solvente Eutético	86,9	18,39	723,91	100	10,34	169,67

4.4) CONCENTRAÇÃO DE SAPONINAS

4.4.1) Pré-concentração por Ponto de Névoa

4.4.1.1) *Screening* dos Sais

Neste método de concentração, muitas vezes é apenas necessário o aquecimento da solução contendo o surfactante não-iônico até o *cloud point* para que a separação de fases ocorra. Isso ocorre pela remoção de água das partes hidrofílicas da cadeia de polietilenoglicol promovendo o aglomeramento de micelas e separação de uma fase rica em surfactante, mas geralmente é reversível sendo necessário o resfriamento e agitação da solução para voltar a ser homogênea. Em muitos casos, a adição de sais diminui o *cloud point* e aumenta o fator de concentração das substâncias (Quina & Hinze, 1999). Na Tabela 26, foi observado como vários tipos de sais influenciam diferentemente a concentração de saponinas pelo método de *cloud point* (ver Anexo, Figura 77). Os sais com maior fator de pré-concentração e maior coeficiente de partição de saponinas à temperatura ambiente (27ºC) foram sulfato de sódio, citrato de sódio e carbonato de sódio. O melhor sal tanto para as saponinas do juá quanto para os do sisal foi o carbonato de sódio, que mesmo não sendo o sal com maior fator de pré-concentração (14,2, juá; e 20,27, sisal) alcançou os maiores coeficente de partição (315,25, juá; e 35,29, sisal). A concentração ótima de carbonato de sódio foi mantida em 20% p/v, tanto para o juá quanto para o sisal, como pode ser visto na Tabela 27.

Tabela 26 – Avaliação de sais na pré-concentração por ponto de névoa de saponinas de juá e de sisal

Sais	Ppt.	T(ºC)	K_{SAP} Juá	K_{FEN} Juá	α Juá	V Juá	K_{SAP} Sisal	K_{FEN} Sisal	α Sisal	V Sisal
$MgCl_2$	-	78-80	13,32	1,01	17,99	0,82	19,36	3,62	29,65	0,12
$MgSO_4$	-	27	55,65	3,09	13,12	0,92	25,53	3,26	19,14	0,31
Na_3PO_4	+	44-48	19,48	0,59	9,08	1,98	12,64	6,22	21,94	0,19
Na_2SO_4	+	27	112,39	1,23	11,64	1,26	32,76	3,81	27,59	0,27
NaCl	+	43-47	37,11	1,17	17,05	1,02	10,58	3,89	28,50	0,15
NaCit	+	27	129,93	1,35	13,85	0,74	27,96	5,57	20,74	0,23
Na_2CO_3	-	27	**315,25**	1,67	14,20	1,13	**35,29**	1,61	20,27	0,52
$NaHCO_3$	+	42-48	8,05	0,58	11,45	0,83	6,27	3,66	29,89	0,15
$NaNO_3$	-	>85	4,80	1,13	12,44	0,74	2,23	3,72	9,76	0,19
$(NH_4)_2SO_4$	-	27	27,28	2,57	12,11	0,59	30,26	6,72	27,95	0,19
NH_4Ac	-	54-64	7,97	1,93	16,67	0,92	5,70	5,18	29,34	0,06
NH_4Cl	-	64-68	8,61	2,00	15,31	0,83	6,31	4,29	23,83	0,12
KCit	-	27	59,01	1,22	18,07	1,13	8,06	7,61	15,92	0,27
K_2CO_3	-	27	99,10	1,86	19,49	1,02	16,50	4,52	23,90	0,27
K_2SO_4	+	>85	8,96	1,38	18,36	0,59	3,19	4,00	24,72	0,15
KNO_3	+	>85	26,04	0,85	17,53	0,83	3,71	2,31	15,05	0,23
KCl	+	60-64	50,59	0,92	20,40	0,74	6,09	2,86	16,94	0,15
$KHCO_3$	+	43-48	30,30	0,94	14,20	0,66	3,12	4,01	11,47	0,15
KAc	-	50-52	26,94	0,92	14,56	0,83	3,57	3,63	20,82	0,12
$CaCl_2$	-	72-77	14,83	1,64	19,35	0,52	3,35	5,20	11,13	0,19
NaAc	+	55-57	12,01	1,11	19,97	0,74	-	-	-	-
NH_4NO_3	-	>85	4,03	1,23	8,42	1,02	-	-	-	-

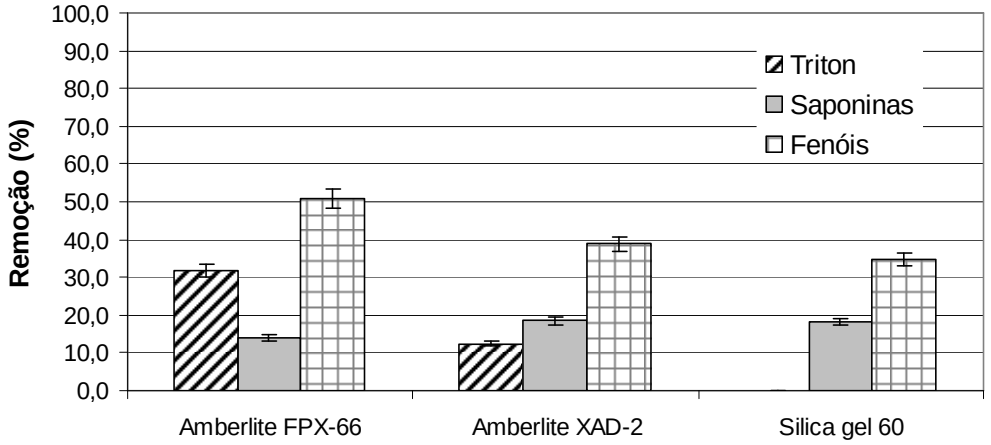
Tabela 27 – Avaliação da concentração de carbonato de sódio na pré-concentração por ponto de névoa de saponinas de juá e de sisal

Na_2CO_3 (%)	Ppt.	T(ºC)	K_{SAP} Juá	K_{FEN} Juá	α Juá	V Juá	K_{SAP} Sisal	K_{FEN} Sisal	α Sisal	V Sisal
5	-	48-50	14,37	0,54	10,69	0,47	0,61	0,23	16,44	0,15
10	-	27	79,15	1,26	14,03	1,13	1,23	0,84	14,67	0,27
15	-	27	91,42	1,35	17,12	1,13	9,49	0,85	13,06	0,59
20	-	27	315,25	7,03	21,54	1,13	35,29	2,34	20,27	0,52
25	+	27	75,08	1,51	17,08	1,13	2,85	1,20	13,80	0,59
30	+	27	55,07	1,49	18,13	1,13	1,79	0,68	10,63	0,59

Fang *et al* (2000) relataram que com adição de 3% p/v de sulfato de sódio a recuperação de ginsenosídeos alcançou 100%, com fator de pré-concentração (α) de 7, e uma razão volumar (V) de 0,16, enquanto sem adição do sal, o rendimento foi próximo de 80%, com α de 2 e V, 0,72. Sun e colaboradores (2008) usaram NaCl (20% p/v) obtendo 98% de recuperação de ácido glicirrízico e α de 13.2. Choi *et al* (2003) adicionaram sulfato de amônio (40% p/v) ao extrato de ginseng e conseguiram um fator de pré-concentração de 35.

4.4.1.2) Remoção do Triton

Em várias aplicações, os surfactantes podem ser removidos da fase supramolecular (ou da fase rica em surfactante) por diálise ou adsorção hidrofóbica com resinas de poliestireno como Bio-Beads SM2, Amberlite XAD-2, sílica gel, hidroxiapatita ou Florisil (Quina & Hinze, 1999; Fang *et al*, 2000). Nas Figuras 45 A e B, foram avaliadas as remoções de Triton X-100, saponinas e compostos fenólicos da fase supramolecular utilizando alguns adsorventes. Amberlite FPX-66 obteve a maior remoção de Triton X-100 e compostos fenólicos, e a menor remoção de saponinas. Isto ocorreu devido a sua estrutura macroreticular com alta área superficial (> 700 m²/g) o qual permitiu a adsorção de surfactantes e compostos fenólicos, justificando sua aplicação comum na remoção de pigmentos em sucos. Há poucos trabalhos na literatura sobre a remoção de Triton X-100 por Amberlite como o de Trescec *et al* (1999) que relataram que a Amberlite XAD-7 conseguiu remover entre 94 e 99% do Triton X-100 de uma solução de imunoglobulinas, e Cheetham (1979), que fez uma comparação entre Amberlite XAD-1, -2, -4 e -7, obtendo para o Amberlite XAD-2 uma remoção de 0,26 g de Triton X-100 a cada grama de adsorvente utilizado.



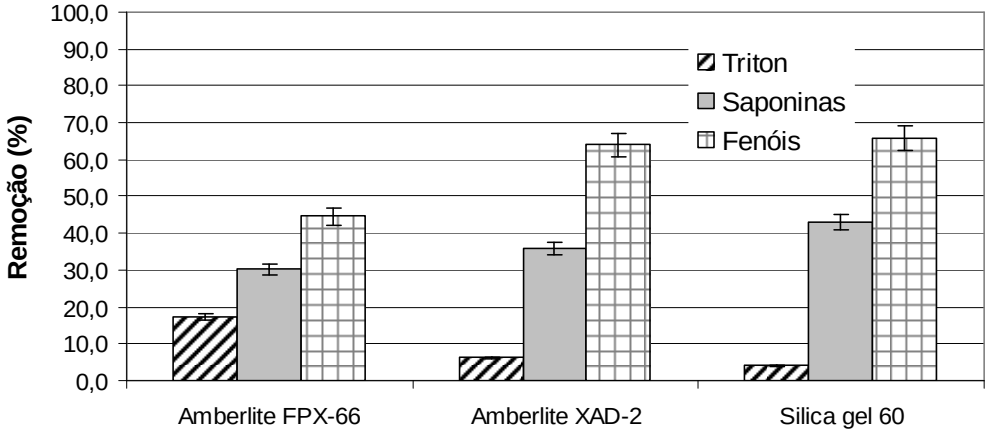


Figura 45 – Avaliação da capacidade de remoção de Triton X-100 dos extratos concentrados de sisal por adsorventes. (A) Sisal, (B) Juá

Após a escolha do Amberlite FPX-66 como adsorvente, foi realizado um planejamento composto central para maximizar a remoção do Triton X-100 e compostos fenólicos e minimizar o de saponinas, avaliando a temperatura e concentração do adsorvente (Tabela 28). Com STATISTICA 6.0, foi gerado as tabelas de ANOVA para cada variável de resposta, sendo que para o sisal foram obtidos R^2 de 0.96, 0.94 e 0.84 , e para o juá, R^2 de 0.97, 0.95 e 0.82 referentes ao Triton X-100, saponinas e compostos fenólicos, respectivamente. Os termos com maior impacto positivo na remoção destes compostos foi o termo linear da concentração do adsorvente e o termo quadrático da temperatura para juá e sisal. As condições foram obtidas utilizando a abordagem do *desirability*, sendo 40.8ºC e 25.4% Amberlite FPX-66 para o sisal, e 46,8ºC e 25,1% para o juá (Figuras 46 A e B). Com estas condições determinadas, foi realizada uma cinética de adsorção, alcançando um máximo de remoção de Triton X-100 e compostos fenólicos e um mínimo para as saponinas em 30 min (Figuras 47 A e B).

Tabela 28 – Comparação dos rendimentos (saponinas, fenóis e açúcar redutores totais) da extração de saponinas de juá e de sisal utilizando planejamento composto central

Ensaios	Concentração (%)	T (°C)	Remoção Juá (%)			Remoção Sisal (%)		
			Triton	Saponinas	Fenóis	Triton	Saponinas	Fenóis
1	10	30	18,7	17,0	12,3	15,0	17,5	38,3
2	10	50	13,5	16,9	20,9	22,9	13,1	31,9
3	30	30	36,7	29,5	26,5	44,6	30,4	38,3
4	30	50	38,5	32,4	37,4	44,8	30,4	54,5
5	5,86	40	12,2	13,6	18,4	12,1	3,4	23,7
6	34,14	40	38,8	35,9	36,6	50,3	33,0	59,7
7	20	25,86	27,7	28,0	30,1	32,1	21,4	41,7
8	20	54,14	33,6	24,5	24,5	30,2	23,2	33,8
9 (C)	20	40	28,3	20,5	26,5	29,4	16,5	44,3
10 (C)	20	40	26,8	18,8	24,3	26,5	17,9	39,4
11 (C)	20	40	27,7	15,7	21,2	25,6	17,2	44,5

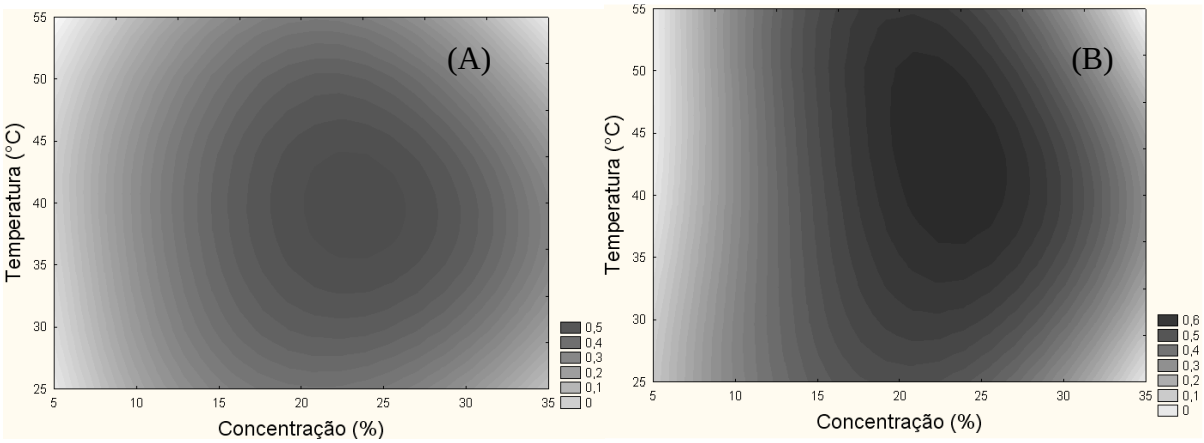


Figura 46 – Otimização da remoção de TritonX-100 das fases supramoleculares de sisal (A) e juá (B)

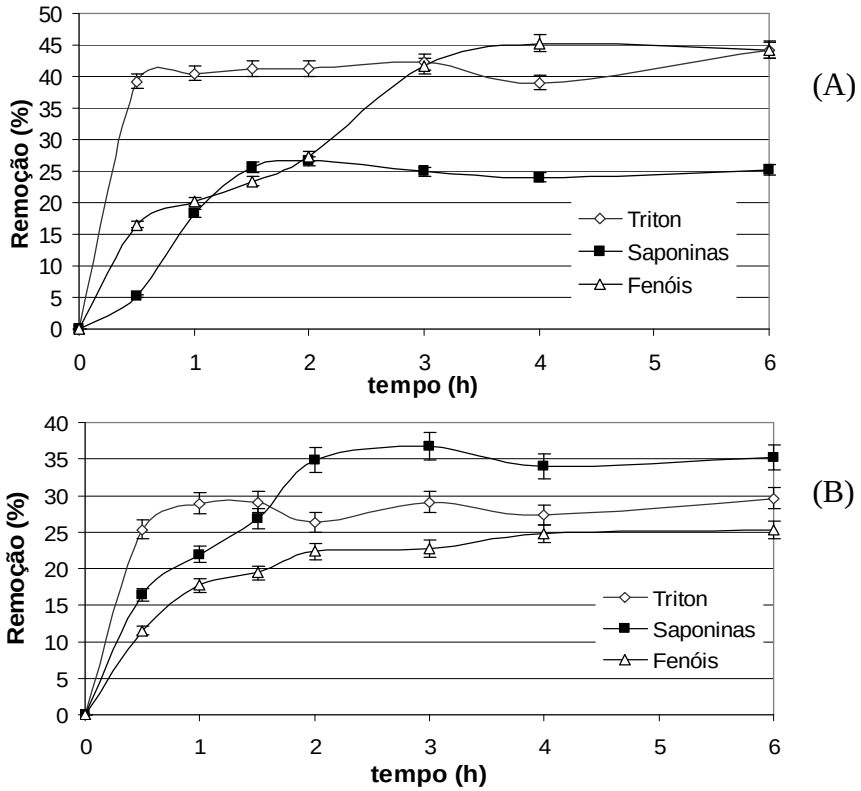


Figura 47 - Cinética de adsorção de Triton X-100 nas fases supramolculares de sisal (A) e juá (B)

Na Tabela 29, foram avaliados os resultados no reciclo de Amberlite FPX-66, onde o extrato 1 seria a fase supramolecular com as saponinas de juá e de sisal; extrato 2 seria o extrato 1 depois do tratamento com o adsorvente nas condições previamente determinadas; extrato 3 seria o extrato 2 após o tratamento com o adsorvente reciclado (lavado duas vezes com etanol em condições similares a adsorção); e extrato 4 seria extrato 3 repetindo o mesmo tratamento.

Tabela 29 – Avaliação do reciclo de adsorvente para remoção de Triton X-100

Extratos	Remoção Juá (%)					Remoção Sisal (%)				
	Triton	Saponinas	α_{SAP}	Fenóis	Volume	Triton	Saponinas	α_{SAP}	Fenóis	Volume
1	0	0	14,2	0	0	0	0	20,3	0	0
2	28,12	16,42	11,6	35,18	28,67	39,25	20,22	17,8	37,37	28,67
3	44,72	28,26	10,7	59,33	62,67	69,83	42,18	12,0	78,76	62,67
4	70,81	33,81	10,6	73,10	81,33	100	50,81	6,6	97,60	81,33

Assim, após 3 processos de adsorção, no caso do sisal, 100% do Triton X-100 e 97,6% dos compostos fenólicos foram removidos, permanecendo em solução 49,19% das saponinas com um reduzido fator de pré-concentração de 6,6, enquanto para o juá, seria necessário mais um processo de adsorção para remoção completa do Triton, sendo que com três processos a remoção foi 70,81%, permanecendo em solução 66,19% de saponinas e 26,9% de compostos fenólicos, e um α de 10,6.

4.4.1.3) Alternativas ao Triton

Como o Triton X-100 tem um custo elevado, outros surfactantes e PEGs foram testados como alternativas, comparando o fator de concentração e o coeficiente de partição na extração bifásica aquosa. Na Tabela 30, pode ser verificado que até mesmo sem nenhum surfactante ou PEG ocorre a separação bifásica, mas sem grandes resultados. Isso pode ser explicado pela presença de etanol, que juntamente com uma alta concentração salina forma duas fases (Greve & Kula, 1991; Wang *et al*, 2010a, b). Este sistema já foi testado por Tianwei *et al* (2002) para recuperação de glicirrizina, conseguindo um coeficiente de partição de 26 num sistema 60% etanol e 15% fosfato dibásico de potássio. Outra possibilidade seria substituir o sal pelo álcool na presença de Triton X-100, como fez Sun *et al* (2007b), no qual substituíram NaCl por isobutanol, a 75ºC e pH 2,5, alcancando um coeficiente de partição de 171 de ácido glicirrízico.

Dentre as alternativas, os Tweens apresentaram bons resultados com a saponina do sisal, provavelmente formando micelas mistas, onde a tensão superficial e a CMC são menores do que as micelas geradas com cada surfactante individualmente (Jian *et al*, 2011), mas com as do juá obtiveram um fator de pré-concentração baixo, talvez devido à presença dos grupos sulfatos.

Assim, o Triton interage com as saponinas de modo tão eficiente, que obteve os melhores resultados. Similarmente ao Tween, também forma uma micela mista com as saponinas levando a diminuição do número de agregação e um comportamento não-ideal do CMC da micela mista (Majhi *et al*, 1999) e alterando suas propriedades como o aumento da temperatura do ponto de névoa (Chaterjee *et al*, 2002; Qiao & Easteal, 1998), visto que neste trabalho uma separação somente com o aumento de temperatura não foi alcançada.

Tabela 30 – Avaliação de alternativas ao Triton X-100 para separação bifásica aquosa de saponinas

Sais	K_{SAP} Juá	K_{FEN} Juá	α Juá	V Juá	K_{SAP} Sisal	K_{FEN} Sisal	α Sisal	V Sisal
Na_2CO_3	11,16	6,32	0,50	1,09	2,82	2,73	0,35	1,05
Span 20	5,34	2,19	0,54	0,78	6,57	3,35	0,85	0,92
Span 80	7,90	3,07	0,71	1,03	1,14	4,10	0,99	0,74
Tween 20	26,46	3,76	0,81	0,87	16,96	2,12	10,96	0,87
Tween 80	23,14	1,50	2,15	1,2	23,93	1,74	9,84	0,78
Triton X-100	315,25	1,67	14,20	0,92	35,29	1,61	20,27	0,78
PEG 2000	10,41	1,54	1,02	1,66	6,84	1,88	0,89	0,92
PEG 4000	12,81	1,89	1,01	1,56	5,61	1,61	0,67	0,92
PEG 6000	19,45	1,89	1,09	1,66	10,46	2,20	0,98	0,92

4.4.2) Coluna de Espuma

O método da coluna de espuma se baseia na adsorção de surfactantes na superfície hidrofóbica das bolhas de ar, e apresenta algumas vantagens para concentração de saponinas como equipamento simples (coluna de vidro acoplada a um compressor de ar), baixo custo e consumo de energia (Backleh-Sohrt *et al*, 2005; Yan *et al*, 2011). Inicialmente, neste método, foram utilizados extratos de juá e de sisal obtidos pela extração orbital simples com mais duas reextrações no planejamento composto central exploratório; mas no caso do sisal, nenhuma condição promoveu a formação de espuma suficiente para ser recolhida. Assim, para o sisal, foi utilizado só o extrato simples, sem re-extrações. As variáveis de resposta neste método foram relação da concentração de saponinas e de compostos fenólicos entre a espuma e o extrato (solução inicial), sendo o fator de concentração (β); a relação em massa de saponinas e de compostos fenólicos obtida na espuma e a massa inicial no extrato, sendo a recuperação (R%); e a relação entre o volume de espuma e o volume residual, sendo a razão volumar (V). Resultados com $\beta = 0$, representam uma espuma instável, que se forma pouco e sem recolhimento, enquanto $\beta = 1$, significam que toda a solução inicial foi recolhida como espuma, não ocorrendo concentração. Na Tabela 31, pode ser verificado que a concentração de saponinas é muito importante, sendo necessária uma faixa entre 8 e 50% de concentração das saponinas no extrato de juá (6,97 g/L), e valores acima de 75% quando relacionados ao extrato de sisal (4,58 g/L).

Tabela 31 – Resultados do planejamento exploratório para concentração de saponinas por coluna de espuma

Ensaios	Vol (mL)	Vazão Ar (mL/min)	Sap (%)	JUÁ					SISAL				
				β_{SAP}	$\%R_{SAP}$	β_{FEN}	$\%R_{FEN}$	V	β_{SAP}	$\%R_{SAP}$	β_{FEN}	$\%R_{FEN}$	V
1	70	600	25	1,024	52,66	1,033	53,11	1,059	0	0	0	0	0
2	70	600	75	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
3	70	1000	25	1,002	78,71	1,017	79,90	3,667	0	0	0	0	0
4	70	1000	75	1	100	1	100	∞	1,693	0,36	1,175	0,25	0,0021
5	100	600	25	1,491	20,87	1,201	16,81	0,163	0	0	0	0	0
6	100	600	75	1	100	1	100	∞	1,911	0,86	1,258	0,57	0,0045
7	100	1000	25	0,977	73,75	1,044	78,85	3,082	0	0	0	0	0
8	100	1000	75	1	100	1	100	∞	1,626	0,41	1,425	0,36	0,0025
9	60	800	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
10	110	800	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
11	85	460	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
12	85	1140	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
13	85	800	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	85	800	92	1	100	1	100	∞	1,316	4,33	1,418	4,67	0,0338
15 (C)	85	800	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
16 (C)	85	800	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0
17 (C)	85	800	50	1	100	1	100	∞	0	0	0	0	0

β_{SAP} e β_{FEN} são os fatores de concentração de saponinas e compostos fenólicos, respectivamente;
$\%R_{SAP}$ e $\%R_{FEN}$ são as recuperações em massa de saponinas e compostos fenólicos, respectivamente;

Assim, foram redefinidos os planejamentos experimentais e as condições ótimas foram obtidas através da abordagem *desirability*, com o objetivo de maximizar β_{SAP}, ter valores intermediários de recuperação de saponinas, já que valores muito altos representam baixa concentração destas, e a razão volumar mínima, mas sem alcançar o zero, obtendo então R^2 iguais a 0,731, 0,944 e 0,832 relacionados a β_{SAP}, $\%R_{SAP}$ e V referentes ao juá, e 0,871, 0,752 e 0,701, similarmente referente ao sisal.

A influência dos termos sobre as variáveis de resposta foi bastante relativo. No planejamento referente as saponinas de juá, o termo de interação entre vazão e concentração de saponinas teve impacto positivo em todas as variáveis, enquanto os demais termos tem ação inversa sobre $\beta_{SAP,}$ $\%R_{SAP}$ e V. Exemplos são os termos lineares de concentração de saponinas e de vazão que apresentaram efeito positivo sobre $\%R_{SAP}$ e V, mas negativo em relação a β_{SAP}, ou então os termos linear e quadrático de volume, termo quadrático de vazão e termo de interação entre volume e concentração que agiram negativamente sobre $\%R_{SAP}$ e V, mas sendo positivo em relação a β_{SAP}. Já o termo de interação entre volume e vazão que obtiveram efeito negativo sobre β_{SAP} e V, mas positivo sobre $\%R_{SAP}$, e ação inversa quando o termo é o quadrático da concentração. Na Figura 48, pode ser visto o comportamento da função *desirability* frente as variações de vazão, volume e concentração relativa de saponinas, obtendo como condição ótima de trabalho: 125 mL, 940 mL/min e 30% de concentração.

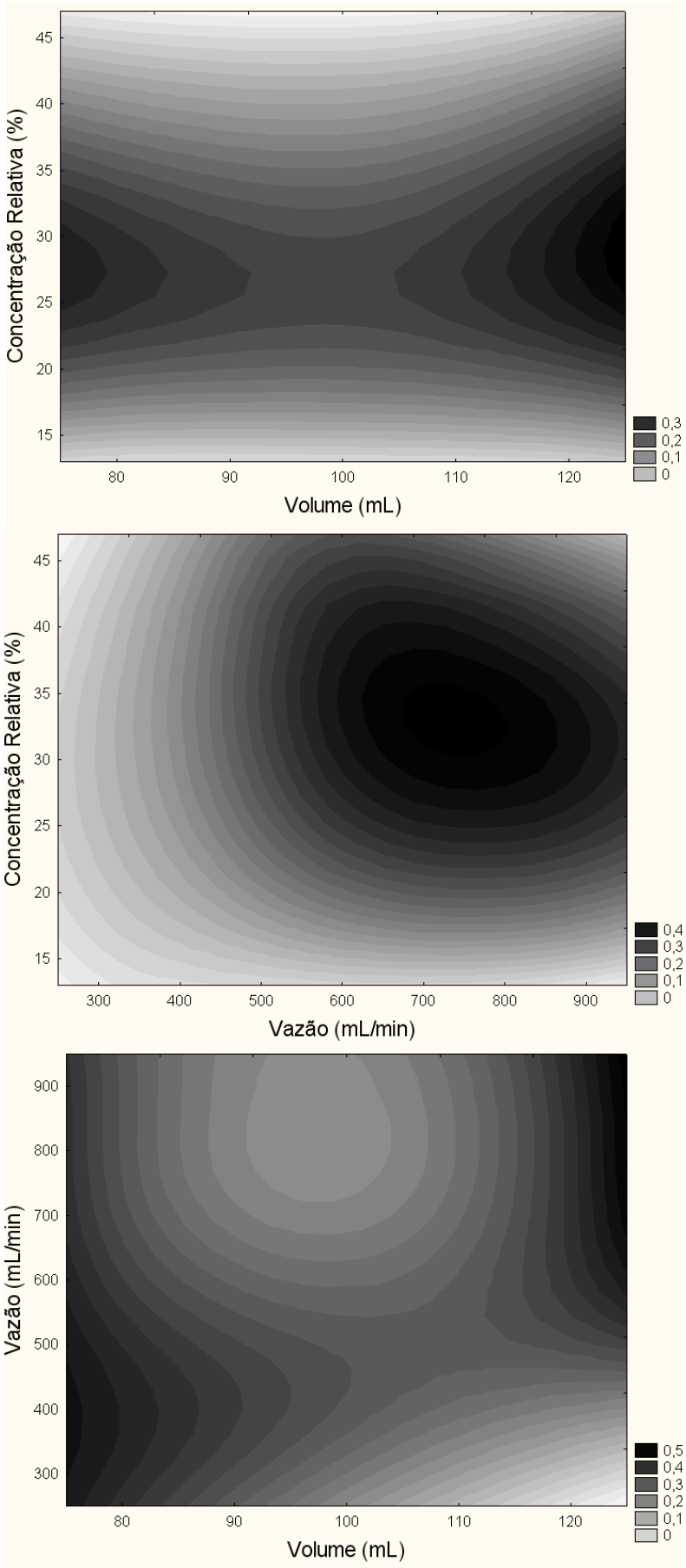


Figura 48 – Otimização dos parâmetros da concentração de saponinas de juá por coluna de espuma

No planejamento referente as saponinas de sisal, o termo de interação entre vazão e concentração e entre volume e vazão tiveram impacto negativo, e o termo quadrático da vazão teve efeito positivo em todas as variáveis, enquanto os demais termos tem ação inversa sobre β_{SAP}, $\%R_{SAP}$ e V. Exemplos são os termos linear de vazão e a interação entre volume e concentração que apresentaram efeito positivo sobre $\%R_{SAP}$ e V, mas negativo em relação a β_{SAP}, ou então os termos linear e quadrático de concentração e o termo linear de volume, agiram negativamente sobre $\%R_{SAP}$ e V, mas sendo positivo em relação a β_{SAP}. Já o termo quadrático de volume obteve efeito positivo sobre β_{SAP} e $\%R_{SAP}$, mas negativo sobre V. Na Figura 49, pode ser visto o comportamento da *desirability* frente as variações de vazão, volume e concentração relativa de saponinas, obtendo como condição ótima de trabalho: 75 mL, 1300 mL/min e 90% de concentração.

Estes resultados obtidos são um pouco diferentes dos da literatura. Backleh-Sohrt e colaboradores (2005) utilizaram uma vazão de N_2 de 15 mL/min, com uma concentração inicial de saponinas de quilaia entre 0,4 e 0,5 g/L, volumes entre 70 e 100 mL e tempo de operação entre 60 e 100 min. Similarmente, Costa (1999) também trabalhou com uma vazão de N_2 de 13,6 mL. Já Yan e colaboradores (2011) usaram uma vazão de ar de 150 mL/min, com uma concentração inicial de saponinas de chá de 3,56 g/L e volume de 200 mL (mas a coluna tinha 3,3 cm de diâmetro interno). Para comparar dados de vazão com gases diferentes, é necessária uma padronização, considerando informações sobre temperatura e pressão do gás, onde uma bala de N_2, por exemplo da White Martins, possui de 145 a 190 atm de pressão, representando assim em temperatura ambiente uma vazão mínima de ar de 2000 mL/min, considerando 15 mL/min de N_2. Assim, de 150 a 2000 mL/min é uma faixa próxima da que foi trabalhada na tese.

O CMC e o volume da solução inicial com saponinas também influenciam na operação da coluna de espuma. Costa (1999) testou soluções com saponinas de quilaia em várias concentrações e volumes, e verificou que concentração acima do CMC (0,8 g/L), o fator de concentração era apenas de 1,18 em 7 h de operação, no CMC (0,2 g/L) em 10 h de operação, obteve um β_{SAP} = 9,63, e abaixo do CMC (0,08 g/L), alcançou 10 x vezes mais concentrado em 2 h, todos com o mesmo volume, representando 85% do volume total da coluna, mas utilizando um volume de 50% com concentrações abaixo de 0,08 g/L, a espuma formada não era estável e não podia ser coletada. Isso explica a impossibilidade de se trabalhar com extrato de sisal com mais 2 reextrações.

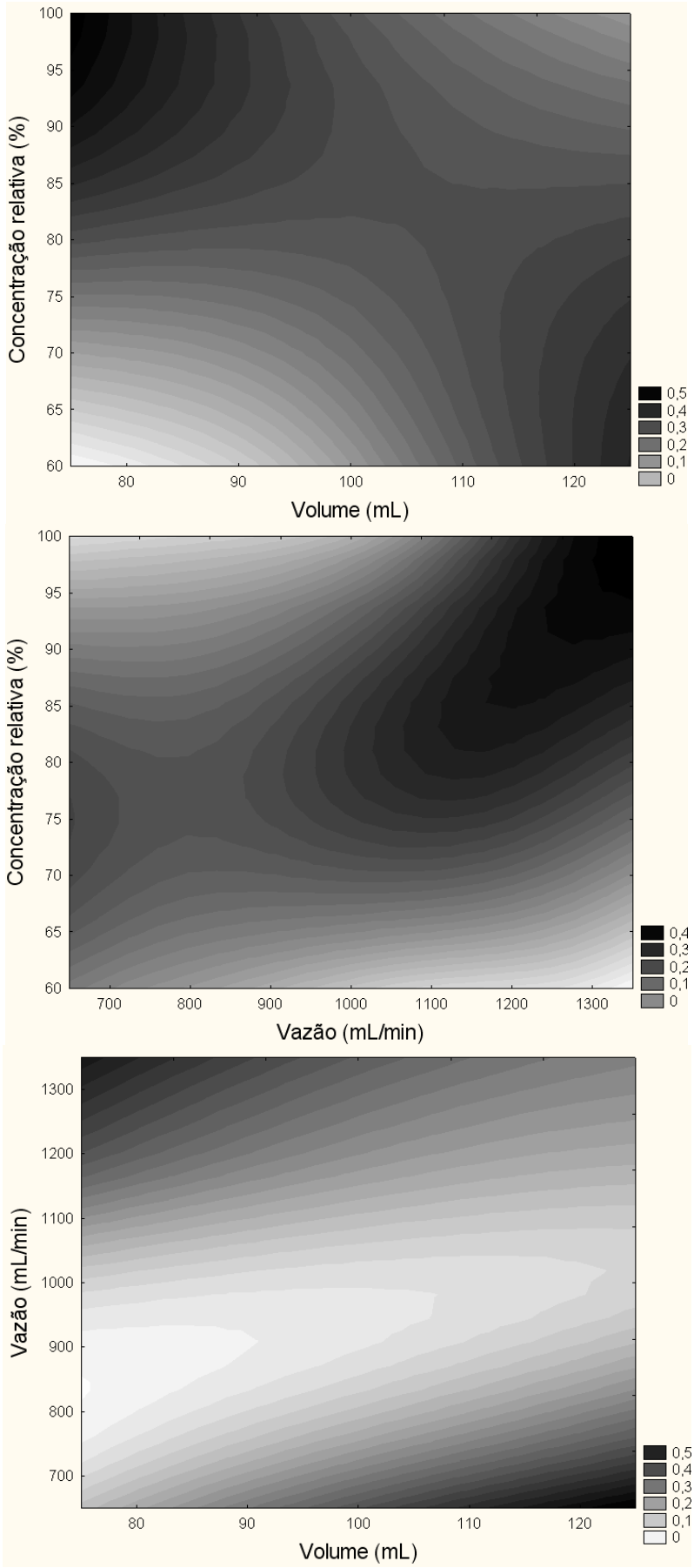


Figura 49 – Otimização dos parâmetros da concentração de saponinas de sisal por coluna de espuma

Assim, como menores vazões poderiam possibilitar maiores fatores de concentração para as saponinas, devido a um maior tempo para drenagem do líquido da espuma formada, foram testadas novas vazões a partir das condições ótimas obtidas no planejamento, como pode ser observado nas Figuras 50 A e B. Nesse caso, o foco seria principalmente em aumentar o β_{SAP}, deixando como fator secundário a recuperação das saponinas, devido ao pouco tempo de operação, obtendo então as vazões para a concentração das saponinas de juá e sisal de 400 e 800 mL/min, respectivamente.

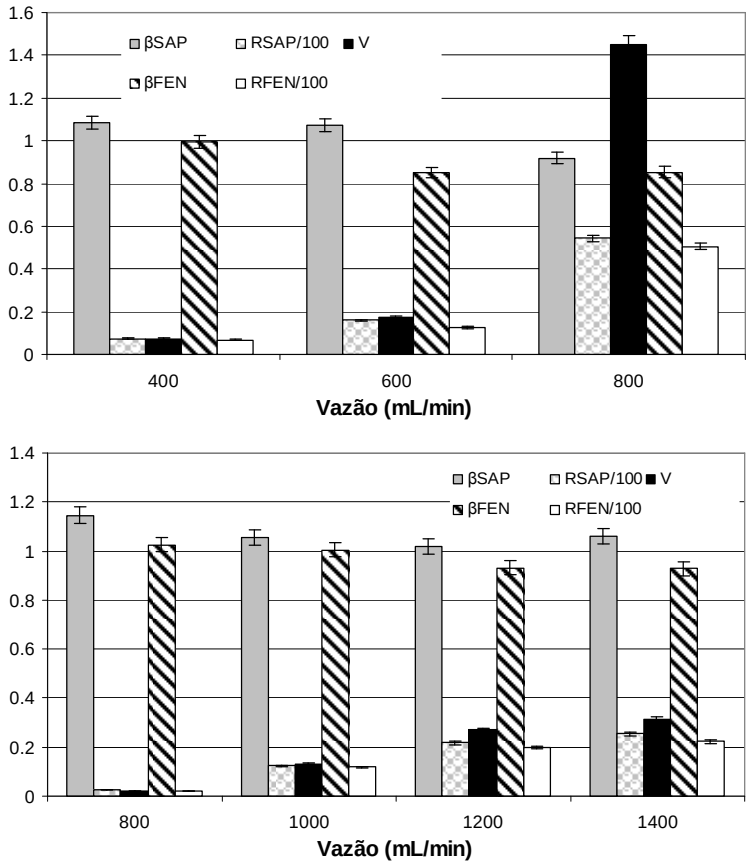


Figura 50 – Avaliação da vazão para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma

Outras parâmetros também foram testados como pH e presença dos anéis de Raschig, mas com as vazões de 600 e 1000 mL/min para as saponinas de juá e de sisal respectivamente, que podem ser visualizados nas Figuras 51 e 52. Em relação ao pH, foi observado que o perfil de variação das recuperações de saponinas e compostos fenólicos e razão volumar foi similar para ambas as saponinas, mas o fator de concentração para saponinas apresenta valores máximos diferentes em 4 e 5, referente ao juá e sisal, enqaunto o β_{FEN} tem máximos em 10 e 11 para o juá, e 4, 5 e 8 para o sisal. Já os anéis de Raschig foram utilizados com o objetivo de aumentar a área interfacial e a transferência de massa entre a fase gasosa (ar) e a fase líquida (extrato), facilitando assim a adsorção das saponinas nas bolhas. A presença de 25 g de anéis de Raschig promoveu o maior aumento do β_{SAP}.

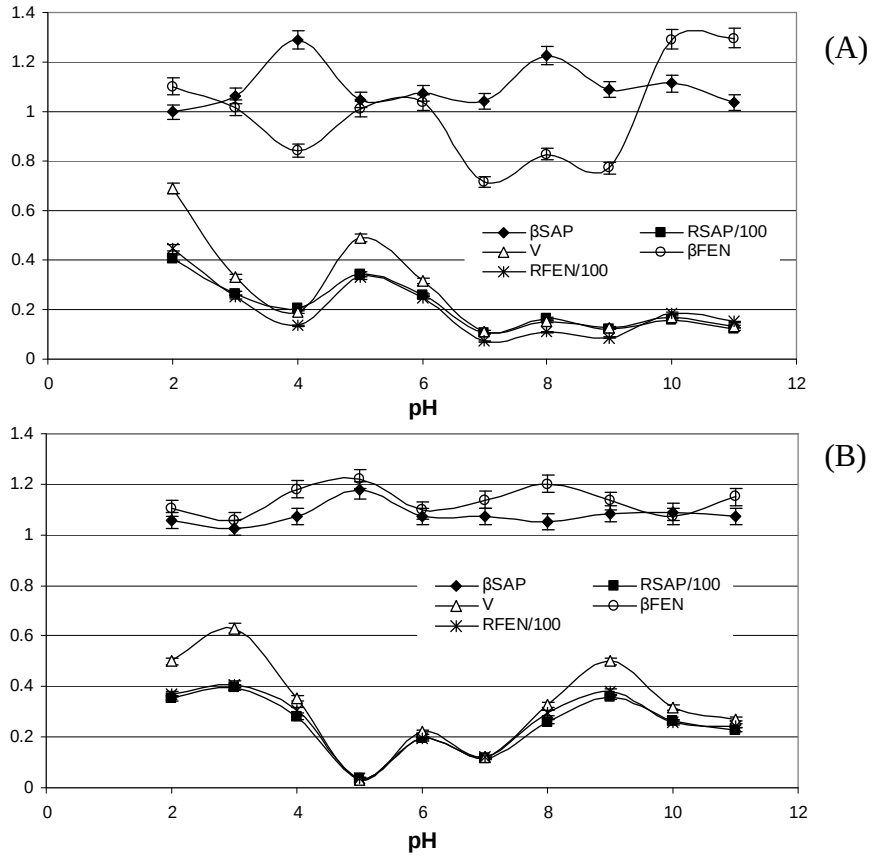


Figura 51 - Avaliação de pH para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma

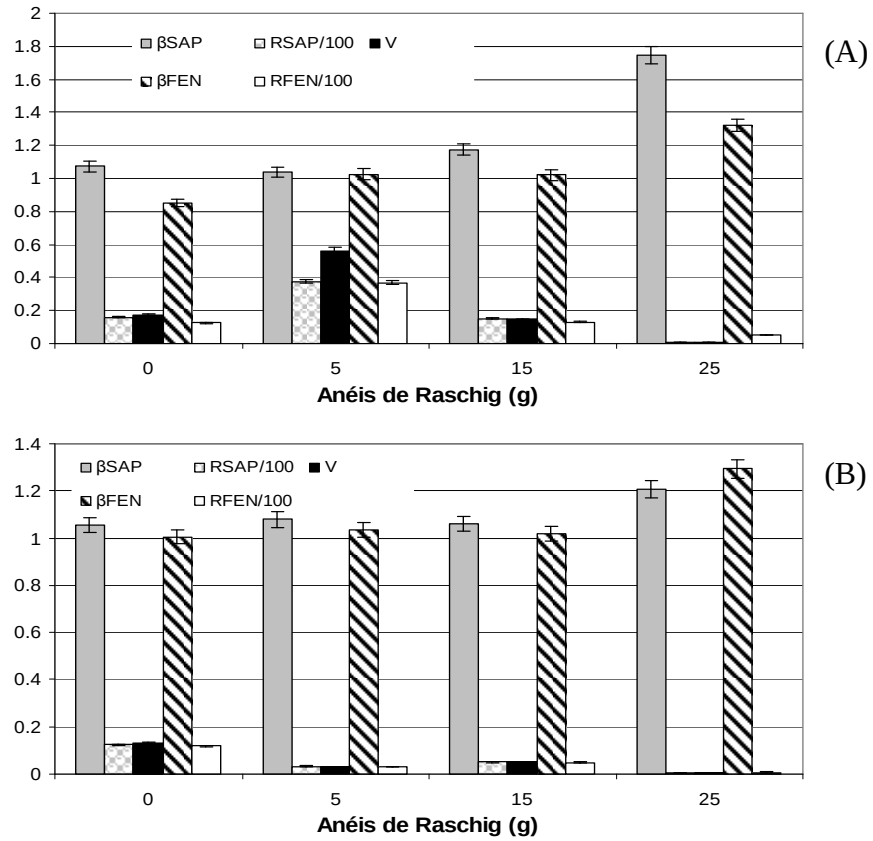


Figura 52 - Avaliação da presença de anéis de Raschig para concentração de saponinas de juá (A) e sisal (B) por coluna de espuma

O pH também demonstrou sua importância em outros trabalhos, devido ao seu efeito na energia de rede e na força repulsiva entre as moléculas, e na CMC. Yan *et al* (2011) relataram que o aumento do pH diminui a tendência das saponinas do chá de se adsorverem nas bolhas de ar, e aumenta a estabilidade da espuma formada, devido a uma maior viscosidade gerada pela carga negativa formada a partir de grupos carboxilas da saponina. Assim em pH 2,06, houve um maior β_{SAP} e uma menor recuperação de saponinas. Costa (1999) verificou também que o aumento de pH junto com a variação da concentração de saponinas de quilaia impactava na β_{SAP}, onde com 80 mg/L obteve fatores de 10, 7,4 e 6,97 quando o pH variou de 3, 5 e 7, e com o aumento na concentração de saponinas em pH 5, de 80, 350 e 800 mg/L, o β_{SAP} variou entre 7,4, 1,93 e 1,24.

Como um máximo fator de concentração de saponinas e recuperação destas não são possíveis nas mesmas condições, foi realizado um estudo da cinética de operação da coluna de espuma, focando principalmente no β_{SAP}, tendo uma vazão mínima para formação de espuma estável e possível de ser coletada, com um sistema gradiente objetivando manter a vazão de espuma gerada. Além disso, foram utilizados extratos já concentrados, substituindo o extrato do resíduo mucilaginoso de sisal pelo resíduo líquido de sisal, e o extrato de juá pela fase supramolecular gerada pela adição de 20% de Na_2CO_3, sendo 1,57 vezes mais concentrado. O processo ocorreu sempre com a formação de espuma estável de forma organizada (Figura 53A), sendo recolhida com aspecto viscoso (Figura 53B), onde a estrutura da espuma ficou heterogênea pela inserção de bolhas maiores (Figura 53 C) e com maior tempo de processo, a espuma apareceu esparsa pela coluna (Figura 53 D). No caso do juá (Figura 54 A e B), foi alcançado em 9 h de operação, uma β_{SAP} de 3,46, e uma recuperação de 82,6% de saponinas, enquanto no sisal (Figuras 55 A e B), em 4,5 h de operação, foi obtido um fator de concentração de 1,98, e uma recuperação de 90,5%.

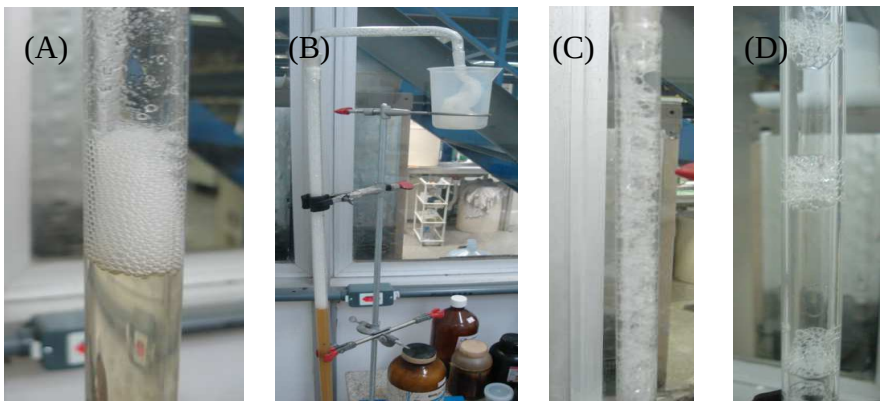


Figura 53 – Operação de coluna da espuma. (A) Formação da espuma, (B) Coleta, (C) Início de instabilidade da espuma e (D) Fim do processo

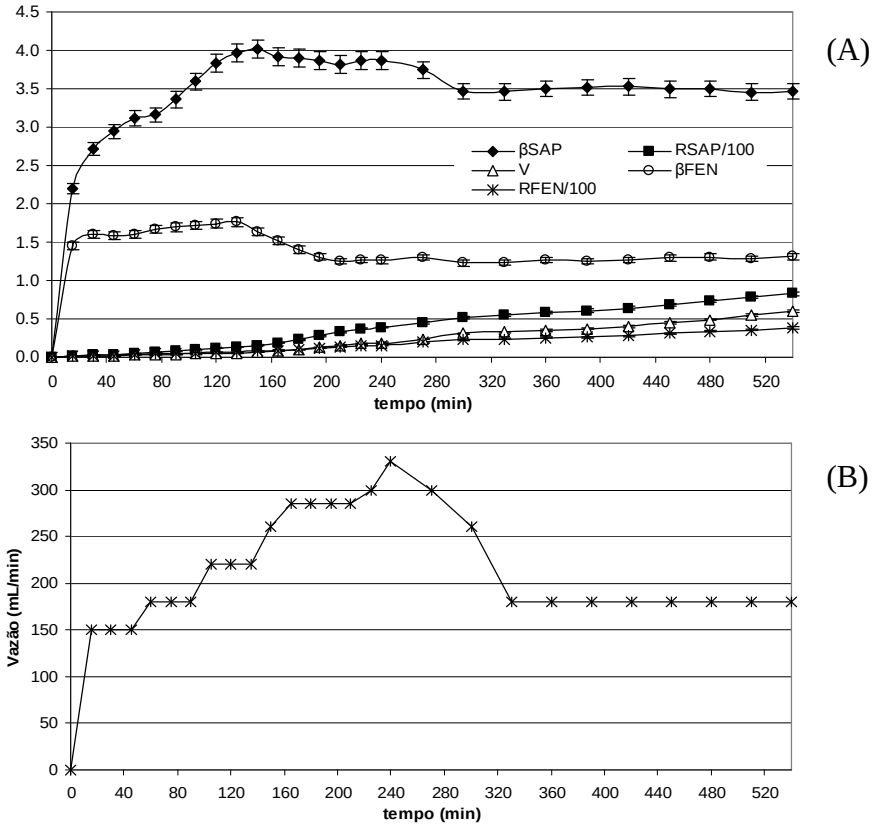


Figura 54 – Cinética de concentração de saponinas de juá por coluna de espuma (A) utilizando um gradiente de vazão de ar (B)

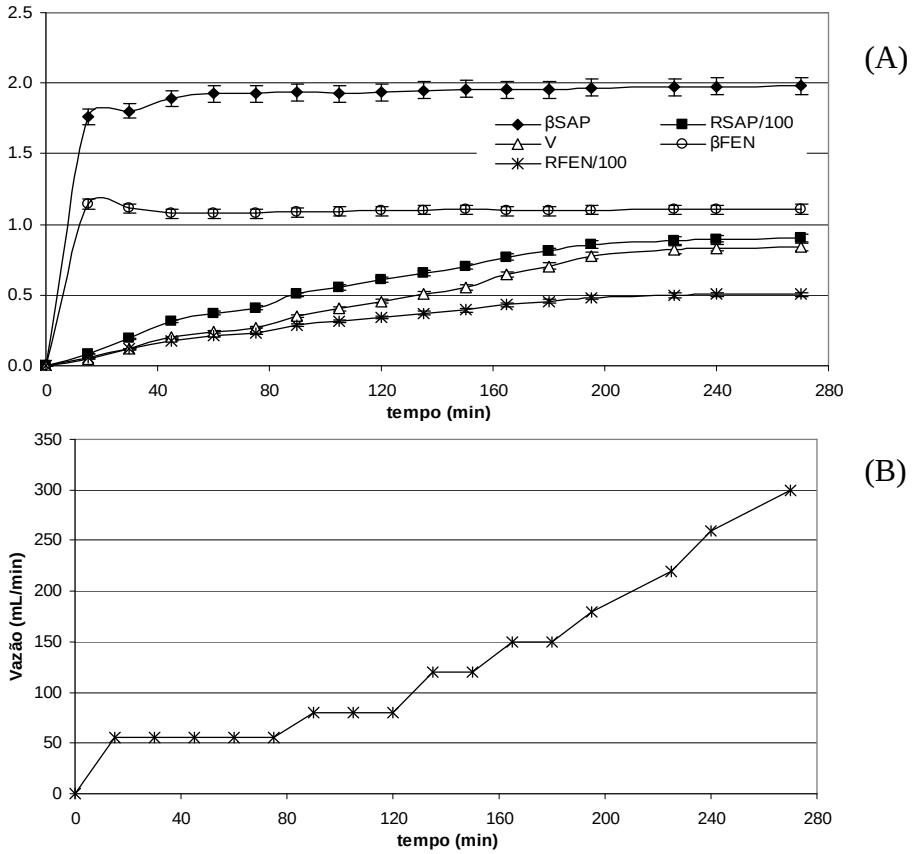


Figura 55 - Cinética de concentração de saponinas de sisal por coluna de espuma (A) utilizando um gradiente de vazão de ar (B)

4.4.3) Separação por Membranas

Os processos de concentração por microfiltração, ultrafiltração e nanofiltração utilizam membranas semi-permeáveis e pressão, tendo algumas vantagens em relação aos processos convencionais de separação, como operação a temperaturas brandas, diminuindo custos energéticos e evitando a degradação de componentes sensíveis; seletividade da membrana, e a simplicidade de operação e escalonamento (Baldasso, 2008). Nesta tese, foi utilizada a mesma membrana de polietersulfona de 10 kDa para a concentração das saponinas de juá e de sisal (Figura 56), sendo os extratos previamente filtrados para remoção de particulados de macromoléculas. Apenas no uso do resíduo líquido de sisal, foi realizada a remoção dos particulados por meio de microfiltração.

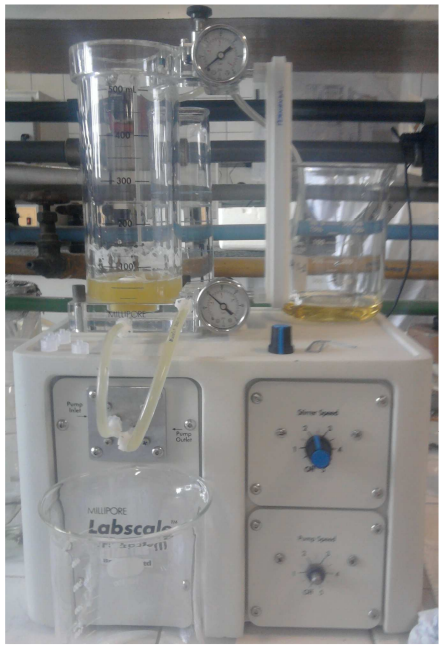


Figura 56 – Operação de um sistema de ultrafiltração em escala de bancada

Na Figura 57, é apresentada a cinética de concentração por ultrafiltração do extrato de juá, de sisal e do resíduo líquido de sisal (RLS). O volume inicial de extrato foi de 100 mL, e o objetivo inicial era alcançar 10 mL de concentrado, mas isso só foi possível com o RLS (30 min), os demais extratos (juá obteve 50 mL de concentrado em 2 h, e o sisal obteve 17 mL em 75 min) promoveram um aumento de pressão no equipamento provalvemente por colmatação na membrana. Assim, ao final do processo, o β_{SAP} para as saponinas de juá foi 1,42, com uma recuperação de 71%, enquanto para o sisal o fator de concentração foi 1,58 muito similar ao do RLS que foi 1,55, mas obtiveram recuperações distintas, 27 e 15,5%, respectivamente. San Martín *et al* (2008) justificaram o uso do sistema de ultrafiltração com membranas de 10 kDa devido a formação de micelas, indicando o uso de extratos que contenham concentrações de saponinas maiores ou iguais a CMC. O uso de microfiltração anterior a ultrafiltração, de volumes iniciais maiores ou então de nanofiltração poderiam ser mais efetivos no aumento de β_{SAP}.

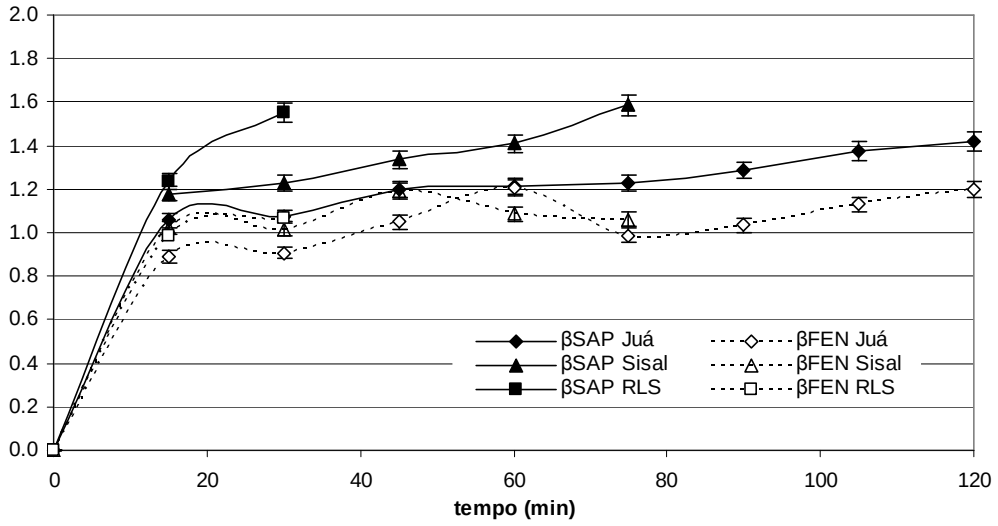


Figura 57 – Cinética de concentração de saponinas por ultrafiltração

4.4.4) Resumo

Comparando os métodos de concentração (Tabela 32), pode ser verificado que o método por ponto de névoa foi o mais eficaz dentre os métodos estudados tanto na concentração das saponinas quanto em relação à seletividade, mesmo considerando que no caso do juá haveria a necessidade de mais uma etapa de remoção de Triton X-100 com Amberlite FPX-66, o que faria a recuperação e β_{SAP} diminuírem. A possibilidade de reciclo do adsorvente, com uma dessorção rápida com etanol, favorece a diminuição dos custos desse processo. A coluna de espuma apresenta realmente equipamentos com custo baixo, necessitando apenas de uma coluna e um compressor de ar, e obteve uma boa recuperação das saponinas, mas não alcançou β_{SAP} e seletividade altas. Mesmo assim, tais valores ainda foram superiores ao do processo de separação por membranas. Uma coluna encamisada com uma geometria que favorecesse a drenagem da espuma e com outro tipo de recheio (substituindo os anéis de Raschig) poderia levar a melhores resultados. Provavelmente um processo de nanofiltração ou com membranas < 10kDa, pudessem gerar maiores valores para as variáveis de resposta, concorrendo assim com o método por ponto de névoa.

Tabela 32 – Comparação dos métodos de concentração de saponinas

Métodos	JUÁ			SISAL		
	β_{SAP}	**%R**	**Sap/Fen**	β_{SAP}	**%R**	**Sap/Fen**
Ponto de Névoa	10,6	66,19	542,4	6,6	49,19	1279
Coluna de Espuma	3,46	82,58	2,573	1,98	90,51	1,267
Membranas	1,42	70,99	1,407	1,58	26,95	1,395

4.5) APLICAÇÕES DAS SAPONINAS

4.5.1) Alteração da Atividade Enzimática por Saponinas

As enzimas são proteínas que atuam como biocatalisadores com alta seletividade, e estão presentes em vários organismos, desde bactérias até humanos, sendo possível de serem utilizadas industrialmente. Estas podem ter sua atividade alterada negativamente (inibidores) ou positivamente (ativadores). A ação de inibidores enzimáticos pode ser muito útil no combate de várias enfermidades, como inibidores de aromatase para tratamento de câncer de mama, inibidores de 5α-redutase para tratamento de câncer de próstata ou inibidores do sistema renina-angiotensina para regular a hipertensão (Smith & Simons, 2005). Já os ativadores enzimáticos podem diminuir os custos do uso de enzimas nas indústrias, já que estas poderiam ser utilizadas em menor quantidade.

Nesta tese, foram pensadas duas possíveis aplicações: alimentícia e cosmética. Para a utilização de saponinas em alimentos era necessário saber se estas poderiam inibir as enzimas digestivas. Então, foi tomado como exemplo a pancreatina, que apresenta ação lipásica, amilásica e proteásica, atuando no alimento na área duodenal do trato digestório. Para a aplicação cosmética, foi investigado se as saponinas poderiam inibir alguma das enzimas da matriz extracelular, como a colagenase, que atua no equilíbrio anabólico-catabólico do colágeno, mas com envelhecimento ocorre um desequilíbrio, e a degradação se torna mais rápida do que a síntese. Assim, a inibição da colagenase poderia promover um efeito *anti-aging*. As atividades enzimáticas da pancreatina e da colagenase podem ser observadas na Tabela 33, utilizando sempre uma concentração fixa de 0,5% p/v, sendo estes valores utilizados para padronização nos demais gráficos (Figuras 58-61), correspondendo a 0% na atividade enzimática relativa. Várias concentrações de substratos e de saponinas, de juá e de sisal, foram testadas tanto para pancreatina (Figuras 58, 59 e 60) quanto para colagenase (Figura 61).

Tabela 33 – Atividade enzimática da pancreatina e da colagenase sem adição de saponinas

PANCREATINA						COLAGENASE	
Amido (g/L)	Amilase (mM/min)	Azocaseína (g/L)	Protease (U/L)	p-NFL (mM)	Lipase (μM/min)	Azocaseína (g/L)	Protease (U/L)
1	0.538374	0,25	41	0.101	1.0055	0,25	61.33333
2,5	1.370965	0,5	63	0.252	1.1699	0,5	86.66667
5	2.454694	1	98	0.336	1.7805	1	276.6667
10	3.65162	2,5	314	0.504	2.5201	2,5	470
-	-	-	-	1.01	4.2451	-	-

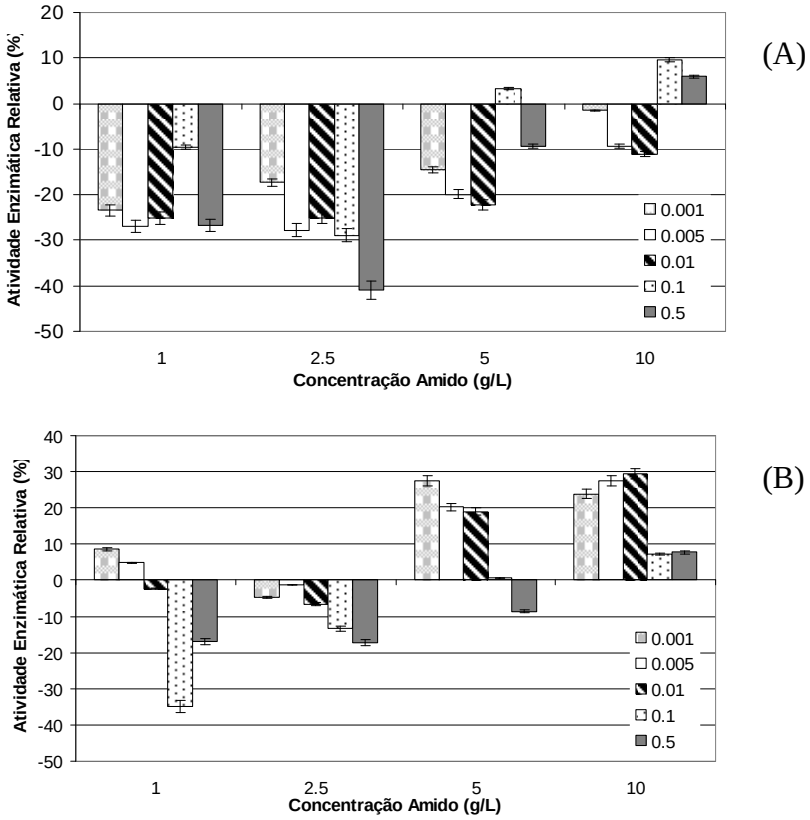
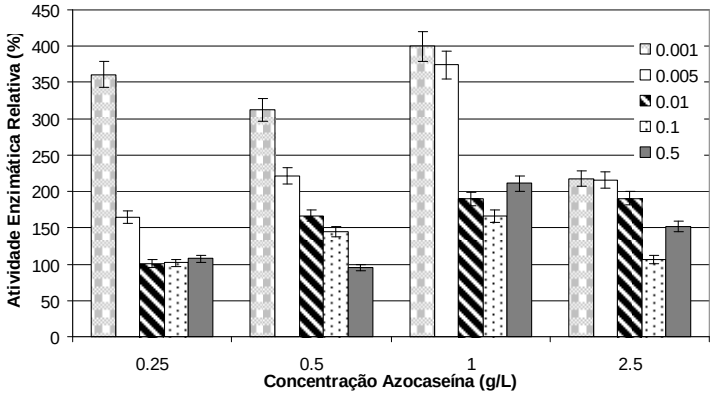


Figura 58 – Alteração da atividade amilásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

Em relação a atividade amilásica da pancreatina sob ação das saponinas de juá, estas promovem a inibição enzimática em concentrações de saponinas até 0,01% em todas as concentrações de amido, mas principalmente com 10 g/L de amido com adição de 0,1 e 0,5% de saponina, houve pequena ativação. Skurtys e Aguilera (2009) investigaram a interação de saponinas de quilaia com amido de batata, indicando que as propriedades interfaciais são alteradas a partir de uma concentração de 0,1 g/L de saponinas e 10 g/L de amido. Assim as micelas formadas na CMC foram modificadas estruturalmente devido a maiores concentrações do polímero, invertendo a ação inibitória para ativadora. Outra opção seria a interação das saponinas com a enzima por interações hidrofóbicas (aglicona triterpênica) e eletroestáticas (grupos sulfatos) modificando sua ação sobre o amido, sendo esta desfavorecida com uma maior quantidade de amido em solução.

Na presença das saponinas do sisal, a atividade amilásica foi inibida com concentrações acima de 0,01% em 1 e 2,5 g/L de amido, e ativada em concentrações abaixo de 0,01% em 1 g/L de amido e, praticamente, com qualquer concentração de saponinas em 5 e 10 g/L de substrato. Neste caso a interação das saponinas com o polissacarídeo parece ser o fator preponderante na ativação enzimática, enquanto a inibição parece ser menor que no caso do juá, talvez pela ausência dos grupos sulfatos quando há formação das micelas.



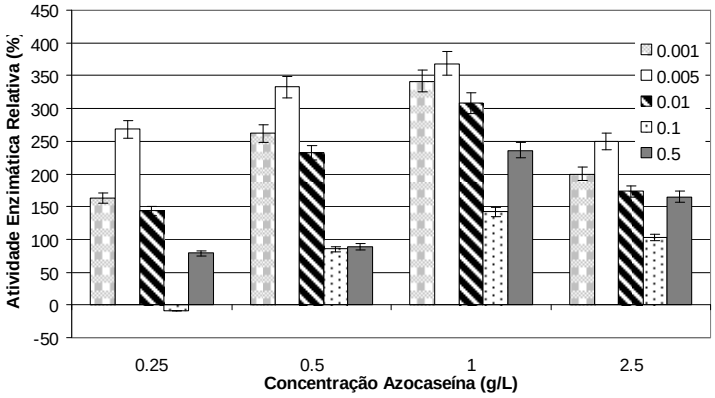
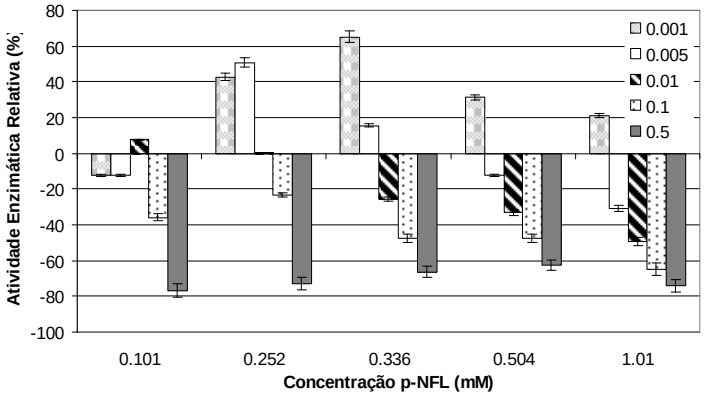


Figura 59 - Alteração da atividade proteásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%



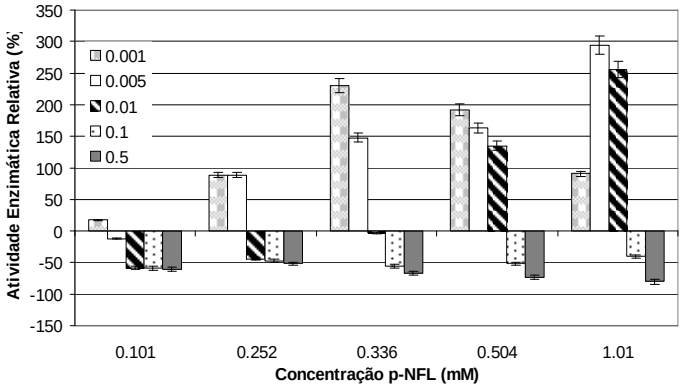


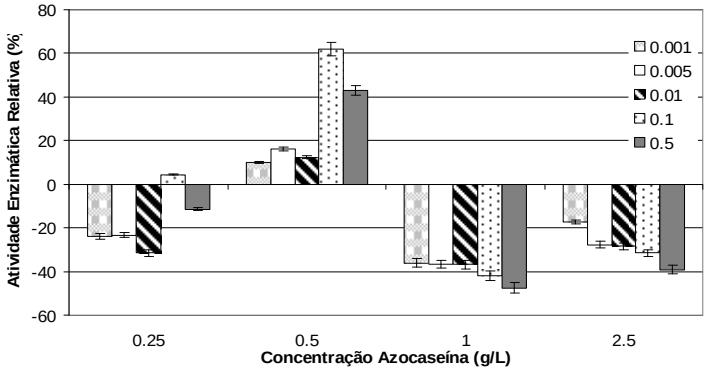
Figura 60 - Alteração da atividade lipásica da pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

No caso da atividade proteásica da pancreatina, tanto as saponinas de juá quanto as do sisal, apresentaram efeito ativador bastante acentuado. A CMC parece apresentar um menor efeito na ativação desta enzima. Outra opção seria que uma interação entre a azocaseína e as saponinas teria facilitado a ação proteolítica, como Shimoyamada *et al* (2000) informaram sobre as proteínas do soro de leite que se tornaram mais sensíveis a ação da tripsina e quimotripsina na presença de soyasaponinas.

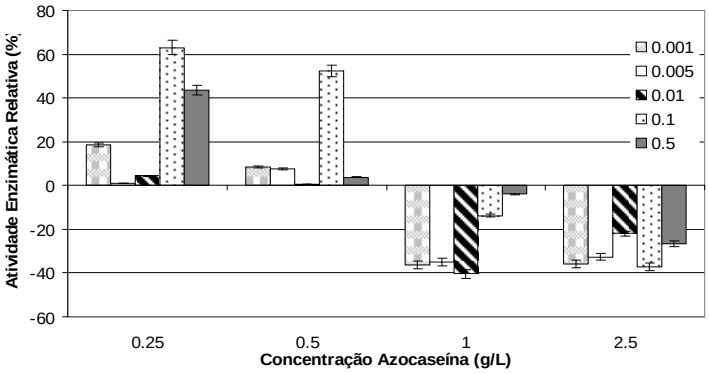
A ação da CMC das saponinas de juá e de sisal ficou realmente evidenciada na atividade lipásica da pancreatina. Acima da CMC, ocorre a inibição quase completa, quanto maior a concentração de saponina. Já abaixo da CMC, principalmente com uma concentração de 0,001% de saponinas, ocorre ativação, sendo este efeito diminuído com o aumento da concentração de substrato. A interação das micelas com a enzima parece alterar muito a sua conformação, prejudicando sua atividade (ver Anexo, Figura 78).

Assim, a aplicação de saponinas em alimentos ricos em proteínas, utilizados como suplementos para aumento de massa muscular em exercícios físicos, poderiam ser interessantes já que promoveriam uma hidrólise mais rápida e gerando mais peptídeos e aminoácidos para serem absorvidos. Outra possível aplicação das saponinas seria como fármacos anti-obesidade, já que podem inibir a ação amilásica e lipásica com concentrações entre 0,1 e 0,5%, evitando que lipídeos e matérias amiláceos sejam hidrolisados e absorvidos, diminuindo o acúmulo de gordura e aumento da concentração de glicose no sangue. Segundo Birari e Bhutani (2007), há um mercado crescente para este tipo de medicamento, calculado em US$ 4 bilhões, principalmente com as várias contra-indicações dos fármacos sintéticos.

A Figura 61 mostra que a aplicação de saponinas como ativo cosmético pode ser possível já que os resultados apresentaram inibição (máximo de 40%) em concentrações de 1 e 2,5 g/L de azocaseína. Neste caso, talvez ocorra uma competição entre a interação da saponina com a azocaseína e desta com a colagenase. Outra opção seria atuação das saponinas sobre o mecanismo de ação da colagenase, que é uma metaloprotease, um pouco diferente das proteases pancreáticas (proteases serínicas), e que na verdade a interação das saponinas seja relacionado ao zinco presente na colagenase.



(A)



(B)

Figura 61 - Alteração da atividade da colagenase por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

4.5.2) Alteração da Atividade Enzimática por Agliconas

Como a ação da pancreatina sobre os alimentos só ocorre após a passagem deste pelo estômago em ambiente ácido, que pode proporcionar a hidrólise das saponinas, foram feitos testes em concentrações fixas dos substratos (amido, 0,1%; azocaseína, 0,025%; p-NFL, 0,504 mM) com diosgenina e agliconas de juá e de sisal (Figura 62).

Comparando as saponinas com as agliconas, a ação sobre pancreatina foi distinta. Sobre a atividade amilásica a inibição só ocorre nas concentrações de 0,1 e 0,5%, tendo ativação nas concentrações menores, independente da aglicona utilizada. A alteração da conformação da enzima pela aglicona deve ser o efeito mais provável. Uma total inversão de atuação ocorre com atividade proteásica quando as saponinas são hidrolisadas, sendo a inibição proporcional a quantidade de agliconas. No caso da atividade lipásica, só ocorre inibição com 0,5% de diosgenina e de aglicona do juá.

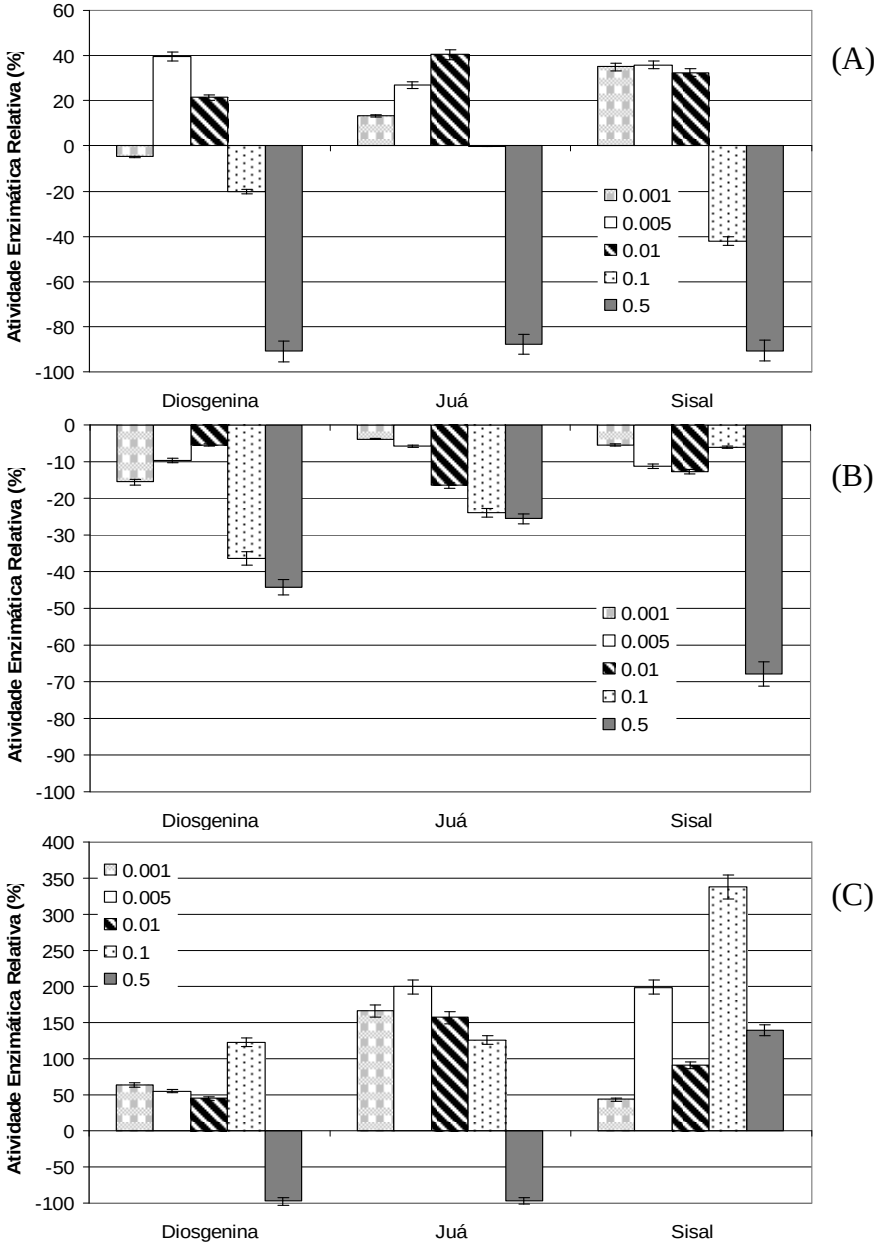


Figura 62 – Alteração da atividade amilásica (A), proteásica (B) e lipásica (C) da pancreatina por diferentes teores de diosgenina e das agliconas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

No caso da colagenase, este procedimento foi testado simulando formulações com prazo longo de validade, em que o ambiente aquoso levemente ácido também pudessem levar a hidrólise de saponinas. As saponinas apresentavam ação ativadora nesta concentração de substrato, fenômeno que é inverso em concentrações maiores de agliconas (Figura 63).

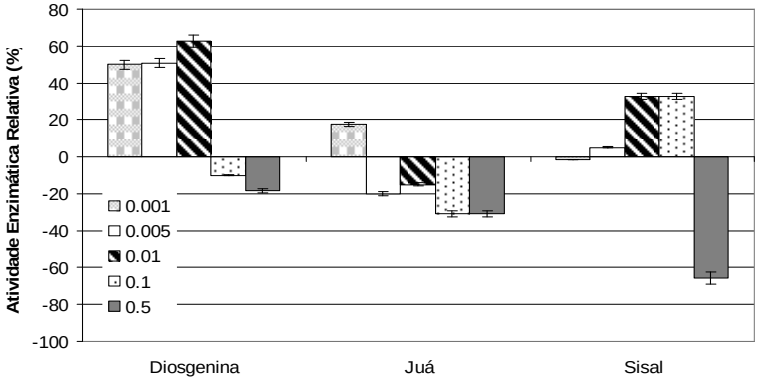


Figura 63 - Alteração da atividade da colagenase por diferentes teores de diosgenina e das agliconas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

4.5.3) Hidrólise enzimática

Como as enzimas podem ser ativadas ou inibidas pelas saponinas, para se ter uma idéia mais clara da sua ação na digestão, foram testados vários substratos diferentes, amiláceos, protéicos e lipídicos, para verificar se a hidrólise destes ocorreria ou não pela pancreatina (Figura 64, 67 e 69). Além disso, foram testadas enzimas comerciais (Papaína, Figura 65; Stargen, Figura 68; e Lipozyme CALB, Figura 70) para verificar se o perfil dos resultados de hidrólise seriam mantidos. No caso da colagenase, foi utilizada gelatina como fonte de colágeno a ser testada a inibição pelas saponinas (Figura 66).

As proteínas podem ser classificadas de acordo com a sua solubilidade: albuminas, solúveis em água; globulinas em soluções salinas; glutelinas em soluções diluídas ácidas e/ou alcalinas; e prolaminas em soluções alcoólicas (Yada, 2004). Os vários substratos utilizados como fontes protéicas tem composições distintas que podem influenciar na ação da enzima, e em uma possível ativação ou inibição pelas saponinas. No leite, há caseínas, β-lactoglobulina e α-lactoalbumina; na carne, proteínas miofibrilares, sarcoplasmáticas e do estroma; ovalbuminas e ovoglobulinas na clara do ovo, e fosvitina e lipovitelinas na gema; β-conglicinina e glicinina na soja, e outras globulinas no feijão; gliadinas e glutelinas no trigo, além do colágeno presente na gelatina (Yada, 2004; Mine, 2008).

Ambas as saponinas apresentaram ação similar sobre a pancreatina na hidrólise destes substratos: inibição em relação as proteínas da carne, leite e gema; ativação sobre feijão, farinha de trigo e gelatina; e sem interferências substanciais na atividade em relação a clara do ovo e a soja. Estes resultados são um pouco diferentes dos obtidos com a azocaseína, mas deve-se perceber que a concentração neste caso (200 g/L) é superior aos anteriormente testados. Além disso, só as fontes protéicas com presença de colesterol foram que apresentaram inibição, indicando que uma possível interação entre saponinas e colesterol tenha sido formada, e afetado a interação destas com a proteína ou com a pancreatina.

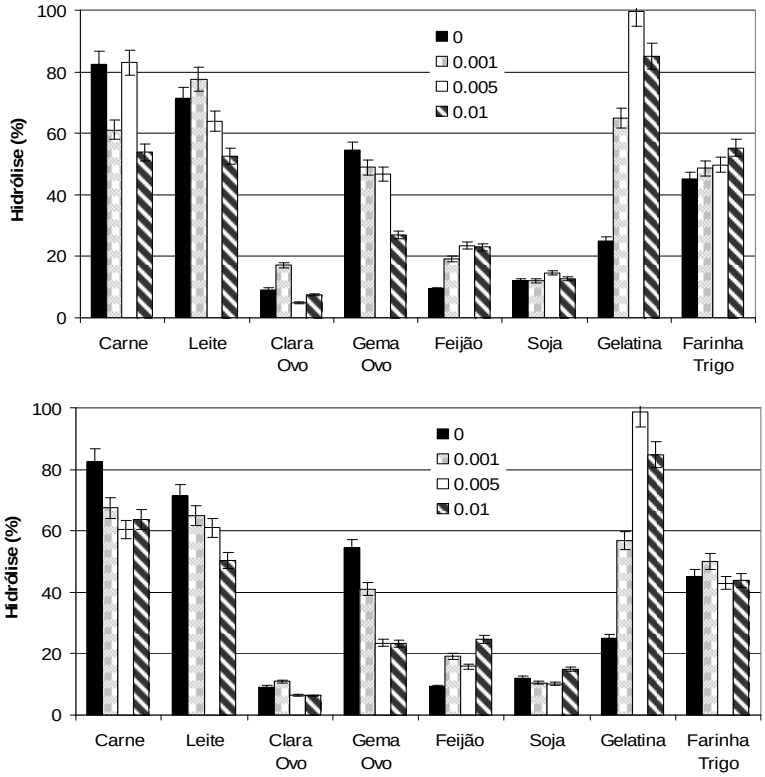


Figura 64 – Hidrólise de materiais protéicos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

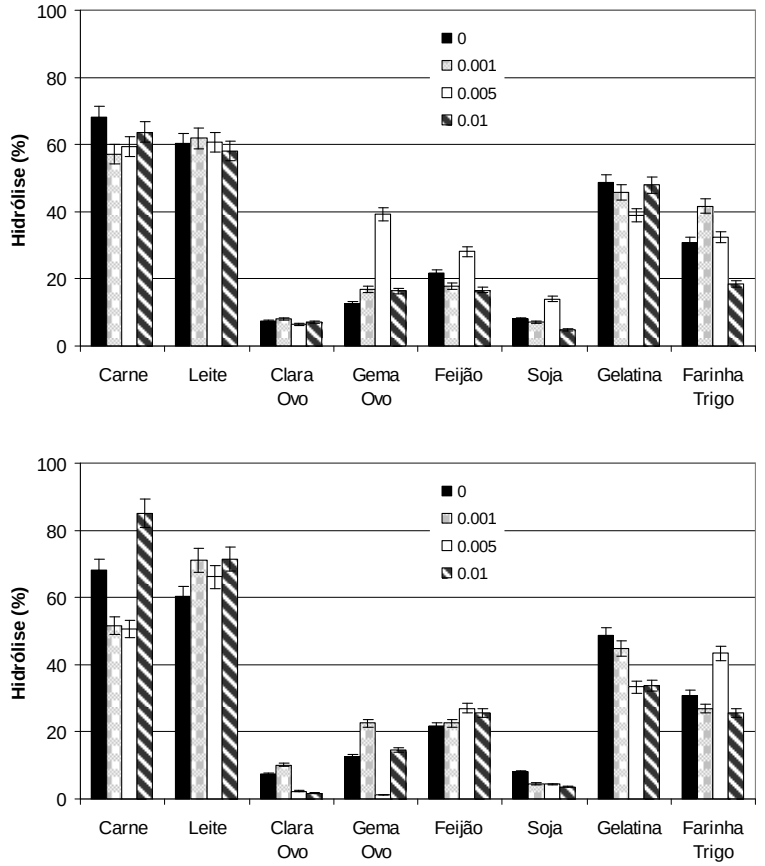


Figura 65 - Hidrólise de materiais protéicos por papaína por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

No caso da papaína, uma cisteinoprotease, que normalmente é utilizada como amaciante de carnes, esta apresentou resultados diferentes da pancreatina, onde as saponinas de juá interferiram pouco em sua ação proteolítica, apresentando ativação com 0,005% de saponinas sobre gema, feijão e soja; e as saponinas de sisal, apresentaram inibição sobre clara, soja e gelatina, ativação sobre leite, gema e feijão e uma inibição parcial sobre carne e farinha de trigo, pois também apresentaram ativação em 0,01 e 0,005%, respectivamente. Há uma possibilidade de que a interação das saponinas de sisal com as proteínas dos substratos e com a papaína possa estar alterando sua conformação estrutural e interferindo na sua ação positiva e/ou negativamente.

Assim, o uso de alimentos de ricos em proteínas e sem colesterol seriam os mais indicados para serem associados com a ingestão de saponinas. O uso da papaína com saponinas como amaciante de carnes não seria prejudicado em concentrações de 0,01%. As saponinas também poderiam favorecer a produção enzimática de hidrolisados protéicos, que seriam utilizados como suplementos alimentares, produtos hipoalergênicos e meios de cultura para microorganismos, células vegetais e animais (Pasupuleti & Demain, 2010).

A inibição da colagenase utilizando a gelatina como substrato confirma a possibilidade do seu uso como ativo cosmético com funcionalidade *antiaging*.

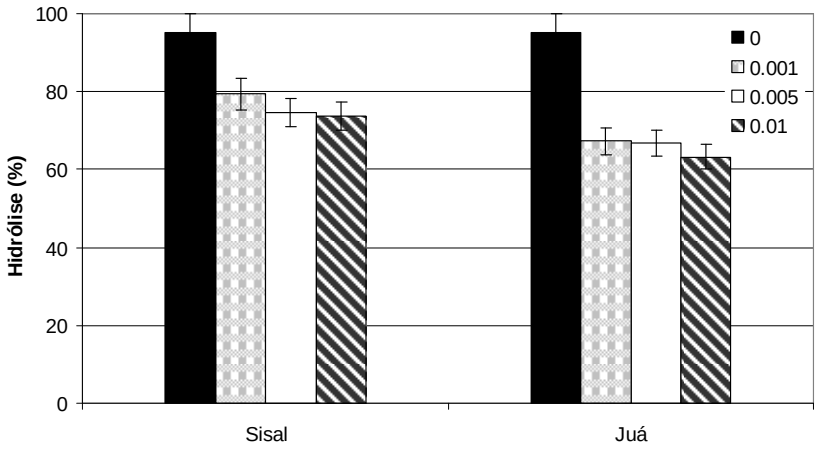


Figura 66 - Hidrólise de gelatina por colagenase spor diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

O amido é constituído de amilose (α-1,4-glucana linear) e de amilopectina (α-1,4-glucana com ramificações em α-1,6) em proporções variáveis (21-26% de amilose e 74-79% de amilopectina) nas fontes amiláceas e influenciam muito nas propriedades dos grânulos de amido, como cristalinidade e morfologia. Em base seca, o milho possui em média 72,4% de amido, com grânulo tipo A; mandioca (granulo tipo B) e arroz (granulo tipo) A tem 85% de amido, com 17% de amilose e 83% de amilopectina; batata (granulo tipo B) com 76,6% de amido; e o trigo possui 63% de amido, granulo tipo A (BeMiller & Whistler, 2009).

A atividade amilásica da pancreatina sobre amido, mandioca e arroz com adição das saponinas de juá e de sisal apresentaram o mesmo perfil de resultados, tendo um máximo em 0,001% com arroz, 0,005% com mandioca e 0,01% com amido, ocorrendo inibição após estas concentrações. Um possível motivo deste resultado seria maior concentração de amilopectina, que poderia promover uma interação com saponinas e alterar formação de micelas. Nos outros substratos amiláceos, as saponinas de juá influenciaram a inibição da hidrólise de milho, a ativação da hidrólise de batata na concentração até 0,005%, mas com uma forte inibição após este valor, e uma leve ativação na hidrólise de trigo com 0,001%, e depois uma tendência inibidora. Porém, na presença das saponinas de sisal, geraram um ativação na hidrólise de milho, inibição no caso da batata e do trigo.

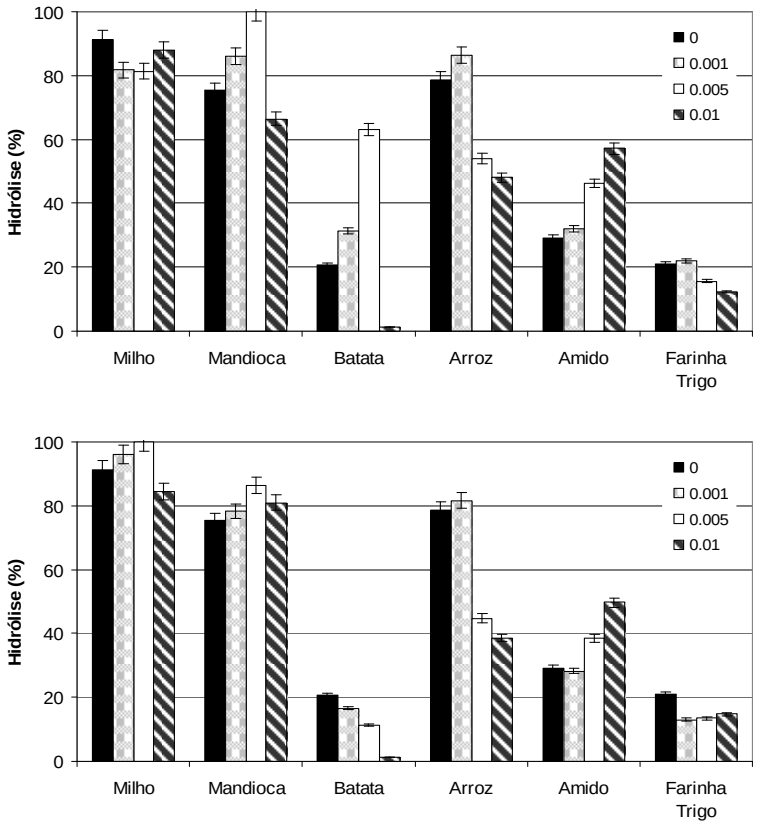


Figura 67 - Hidrólise de matérias amiláceos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

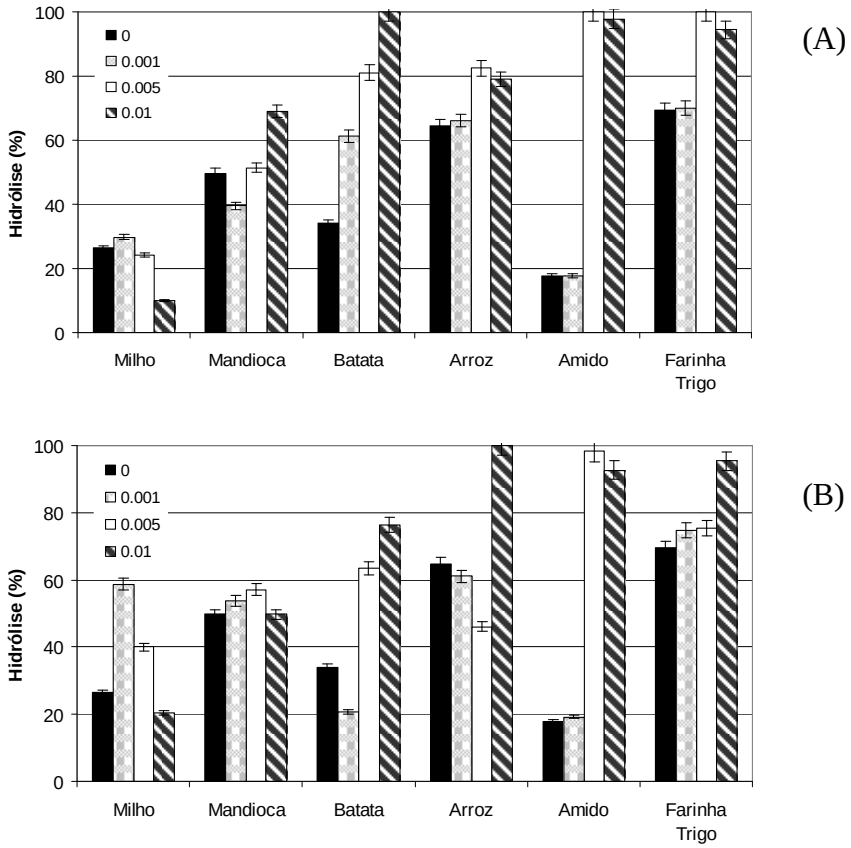


Figura 68 - Hidrólise de matérias amiláceos por Stargen por diferentes teores de saponinas de juá (A) e de sisal (B). Concentração enzimática: 0,5%

Já com adição de saponinas na hidrólise destes materiais amiláceos com Stargen praticamente todos apresentaram ativação, exceto o milho que apresentou um máximo de ativação em 0,001% e inibição com 0,01%. Estes resultados poderiam ser explicados com uma interação das saponinas com a amilase, levando a uma conformação mais propícia a hidrólise dos materiais.

Assim, a utilização das saponinas em concentrações de 0,001% não interferem na digestão destes alimentos. Já em concentrações acima de 0,01%, estas poderiam auxiliar como um fármaco antiobesidade, pela diminuição da disponibilização de glicose. As saponinas também podem ser utilizadas como aditivo na hidrólise do amido, já que a glicose produzida tem um mercado extenso em biorrefinarias para produção de etanol, ácidos orgânicos e outros produtos de origem biotecnológica (Kamm *et al*, 2006).

Mesmo considerando o baixo grau de hidrólise destes materiais hidrofóbicos, foi verificado que ação das saponinas de sisal tanto sobre a pancreatina como sobre a Lipozyme CALB foi inibitória. Já as saponinas de juá até apresentaram uma leve ativação na pancreatina

sobre a hidrólise de óleo de soja e manteiga, e inibição em azeite, mas com a Lipozyme CALB, a inibição ocorreu em óleo de soja, uma leve ativação com manteiga e sem interferências sobre o azeite. Por ser uma fonte de origem animal, a interação das saponinas com o colesterol pode ter favorecido a hidrólise da manteiga, já com o azeite e óleo de soja, a interação das saponinas com a lipase pode ter sido mais importante. Assim, o uso de sisal como fármaco anti-obesidade pode ser uma oportunidade a ser investigada.

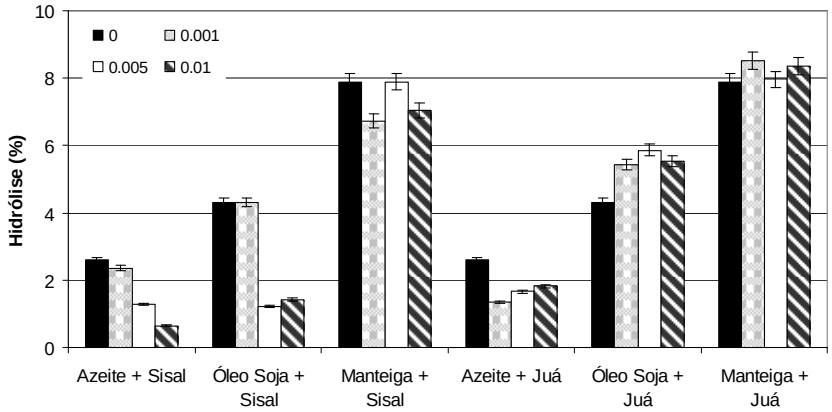


Figura 69 - Hidrólise de materiais lipidicos por pancreatina por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

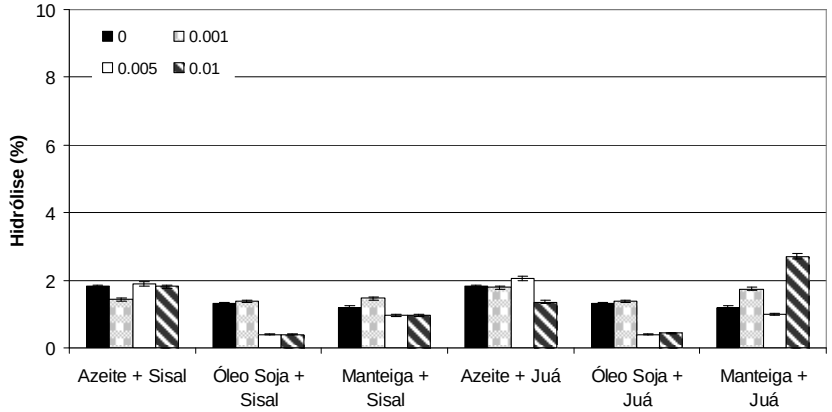


Figura 70 - Hidrólise de materiais lipidicos por Lipozyme CALB por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

4.5.4) Síntese enzimática

Outra opção para o uso das saponinas seria no aumento do rendimento de síntese enzimática de alguns compostos, tendo como exemplos um éster de cadeia curta, como o acetato de butila (Figura 71A), que pode ser utilizado como solvente e flavorizante, e um éster de cadeia longa, como o estearato de etila (Figura 71B), que é um dos componentes do biodiesel.

Para produção de acetato de butila, as saponinas promoveram um aumento substancial no rendimento da síntese quando a enzima Lipozyme TL foi utilizada, mas sem interferências no caso da enzima Novozym 435. Por outro lado, na síntese de estearato de etila, as saponinas causaram a inibição de ambas as lipases, mas houve dificuldade na transferência de massa na reação provavelmente pela ausência de um solvente como hexano ou heptano, que poderia ter auxiliado na dissolução dos materiais (ácido esteárico e etanol) e promovido uma maior área interfacial para atuação das lipases. Assim, as saponinas poderiam ser utilizadas para auxiliar síntese de ésteres de cadeia curta com Lipozyme TL.

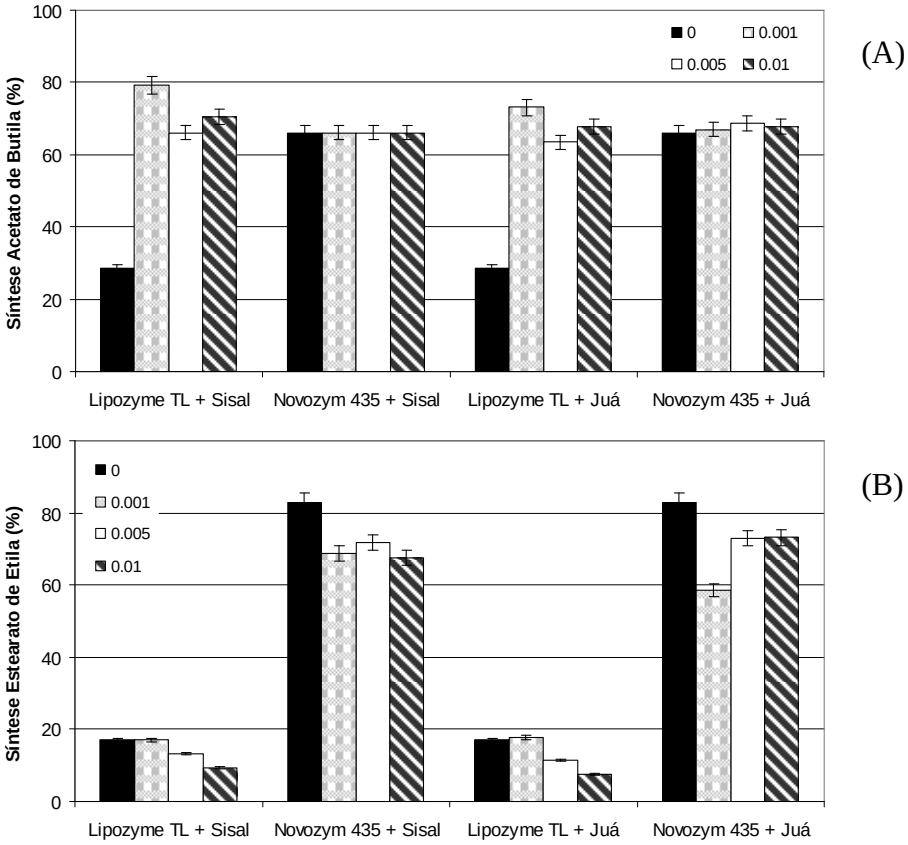


Figura 71 – Síntese enzimática de acetato de butila (A) e estearato de etila (B) por diferentes teores de saponinas de juá e de sisal. Concentração enzimática: 0,5%

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal buscar duas fontes vegetais da agrobiodiversidade brasileira para obtenção de saponinas e explorar vários processos verdes de extração e concentração de saponinas, além de identificar, a partir de suas características, quais aplicações poderiam ser mais apropriadas para as saponinas. Assim, as conclusões obtidas foram:

- O *screening* das matérias-primas foi realizado com 38 plantas tendo como critérios o teor de saponinas, o índice de emulsificação, a tensão superficial, a atividade antimicrobiana e a sua sustentabilidade, resultando na escolha do juá e do sisal para continuidade do trabalho sobre saponinas.
- A determinação da CMC das saponinas dos extratos de juá e sisal, em paralelo ao de ginseng e quilaia como referências externas, foi realizada pelos métodos turbidimétrico e por tensão superficial, demonstrando a similaridade entre estes. Assim, foi feita a avaliação de como pH, temperatura e concentração afetam a CMC das saponinas do juá e do sisal. Com isso, foi observado que em pH neutro, temperatura próxima da ambiente (25-30ºC) e concentração salinas entre 2 e 4% há maior redução nos valores de CMC das saponinas de juá. Já as condições que promovem uma diminuição na CMC das saponinas de sisal são: pH entre 3 e 4 associado a temperatura próxima da ambiente (25-30ºC), pH entre 10 e 11 em conjunto com temperaturas entre 55 e 60ºC e concentração salinas entre 2 e 6%.
- As saponinas do sisal e do juá representaram 25% da atividade antioxidante dos extratos brutos correspondentes. Comparando a atividade antioxidante da diosgenina com as das saponinas de juá e de sisal na concentração de 10000 μg/mL, estas perderam cerca de 35 e 43% da atividade.
- Não houve a formação de complexos insolúveis de saponinas de juá e de sisal com colesterol em nenhuma concentração de saponinas testada, alcançando uma relação em massa saponina/colesterol de 100.
- Apenas as saponinas de juá e o padrão (anfotericina B) apresentaram, respectivamente, CIM abaixo de 12,5 mg/mL: 156 e 0,19 μg/mL (*Candida albicans*), e 312,5 e 0,38 μg/mL (*Aspergillus niger*), sem atividade anti-bacteriana. As saponinas de sisal não apresentaram atividade antimicrobiana até 50 mg/mL.
- A composição das saponinas foi realizada por espectrometria de massas por ionização em eletrospray no modo negativo. Em relação as saponinas do juá foi verificado os picos principais em m/z 471,35 indicando certa hidrólise e os demais na região entre m/z 900 e 1100 referentes às saponinas descritas na literatura. Já para as saponinas de sisal, foi verificado

como pico principal m/z 771,42 como cantalasaponina 1 e os demais concentrados entre m/z 1100 e 1350.

- Na extração de saponinas do juá e do sisal, as condições ótimas encontradas na extração orbital simples com etanol 30%, auxiliadas por um planejamento composto central, com uma recuperação, respectivamente de 45,6 e 38,6% de saponinas foram: 38,8ºC; 2 h; 0,272 (relação juá/solvente) e 300 rpm; e 50ºC, 4 h, 0,166 (relação sisal/solvente) e 200 rpm.
- Na extração micelar com Triton X-100, foi obtido, em condições similares à extração orbital simples, uma recuperação de 98,4 e 90,8% das saponinas de sisal e de juá, respectivamente, utilizando concentrações de Triton de 7,5 e 15% v/v durante 4 e 1 h.
- Na extração com líquidos iônicos e análogos, os melhores resultados foram obtidos durante 1,5h e 200 rpm, com os eutéticos ChCl/HAc 1/2 molar (81%) e água (19%) e ChCl/HProp 1/2 molar (58%) e etanol (42%) para juá e sisal, nas condições de 1/20 (juá/solvente), 30ºC; e 1/10 (sisal/solvente), 50ºC; com recuperação de saponinas de 87 e 100%, e seletividade de 18,39 e 10,34, respectivamente.
- Dentre os métodos de concentração estudados, o de ponto de névoa obteve a maior seletividade, com uso de carbonato de sódio 20% para a separação bifásica, e Amberlite FPX-66 em condições diferentes para as saponinas de juá (46,8ºC e 25,1%) e de sisal (40,8ºC e 25,4%) durante 30 min para remoção do Triton, tendo como fatores de concentração (β_{SAP}) 10,6 e 6,6, e recuperação de 66,19 e 49,19%, respectivamente.
- Na coluna de espuma, foram utilizados extratos já concentrados, como resíduo líquido de sisal (RLS), e fase supramolecular de juá gerada pela adição de 20% de Na_2CO_3 ao extrato de juá, sendo 1,57 vezes mais concentrado, em um sistema gradiente de vazão, adicionados de 25 g de anéis de Raschig, com volumes iniciais de 75 e 125 mL, pH 5 e 4, respectivamente, recuperando em 9 h, 82,6% de saponinas de juá com β_{SAP} de 3,46, e para as saponinas de sisal, em 4,5 h de operação, foi obtido um β_{SAP} de 1,98, e uma recuperação de 90,5%.
- No sistema de ultrafiltração, o β_{SAP} para as saponinas de juá foi 1,42, com uma recuperação de 71%, enquanto para o sisal o fator de concentração foi 1,58 muito similar ao do RLS que foi 1,55, mas obtiveram recuperações distintas, 27 e 15,5%, respectivamente.
- Com os testes de alteração de atividade enzimática, hidrólise s síntese, as saponinas podem ser aplicadas em alimentos ricos em proteínas, favorecendo a produção de hidrolisados protéicos; aditivo para hidrólise de materiais amiláceos; auxiliar na síntese de ésteres de cadeia curta; fármacos anti-obesidade e ativos cosméticos *anti-aging*.

CAPÍTULO 6 – TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho foi apenas o início no estudo de processamento verde e aplicações de saponinas, podendo gerar desdobramentos e melhorias, dentre os quais:

- → Modificação enzimática das saponinas por glicosidases objetivando alterações nas propriedades antimicrobianas e micelares.
- → Esterificação enzimática de saponinas que possuam grupos carboxilas também objetivando alterações nas propriedades antimicrobianas e micelares.
- → Testes para verificação se a formação de complexos de saponinas e colesterol em organismos evita a sua absorção, e assim, apresentando um efeito hipocolesterolêmico.
- → Estudo da extração micelar de compostos bioativos de plantas, substituindo Triton X-100 por saponinas.
- → Teste de outros surfactantes, como Pluronic, para substituição de Triton X-100 na extração micelar e pré-concentração por ponto de névoa.
- → Estudo de outros líquidos iônicos biocompatíveis e análogos para extração de saponinas, e também na separação e reciclo destes para novas extrações.
- → Avaliação do uso de sistemas bifásicos aquosos constituídos de álcool, água e sais para concentração de compostos bioativos.
- → Otimização da geometria da coluna de espuma por fluidodinâmica computacional, e seu uso para concentração de componentes bioativos.
- → Produção de microbolhas (aphrons) de saponinas para extração de componentes bioativos.
- → Teste de membranas com outras composições e com cortes abaixo de 10 kDa, sendo possível substituição da ultrafiltração por nanofiltração.
- → Verificação da atuação das saponinas sobre outras lipases, proteases e amilases comerciais.
- → Utilização de saponinas como surfactante primário e/ou secundário em formulações cosméticas.
- → Estudo de possível interação positiva entre saponinas e óleos essenciais para uso como anti-microbianos naturais.
- → Teste da atividade antimicrobiana de saponinas em micro-organismos de uso industrial para possíveis aplicações em alimentos, como produtos simbióticos, e em biodegradação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A.P.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; RASHEED, R.K.; TAMBYRAJAH, V.; Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chemical Communications, (1), 70-71, 2003.
- ABED, M.A.; SAXENA, A.; BOHIDAR, H.B.; Micellization of alpha-olefin sulfonate in aqueous solutions studied by turbidity, dynamic light scattering and viscosity measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects,** 233, 181–187, 2004.
- ABRANTES, J.S.; **Bio(Sócio)Diversidade e Empreendedorismo Ambiental na Amazônia.** Editora Garamond, 2002.
- ABURJAI, T.; NATSHEH, F.M.; Plants Used in Cosmetics. **Phytotherapy Research**, 17, 987-1000, 2003.
- ACKERFIELD, J.; WEN, J.; A morphometric analysis of *Hedera* L. (the ivy genus, Araliaceae) and its taxonomic implications. **Adansonia**, série 3, 24 (2), 197-212, 2002.
- ALÁRCON-CAMACHO, J.G.; SAINZ-LOBO, J.I.; **Saponinas de *Quillaja saponaria* Molina como estabilizante da espuma de cerveja**. CL21892008, 24/10/2008; US2010021583, 28/01/2010; AU2009202981; 11/02/2010; BRPI0903559, 06/07/2010; AR072530, 01/09/2010.
- ALVAREZ-JUBETE, L.; ARENDT, E.K.; GALLAGHER, E.; Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional glutenfree ingredients. **Trends in Food Science & Technology**, 21, 106-113, 2010.
- ALVES, R.W.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U.; JAUREGI, P.; Recovery of norbixin from a raw extraction solution of annatto pigments using colloidal gas aphrons (CGAs). **Separation and Purification Technology,** 48, 208-213, 2006.
- ALVIANO, W.S.; ALVIANO, D.S.; DINIZ, C.G.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, C.S.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A..R; SOUZA, M.M.G.; BOLOGNESE, A.M.; In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology,** 53, 545-552, 2008.
- AN, Y.E.; AHN, S.C.; YANG, D.C.; PARK, S.J.; KIM, B.Y.; BAIK, M.Y.; Chemical conversion of ginsenosides in puffed red ginseng. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 370-374, 2011.
- ANDREWS, J.M.; Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48, Suppl. S1, 5-16, 2001.
- ANGELOVA, N.; KONG, H.W.; VAN DER HEIJDEN, R.; YANG, S.Y.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; WANG, M.; HANKEMEIER, T.; VAN DER GREEF, J.; XU, G.; VERPOORTE, R.; Recent Methodology in the Phytochemical Analysis of Ginseng. **Phytochemical Analysis,** 19, 2-16, 2008.
- ANUGWOM, I.; MÄKI-ARVELA, P.; VIRTANEN, P.; WILLFÖR, S.; SJÖHOLM, R.; MIKKOLA, J.P.; Selective extraction of hemicelluloses from spruce using switchable ionic liquids. **Carbohydrate Polymers**, 87, 2005– 2011, 2012.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M.L.; Plant Metabolites. Structure and In Vitro Antiviral Activity of Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platyipoda*. **Journal of Natural Products,** 52 (4), 679-685, 1989.
- ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J.R.; Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas,** 42(2), 269-277, 2006.
- AUGUSTIN, J.M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S.B.; BAK, S.; Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry,** 72, 435-457, 2011.
- AZUMA, K.; OHYAMA, A.; IPPOUSHI, K.; ICHIYANAGI, T.; TAKEUCHI, A.; SAITO, T.; FUKUOKA, H.; Structures and Antioxidant Activity of Anthocyanins in Many Accessions of Eggplant and Its Related Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 56, 10154-10159, 2008.
- BACKLEH-SOHRT, M.; EKICI, P.; LEUPOLD, G.; PARLAR, H.; Efficiency of Foam Fractionation for the Enrichment of Nonpolar Compounds from Aqueous Extracts of Plant Materials. **Journal of Natural Products,** 68, 1386-1389, 2005.
- BAJAJ, Y.P.S.; **Biotechnology in Agriculture and Forestry, n.41: Medicinal and Aromatic Plants X**. Springer-Verlag, Berlim, 1998.

→ BALDASSO, C.; **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

→ BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; SICILIA, M.D.; RUBIO, S.; Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. **Analytica Chimica Acta**, 677, 108-130, 2010.

→ BARBOSA-FILHO, J.M.; TRIGUEIRO, J.A.; CHERIYAN, U.O.; BHATTACHARYYA, J.; Constituents of stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. **Journal of Natural Products,** 48 (1), 152-153, 1985.

→ BARBOSA-FILHO, J.M.; Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. **Caderno de Farmácia**, 13 (2), 85-102, 1997.

→ BEDIR, E.; KIRMIZIPEKMEZ, H.; STICHER, O.; ÇALIS, I.; Triterpene saponins from the fruits of *Hedera helix*. **Phytochemistry,** 53, 905-909, 2000.

→ BeMILLER, J.; WHISTLER, R.; **Starch Chemistry and Technology,** 3rd ed., Academic Press, San Diego, USA, 2009.

→ BENATTI, J.H.; McGRATH, D.G.; OLIVEIRA, A.C.M.; Políticas Públicas e Manejo Comunitário de Recursos Naturais na Amazônia. **Ambiente & Sociedade,** 6 (2), 137-154, 2003.

→ BENINGER, C.W.; HOSFIELD, G.L.; Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 51, 7879-7883, 2003.

→ BENTHIN, B.; DANZ, H.; HAMBURGER, M.; Pressurized liquid extraction of medicinal plants. **Journal of Chromatography A,** 837, 211-219, 1999.

→ BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.; **Bioquímica,** 5ª ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

→ BERNARDO, R. R.; PINTO, A. V.; PARENTE, J. P.; Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. **Phytochemistry,** 43 (2), 465-469, 1996.

→ BERNARDO, R. R.; **Saponinas de *Albizia saman* e atividade adjuvante em resposta ao Ag-FML de *Leishmania donovani*.** Tese (Doutorado), NPPN/UFRJ, 1998.

→ BI, W.; TIAN, M.; ZHOU, J.; ROW, K.H.; Task-especific ionic liquid-assisted extraction and separation of astaxanthin from shrimp waste. **Journal of Chromatography B**, 878, 2243–2248, 2010.

→ BI, W.; TIAN, M.; ROW, K.H.; Ultrasonication-assisted extraction and preconcentration of medicinal products from herb by ionic liquids. **Talanta**, 85, 701–706, 2011.

→ BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K.; Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today,** 12 (19/20), 879-889, 2007.

→ BISOGNIN, D.A.; Origin and Evolution of Cultivated Cucurbits. **Ciência Rural,** 32 (5), 715-723, 2002.

→ BLASUCCI, V.M.; HART, R.; POLLET, P.; LIOTTA, C.L.; ECKERT, C.A.; Reversible ionic liquids designed for facile separations. **Fluid Phase Equilibria**, 294, 1–6, 2010.

→ BONEV, B.; HOOPER, J.; PARISOT, J.; Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 61, 1295-1301, 2008.

→ BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T.; Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews,** 59, 645-666, 2007.

→ BREZHNEVA, T. A.; NIKOLAEVSKII, V. A.; SELEMENEV, V. F.; SLIVKIN, A. I.; MUAD, A. A.; KHIND, T.; SAFONOVA, E. F.; Isolation of saponins from sugar beet roots and preliminary characterization of their adaptogen properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal,** 35 (3), 159-161, 2001.

→ BRIGIDA, A. I. S.; **Imobilização de lipases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais.** Tese (Doutorado), Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

→ BRITTON, H.T.S.; ROBINSON, R.A.; LXI-The Use of the Antimony-Antimonous Oxide Electrode in the Determination of the Concentration of Hydrogen Ions and in Potentiometric Titrations. The Prideaux-Ward Universal Buffer Mixture. **Journal of the Chemical Society**, 458-473, 1931.

→ CAIXETA-FILHO, J.V.; VAN SWAAY-NETO, J.M.; WAGEMAKER, A.P.; Optimization of the Production Planning and Trade of Lily Flowers at Jan de Wit Company. **Interfaces,** 32 (1), 35-46, 2002.

→ CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C.; **Planejamento de Experimentos usando o *Statistica*,** E-papers Serviços Editoriais, Riode Janeiro, 2003.

→ CAMPOS, F.R.; JANUARIO, A.H.; ROSAS, L.V.; NASCIMENTO, S.K.R.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CORDEIRO, M.S.C.; TOLDO, M.P.A.; ALBUQUERQUE, S.; Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia,** 76, 26-29, 2005.

→ CAO, X.; YE, X.; LU, Y.; YU, Y.; MO, W.; Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. **Analytica Chimica Acta,** 640, 47–51, 2009.

→ CARES, M.G.; VARGAS, Y.; GAETE, L.; SAINZ, J.; ALARCÓN, J.; Ultrasonically assisted Extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria* Molina. **Physics Procedia**, 3, 169–178, 2010.

→ CAROTENUTO, A.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MAGNO, S.; Spirostanol saponins of *Allium porrum* L.. **Phytochemistry,** 51, 1077-1082, 1999.

→ CARR, A.G.; MAMMUCARI, R.; FOSTER, N.R.; A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds. **Chemical Engineering Journal,** 172, 1– 17, 2011.

→ CARVALHO, P.E.R.; **Juazeiro, *Ziziphus joazeiro*.** Circular técnica da Embrapa, n. 139, Colombo (PR), 2007.

→ CASTRO, A.P.G; **Maracujazeiros comerciais e silvestres: Nematóides associados e variabilidade genética com base em marcadores moleculares e na resistência a *Meloidogyne incógnita***. Dissertação (Mestrado). Fitopatologia, Universida de Brasília, Brasília, 2008.

→ CASTRO, A.M.; **Aproveitamento de Co-Produtos Agroindustriais para Produção de um Complexo Enzimático contendo Amilases.** Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

→ CENSKOWSKY, U.; HELBERG, U.; NOWACK, A.; STEIDLE, M.; **Overview of World Production and Marketing of Organic Wild Collected Products**. Technical Paper of **International Federation of Organic Agriculture Movements** (IFOAM) and International Trade Centre, Genebra, Suíça, 2007.

→ CERRI, R.; AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; New Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products,** 51 (2), 257-261, 1988.

→ CHANG, L.H.; CHANG, C.M.J.; Continuous hot pressurized fluids extraction of isoflavones and soyasaponins from defatted soybean flakes. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, 38, 313–319, 2007.

→ CHANG, K.H.; JEE, H.S.; LEE, N.K.; PARK, S.H.; LEE, N.W.; PAIK, H.D.; Optimization of the enzymatic production of 20(S)-ginsenoside Rg3 from white ginseng extract using response surface methodology. **New Biotechnology,** 26 (3/4), 181-186, 2009.

→ CHAPAGAIN, B.P.; WIESMAN, Z.; TSROR-LAHKIM, L.; *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, 26, 109–115, 2007.

→ CHATTERJEE, A.; ROY, B.K.; MOULIK, S.P.; SAHU, N.P.; MONDAL, N.B.; Saponin Induced Clouding Behavior of Triton X-100 and Methylcellulose. **Journal of Dispersion Science and Technology**, 23 (6), 747-757, 2002.

→ CHEEKE, P.R.; Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science,** 77, 1-10, 2000.

→ CHEEKE, P.R.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of yucca schidigera: A review. **Journal of Inflammation**, 3 (6), 7 pages, 2006.

→ CHEETHAM, P.S.J.; Removal of Triton X-100 from Aqueous Solution using Amberlite XAD-2. **Analytical Biochemistry**, 92, 447-452, 1979.

→ CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M.K.; Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, 18, 813–835, 2011.

→ CHEN, W.J.; HSIAO, L.C.; CHEN, K.K.Y.; Metal desorption from copper (II)/nickel(II)-spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponin biosurfactant. **Process Biochemistry,** 43, 488–498, 2008.

→ CHEN, P.Y.; KUO, Y.C.; CHEN, C.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K.; Isolation and Immunomodulatory Effect of Homoisoflavones and Flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm.. **Molecules,** 14, 1789-1795, 2009.

→ CHEN, C.Y.; KUO, P.L.; CHEN, Y.H.; HUANG, J.C.; HO, M.L.; LIN, R.J.; CHANG, J.S.; WANG, H.M.; Tyrosinase inhibition, free radical scavenging, antimicroorganism and anticancer proliferation activities of *Sapindus mukorossi* extracts. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 41, 129–135, 2010.

→ CHEN, P.Y.; CHEN, C.H.; KUO, C.C.; LEE, T.H.; KUO, Y.H.; LEE, C.K.; Cytotoxic Steroidal Saponins from Agave sisalana. **Planta Medica**, 77, 929–933, 2011.

→ CHENG, W.Y.; KUO, Y.H.; HUANG, C.J.; Isolation and Identification of Novel Estrogenic Compounds in Yam Tuber (*Dioscorea alata* Cv. *Tainung* No. 2). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 55, 7350-7358, 2007.

→ CHOI, M.P.K.; CHAN, K.K.C.; LEUNG, H.W.; HUIE, C.W.; Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. **Journal of Chromatography A,** 983, 153-162, 2003.

→ CHOWDHURY, S.A.; VIJAYARAGHAVAN, R.; MacFARLANE, D.R.; Distillable ionic liquid extraction of tannins from plant materials. **Green Chemistry,** 12, 1023-1028, 2010.

→ CHUKWUMAH, Y.; WALKER, L.; VOGLER, B.; VERGHESE, M.; Changes in the Phytochemical Composition and Profile of Raw, Boiled, and Roasted Peanuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 55, 9266-9273, 2007.

→ CHWALEK, M.; LALUN, N.; BOBICHON, H.; PLÉ, K.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. **Biochimica et Biophysica Acta,** 1760, 1418–1427, 2006.

→ CLARK, J.; MACQUARRIE, D.; **Handbook of Green Chemistry and Technology.** Blackwell Science, Londres, 2002.

→ COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G.; Surface-Active Agents from Two Bacilllus Species. **Applied and Environmental Microbiology**, 53 (2), 224-229, 1987.

→ COPAJA, S.V.; BLACKBURN, C.; CARMONA, R.; Variation of saponin contents in *Quillaja saponaria* Molina. **Wood Science and Technology**, 37, 103–108, 2003.

→ COREA, G.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; Antispasmodic Saponins from Bulbs of Red Onion, *Allium cepa* L. Var. *Tropea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 53, 935-940, 2005.

→ CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M.; Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science & Technology,** 18, 609-625, 2007.

→ COSTA, L.O.O.; **Purificação de saponinas de extratos de quilaia usando fracionamento em coluna de espuma.** Dissertação (Mestrado), Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 1999.

→ COURT, W.E.; **Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles, vol. 15: Ginseng, the genus *Panax*.** Harwood Academic Publishers, Amsterdã, Holanda, 2000.

→ CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.L.; Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents,** 26, 343–356, 2005.

→ CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P.; Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova,** 29 (2), 287-292, 2006.

→ CRUZ, M.S.C.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JR., A.M.; DE MELO, D.L.F.M.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C.; Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, 111, 409–412, 2007.

→ DA SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P.; A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. **Phytochemistry,** 51, 931-935, 1999.

→ DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L.; **Antimicrobials in Food, 3rd ed.** Taylor and Francis Group/CRC Press, Boca Raton, USA, 2005.

→ DE, A.K.; **Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles, vol. 33: Capsicum, the genus *Capsicum*.** Taylor and Francis, Chennai, India, 2003.

→ DEBNATH, M.; PANDEY, M.; SHARMA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P.; Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research,** 4(3), 177-187, 2010.

→ DE COMBARIEU, E.; FALZONI, M.; FUZZATI, N. ; GATTESCO, F. ; GIORI, A.; LOVATI, M.; PACE, R.; Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. **Fitoterapia**, 73, 583-596, 2002.

→ DECROOS, K. VINCKEN, J.P.; VAN KONINGSVELD, GRUPPEN, H.; VERSTRAETE, W.; Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. **Food Chemistry**, 101, 324-333, 2007.

→ DE LUCCA II, A.J.; BLAND, J.M.; VIGO, C.B.; SELINTRENNIKOFF, C.P.; **Fungicidal saponin, CAY-1, and isolation thereof from *Capsicum* species fruit**. US 6310091, 30 outubro 2001.

→ DE LUCCA, A. J.; BOUE, S.; PALMGREN, M. S.; MASKOS, K.; CLEVELAND, T. E.; Fungicidal properties of two saponins from *Capsicum frutescens* and the relationship of structure and fungicidal activity. **Canadian Journal of Microbiology,** 52 (4), 336-342, 2006.

→ DESAI, J.D.; BANAT, I.M.; Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** 61 (1), 47-64, 1997.

→ DEWICK, P. M.; **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach, 3**nd ed., John Wiley & Sons, Nova York, 2009.

→ DING, Y.; CHEN, Y. Y.; WANG, D. Z.; YANG, C. R.; Steroidal saponins from a cultivated form of *Agave sisalana*. **Phytochemistry,** 28 (10), 2787-2791, 1989.

→ DING, Y.; TIAN, R.H.; YANG, C. R.; CHEN, Y. Y.; NOHARA, T.; Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong nº 1. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** 41 (3), 5557-560, 1993.

→ DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A.; Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, 113, 411-419, 2009.

→ DOBBINS, T.; **Process for isolating saponins from soybean-derived materials**. US 6355816 B1, 12 março 2002.

→ DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A.K.; **Green Chemistry and Engineering**. Academic Press, San Diego, USA, 2007.

→ DU, Q.; XU, Y.; LI, L.; ZHAO, Y.; JERZ, G. ; WINTERHALTER, P. ; Antioxidant Constituents in the Fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 54, 4186-4190, 2006.

→ DU, Q.; GAO, S.; Preparative separation of saponins from the *Luffa cylindrica* (L.) Roem. By slow rotary countercurrent chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 29, 2451-2456, 2006.

→ DU, Q.; CUI, H.; A new flavone glycoside from the fruits of *Luffa cylindrica*. **Fitoterapia**, 78, 609–610, 2007.

→ DU, F.Y.; XIAO, X.H.; LI, G.K.; Ionic liquid aqueous solvent-based microwave-assisted hydrolysis for the extraction and HPLC determination of myricetin and quercetin from *Myrica rubra* leaves. **Biomedical Chromatography,** 25, 472-478, 2011.

→ EFING, L.M.A.C.; **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.).** Tese (Doutorado). Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

→ EISENREICHOVÁ, E.; HALADOVÁ, M.; MUCAJI, P.; GRANCAI, D.; The study of constituents of *Lilium candidum* L.. **Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae**, 51, 27-37, 2004.

→ ELIAS, R.; LANZA, AM.D.; VIDAL-OLLIVIER, E.; BALANSARD, G.; FAURE, R.; BABADJAMIAN, A.; Triterpenoid saponins from the leaves of *Hedera helix*. **Journal of Natural Products**, 54 (1), 98-103, 1991.

→ EKABO, O.A.; FARNSWORTH, N.R.; HENDERSON, T.O.; MAO, G.; MUKHERJEE, R.; Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. **Journal of Natural Products,** 59, 431-435, 1996.

→ ELLIOT, J.; The processing and sustainable management of Amazonian medicinal plants. **Intermediate Technology Food Chain,** 26, 8-11, 2000.

→ ENGELBERTH, A.S.; CLAUSEN, E.C.; CARRIER, D.J.; Comparing extraction methods to recover ginseng saponins from American ginseng (*Panax quinquefolium*), followed by purification using fast centrifugal partition chromatography with HPLC verification. **Separation and Purification Technology**, 72, 1–6, 2010.

→ ERDOGAN, I.; SENER, B.; RAHMAN, A.; Etioline, a steroidal alkaloid from *Lilium candidum* L.. **Biochemical Systematics and Ecology**, 29, 535–536, 2001.

→ ERENO, D.; Da natureza para a farmácia: Antiinflamatório feito com extrato de planta da Mata Atlântica está pronto para entrar no Mercado. **Pesquisa FAPESP,** 110, Abril 2005 (Disponível em: http://www.revistapesquisa.fapesp.br).

→ ESCALANTE, A.M.; SANTECCHIA, C.B.; LÓPEZ, S.N.; GATTUSO, M.A.; RAVELO, A.G.; DELLE MONACHE, F.; SIERRA, M.G.; ZACCHINO, S.A.; Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, na Argentinean species in critic risk. **Journal of Ethnopharmacology,** 82, 29-34, 2002.

→ FACINO, R.M.; CARINI, M.; STEFANI, R.; ALDINI, G.; SAIBENE, L.; Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: Factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. **Archiv der Pharmazie**, 328, 720-724, 1995.

→ FAN, L.; JIN, R.; LIU, Y.; AN, M.; CHEN, S.; Enhanced extraction of patchouli alcohol from *Pogostemon cablin* by microwave radiation-accelerated ionic liquid pretreatment. **Journal of Chromatography B**, 879, 3653–3657, 2011.

→ FANG, Q.; YEUNG, H.W.; LEUNG, H.W.; HUIE, C.W.; Micelle-mediated extraction and preconcentration of ginsenosides from Chinese herbal medicine. **Journal of Chromatography A,** 904, 47-55, 2000.

→ FARN, R.J.; **Chemistry and Technology of Surfactants.** Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006.

→ FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; DI ROSA, M.; IANARO, A.; Cytotoxic Saponins from Bulbs of *Allium porrum* L.. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 48, 3455-3462, 2000.

→ FERRO, A.F.P.; BONACELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D.; Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: O uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção,** 13 (3), 489-501, 2006a.

→ FERRO, A.F.P.; BONACELLI, M.B.M.; ASSAD, A.L.D.; Uso da biodiversidade e acessos a recursos genéticos no Brasil: atual regulamentação dificulta pesquisa e desenvolvimento. **Inovação Uniemp,** 2 (2), 16-17, 2006b.

→ FIALHO, B.C.; **Dependência Tecnológica e Biodiversidade: Um estudo histórico sobre a indústria farmacêutica no Brasil e nos Estados Unidos.** Tese (Doutorado). Engenharia de Produção, UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

→ FONTES, G.C.; **Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica***. Dissertação (Mestrado), Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

→ FOUBERT, K.; CUYCKENS, F.; VLEESCHOUWER, K.; THEUNIS, M.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L.; APERS, S.; Rapid quantification of 14 saponins of Maesa lanceolata by UPLC–MS/MS. **Talanta**, 81, 1258–1263, 2010.

→ FRÁGUAS, C.B.; CHAGAS, E.A.; SILVA, E.F.; PASQUAL M.; OLIVEIRA, P.D.; **Cultivo do Lírio**, Boletim de Extensão, UFLA, Lavras (MG), 2002.

→ FUKAYA, Y.; IIZUKA, Y.; SEKIKAWA, K.; OHNO, H.; Bio ionic liquids: room temperature ionic liquids composed wholly of biomaterials. **Green Chemistry**, 9, 1155–1157, 2007.

→ FUNCH, L.S.; BARROSO, G.M.; Revisão taxonômica do gênero *Periandra* Mart. ex Benth. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae**). Revista Brasileira de Botânica**, 22 (3), 339-356, 1999.

→ GAETE-GARRETÓN, L.; VARGAS-HERNÁNDEZ, Y.; CARES-PACHECO, M.G.; SAINZ, J.; ALARCÓN, J.; Ultrasonically enhanced extraction of bioactive principles from *Quillaja Saponaria* Molina. **Ultrasonics**, 51, 581-585, 2011.

→ GAFNER, S.; BERGERON, C.; McCOLLOM, M.M.; COOPER, L.M.; McPHAIL, K.L.; GERWICK, W.H.; ANGERHOFER, C.K.; Evaluation of the efficiency of three different solvent systems to extract triterpene saponins from roots of *Panax quinquefolius* using High-Performace Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 52, 1546-1550, 2004.

→ GARTI, N.; What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** 152, 125-146, 1999.

→ GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A.; Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** 17, 2002–2008, 2009.

→ GEIS, P.A; **Cosmetic Microbiology: A Practical Approach,** 2nd ed.Taylor & Francis Group, New York, USA, 2006.

→ GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L.; HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** 16 (4), 723-726, 2005.

→ GONÇALVES, E.G.; LORENZI, H.; **Morfologia Vegetal**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 2007.

→ GORINSTEIN, S.; MOSHE, R.; GREENE, L.J.; ARRUDA, P.; Evaluation of Four *Amaranthus* Species through Protein Electrophoretic Patterns and Their Amino Acid Composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 39, 851-854, 1991.

→ GOSSMAN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P.; Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products,** 58 (3), 438-441, 1995.

→ GREVE, A.; KULA, M.R.; Phase diagramas of new aqueous phase systems composed of aliphatic alcohols, salts and water. **Fluid Phase Equilibria**, 62, 53-63, 1991.

→ GRIEVES, R.B.; Foam Separations: A Review. **The Chemical Engineering Journal,** 9, 93-106, 1975.

→ GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, Ö; MAZZA, G; Saponins: Properties, Applications and Processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** 47 (3), 231-258, 2007.

→ GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, Ö; BALSEVICH, J.; MAZZA, G; Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. **Journal of Food Engineering,** 80, 619-630, 2007.

→ GÜLÇIN, I.; MSHVILD,ADZE, V.; GEPDIREMEN, A.; ELIAS, R.; Antioxidant Activity of Saponins Isolated from Ivy: α-Hederin, Hederasaponin-C, Hederacolchoside-E and Hederacolchoside-F. **Planta Medica**, 70, 561-563, 2004.

→ GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B.; **Lipid Technologies and Applications,** Marcel Dekker, New York, USA, 1997.

→ GUSIATIN, Z.M.; KLIMIUK, E.; Metal (Cu, Cd and Zn) removal and stabilization during multiple soil washing by saponin. **Chemosphere**, 86, 383–391, 2012.

→ HAN, S.K.; KIM, N.H.; Surface Activity of Crude Ginseng Saponin. **Archives of Pharmacal Research,** 7 (2), 109-113, 1984.

→ HAN, C.; HUI, Q.; WANG, Y.; Hypoglycaemic activity of saponin fraction extracted from *Momordica charantia* in PEG/salt aqueous two-phase systems. **Natural Product Research,** 22 (13), 1112-1119, 2008.

→ HAN, D.; ROW, K.H.; Determination of luteolin and apigenin in celery using ultrasonic-assisted extraction based on aqueous solution of ionic liquid coupled with HPLC quantification. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91, 2888-2892, 2011.

→ HAO, W.; LI, H.; HU, M.; YANG, L.; RIZWAN-UL-HAQ, M.; Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by Bacillus amyloliquefaciens in combination with tea saponin. **Postharvest Biology and Technology,** 59, 316–323, 2011.

→ HARALAMPIDIS, K.; TROJANOWSKA, M.; OSBOURN, A.E.; Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**. 75, 31–49, 2002.

→ HART, R.; POLLET, P.; HAHNE, D.J.; JOHN, E.; LLOPIS-MESTRE, V.; BLASUCCI, V.; HUTTENHOWER, H.; LEITNER, W.; ECKERT, C.A.; LIOTTA, C.L.; Benign coupling of reactions and separations with reversible ionic liquids. **Tetrahedron**, 66, 1082–1090, 2010.

→ HASHIMOTO, Y.; OGURA, M.; ISHIZONE, H.; **Periandrins extracted from plants of the genus *Periandra*.** US 4320225, 16 março 1982.

→ HASSAN, S.M.; BYRD, J.A.; CARTWRIGHT, A.L.; BAILEY, C.A.; Hemolytic and Antimicrobial Activities Differ Among Saponin-rich Extracts From Guar, Quillaja, Yucca, and Soybean. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162, 1008–1017, 2010.

→ HATTI-KAUL, R.; **Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols**. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, 2000.

→ HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G.; Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*):A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science,** 72 (9), R138-151, 2007.

→ HELALY, F.M.; AHMED, A.A.; EL-GHAFFAR, M.A.A.; Natural rubber base matrix containing *Calendula officinalis* plant as a source of molluscicidal saponins. **Journal of Controlled Release,** 57, 1–7, 1999.

→ HENG, L.; **Flavour aspects of pea and its protein preparations in relation to novel protein foods**. Ph D thesis, Wageningen University, Wageningen, Holanda, 2005.

→ HENG, L.; VINCKEN, J.P.; HOPPE, K.; VAN KONINGSVELD, G.A.; DECROOS, K.; GRUPPEN, H.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; VORAGEN, AG.J.; Stability of pea DDMP saponin and the mechanism of its decomposition. **Food Chemistry,** 99, 326–334, 2006.

→ HENMAN, A. R.; Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): Ecological and social perspectives on an economic plant of the Central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology,** 6, 311-338, 1982.

→ HIGUCHI, R.; KUBOTA, S.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; SHAH, A. H.; Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. **Phytochemistry,** 23 (11), 2597-2600, 1984.

→ HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS R.G.; Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied Microbiology,** 24, 269-275, 1997.

→ HONG, K.J.; TOKUNAGA, S.; KAJIUCHI, T.; Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. **Chemosphere**, 49, 379–387, 2002.

- HONG, C.E.; LYU, S.Y.; Anti-inflammatory and Anti-oxidative Effects of Korean Red Ginseng Extract in Human Keratinocytes. **Immune Network**, 11 (1), 42-49, 2011.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; **Saponins**, Cambridge University Press, UK, 2005.
- http://aggie-horticulture.tamu.edu/plantanswers/publications/lily/lily.html, acessado em 16/01/2010.
- http://faostat.fao.org/, acessado em 13/01/2010.
- http://michaelis.uol.com.br/moderno/portugues/index.php?lingua=portugues-portugues&palavra=rasura, acessado em 07/05/2010.
- http://www.acmite.com/market-reports/chemicals/world-surfactant-market.html, acessado em 25/12/2011.
- http://www.agmrc.org/commodities__products/specialty_crops/amaranth.cfm, acessado em 21/01/2010.
- http://www.cnip.org.br/, acessado em 16/01/2010.
- http://www.cnph.embrapa.br/capsicum/index.htm, acessado em 14/01/2010.
- http://www.conexaoprofessor.rj.gov.br/temas-especiais-28k.asp, acessado em 10/12/2009.
- http://www.crop.cri.nz/home/products-services/publications/broadsheets/121-Licorice.pdf, acesso em 11/01/2010.
- http://www.epa.gov/gcc/pubs/principles.html, acessado em 12/12/2009.
- http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=89&idConteudo=6157, acessado em 09/12/2009.
- http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=221, acessado em 17/12/2011.
- http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Consulta_Publica/consulta_biologica.htm, acessado em 10/12/2009.
- http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=818&z=t&o=19, acessado em 14/01/2010.
- http://www.terramar.org.br/oktiva.net/1320/nota/28431, acessado em 12/12/2009.
- http://www.wanfangdata.com/report/vpro.asp?id=617, acessado em 12/01/2010.
- HU, Z.; CAI, M.; LIANG, H.H.; Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. **Separation and Purification Technology,** 61, 266–275, 2008.
- HUANG, X.; KONG, L.; Steroidal saponins from roots of *Asparagus officinalis*. **Steroids**, 71, 171-176, 2006.
- HUANG, C.C.; CHIANG, P.Y.; CHEN, Y.Y.; WANG, C.C.R.; Chemical compositions and enzyme activity changes occurring in yam (*Dioscorea alata* L.) tubers during growth. **LWT - Food Science and Technology**, 40, 1498-1506, 2007.
- HUONG, N.T.T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H.; *In vitro* activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** 21 (9), 978-981, 1998.
- HWANG, D.C.; DAMODARAN, S.; Selective precipitation of fat globule membranes of cheese whey by saponin and bile salt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 42, 1872-1878, 1994.
- IBANOGLU, E.; IBANOGLU, S.; Foaming behaviour of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. **Food Chemistry,** 70, 333-336, 2000.
- IKEDA, Y.; SUGIURA, M.; FUKAYA, C.; YOKOYAMA, K.; HASHIMOTO, Y.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M.; Periandradulcins A, B and C: Phosphodiesterase Inhibitors from *Periandra dulcis* Mart.. **Chemical Pharmaceutical Bulletin,** 39 (3), 566-571, 1991.
- IMPERATO, G.; KÖNIG, B.; CHIAPPE, C.; Ionic Green Solvents from Renewable Resources. **European Journal of Organic Chemistry,** (7), 1049-1058, 2007.
- INAMDAR, E. K.; YEOLE, R. D.; GHOGARE, A. B.; DE SOUZA, N. J.; Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. **Journal of Chromatography A,** 742, 127-130, 1996.
- IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; RANALLI, G.; DE MARINO, S.; ZOLLO, F.; Antimicrobial Furostanol Saponins from the Seeds of *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 4310-4316, 2002.

→ JAUREGI, P.; GILMOUR, S.; VARLEY, J.; Characterisation of colloidal gas aphrons for subsequent use for protein recovery. **The Chemical Engineering Journal**, 65, 1-11, 1997.

→ JAUREGI, P.; VARLEY, J.; Colloidal gas aphrons: potential applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, 17, 389-395, 1999.

→ JIA, G.; LU, X.; Enrichment and purification of madecassoside and asiaticoside from *Centella asiatica* extracts with macroporous resins. **Journal of Chromatography A**, 1193, 136–141, 2008.

→ JIA, L.; ZHAO, Y.; Current Evaluation of the Millennium Phytomedicine- Ginseng (I): Etymology, Pharmacognosy, Phytochemistry, Market and Regulations. **Current Medical Chemistry**, 16 (19), 2475-2484, 2009.

→ JIA, Z.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; Saponarioside C, the first α-D-galactose containing triterpenoid saponin, and five related compounds from *Saponaria officinalis*. **Journal of Natural Products,** 62 (3), 449-453, 1999.

→ JIAN, H.I.; LIAO, X.X.; ZHU, L.W.; ZHANG, W.M.; JIANG, J.X.; Synergism and foaming properties in binary mixtures of a biosurfactant derived from *Camellia oleifera* Abel and synthetic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, 359, 487–492, 2011.

→ JIN, R.; FAN, L.; AN, X.; Microwave assisted ionic liquid pretreatment of medicinal plants for fast solvent extraction of active ingredients. **Separation and Purification Technology,** 83, 45–49, 2011.

→ JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S.; Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental,** 14 (1), 37-52, 2008.

→ KACZOREK, E.; CHRZANOWSKI, L.; PIJANOWSKA, A.; OLSZANOWSKI, A.; Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. **Bioresource Technology**, 99, 4285–4291, 2008.

→ KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G.G.; Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 20 (3), 300-309, 2010.

→ KALINOWSKA, M.; ZIMOWSKI, J.; PACZKOWSKI, C.; WOJCIECHOWSKI, Z.A.; The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. **Phytochemistry Reviews,** 4, 237-257, 2005.

→ KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M.; Biorefineries – Industrial Processes and Products. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemanha, 2006.

→ KAMSTRUP, S.; SAN MARTÍN, R.; DOBERTI, A.; GRANDE, H.; DALSGAARD, K. Preparation and characterisation of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. **Vaccine**, 18, 2244-2249, 2000.

→ KASAI, R.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O.; Saponins. In: IKAN, R.; **Naturally Ocurring Glycosides**. John Wiley & Sons, West Sussex, 1999.

→ KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; Two New Cucurbitacin Glucosides, Opercurins A and B, from the Brazilian Folk Medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 52 (8), 1018-1020, 2004.

→ KEREM, Z.; GERMAN-SHASHOUA, H.; YARDEN, O.; Microwave-assited extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 85, 406-412, 2005.

→ KHANNA, V.G.; KANNABIRAN, K.; Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of Gymnema sylvestre and Eclipta prostrata. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 2737–2740, 2008.

→ KHAJURIA, A.; GUPTA, A.; GARAI, S.; WAKHLOO, B.P.; Immunomodulatory effects of two sapogenins 1 and 2 isolated from Luffa cylindrica in Balb/C mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 17, 1608–1612, 2007.

→ KILIÇ, E.; FONT, J. ; PUIG, R. ; ÇOLAK, S.; ÇELIK, D.; Chromium recovery from tannery sludge with saponin and oxidative remediation. **Journal of Hazardous Materials,** 185, 456–462, 2011.

→ KIM, S.W.; PARK, S.K.; KANG, S.I.; KANG, H.C.; OH, H.J.; BAE, C.Y.; BAE, D.H.; Hypocholesterolemic Property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* Extracts in Human Body. **Archives of Pharmcal Research,** 26 (12), 1042-1046, 2003.

→ KIM, H.S.; LEE, S.Y.; KIM, B.Y.; LEE, E.K.; RYU, J.H.; LIM, G.B.; Effects of modifiers on the supercritical CO_2 extraction of glycyrrhizin from licorice and the morphology of licorice tissue after extraction. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** 9, 447-453, 2004.

→ KIM, B.H.; LEE, S.Y.; CHO, H.J.; YOU, S.Y.; KIM, Y.J.; PARK, Y.M.; LEE, J.K.; BAIK, M.Y.; PARK, C.S.; AHN, S.C.; Biotransformation of Korean *Panax ginseng* by Pectinex. **Biological and Pharmaceutical Bullettin,** 29(12), 2472—2478, 2006.

→ KIM, W.J.; KIM, J.; VERIANSYAH, B.; KIM, J.D.; LEE, Y.W.; OH, S.G.; TJANDRAWINATA, R.R.; Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. **Journal of Supercritical Fluids**, 48, 211–216, 2009.

→ KIM, S.H.; KIM, H.K.; YANG, E.S.; LEE, K.Y.; KIM, S.D.; KIM, Y.C.; SUNG, S.H.; Optimization of pressurized liquid extraction for spicatoside A in *Liriope platyphylla*. **Separation and Purification Technology,** 71, 168–172, 2010.

→ KIM, Y.H.; CHOI, Y.K.; PARK, J.; LEE, S.; YANG, Y.H.; KIM, H.J.; PARK, T.J.; KIM, Y.H.; LEE, S.H.; Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass. **Bioresource Technology**, doi:10.1016/j.biortech.2011.04.064, 2011.

→ KINGHORN, A.D.; SOEJARTO, D.D.; Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. **Pure and Applied Chemistry**, 74 (7), 1169-1179, 2002.

→ KINJO, J.; HATAKEYAMA, M.; UDAYAMA, M.; TSUTANAGA, Y.; YAMASHITA, M.; NOHARA, T.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K.; HPLC Profile analysis of oleanene-glucuronides in several edible beans. **Biosciences, Biotechnology and Biochemsitry,** 62 (3), 429-433, 1998.

→ KINTIA, P. K.; SHVETS, S. A.; Melongoside L and melongoside M, steroidal saponins from *Solanum melongena* seeds. **Phytochemistry,** 24 (1), 197-198, 1985a.

→ KINTIA, P. K.; SHVETS, S. A.; Melongoside N, O and P: Steroidal saponins from seeds of *Solanum melongena*. **Phytochemistry,** 24 (7), 1567-1569, 1985b.

→ KISHIMOTO, S.; SUMIMOTO, K.; YAGI, M.; NAKAYAMA, M.; OHMIYA, A.; Three routes to orange petal color via carotenoids components in 9 Compositae species. **J. Japan Soc. Hort. Sci.,** 76 (3), 250-257, 2007.

→ KITAGAWA, I.; WANG, H.K.; SAITO, M.; YOSHIKAWA, M.; Saponin and sapogenol. XXXIII. Chemical constituents of the seeds of *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi *et* Ohashi (3). Azukisaponins V and VI. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** , 31 (2), 683-688, 1983.

→ KITE, G.C.; PORTER, E.A.; SIMMONDS, M.S.J.; Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1148, 177-183, 2007.

→ KOBAYASHI, K.; TERUYA, T.; SUENAGA, K.; MATSUI, Y.; MASUDA, H.; KIGOSHI, H.; Isotheasaponins B1–B3 from Camellia sinensis var. sinensis tea leaves. **Phytochemistry**, 67, 1385–1389, 2006.

→ KOMMALAPATI, R. R.; ROY, D.; VALSARAJ, K.T.; CONSTANT, W.D.; Characterization of Colloidal Gas Aphron Suspensions Generated from Plant-Based Natural Surfactant Solutions. **Separation Science and Technology,** 31 (17), 2317-2333, 1996.

→ KOMMALAPATI, R. R.; VALSARAJ, K.T.; CONSTANT, W.D.; ROY, D.; AQUEOUS SOLUBILITY ENHANCEMENT AND DESORPTION OF HEXACHLOROBENZENE FROM SOIL USING A PLANT-BASED SURFACTANT. **Water Research,** 31 (9), 2161-2170, 1997.

→ KOSTOVA, I.; DINCHEV, D.; Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews,** 4, 111-137, 2005.

→ KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R.; A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, 89, 217–233, 2011.

→ KRIZKOVA, L.; MUCAJI, P.; NAGY, M.; KRAJCOVIC, J.; Triterpenoid cynarasaponins from *Cynara cardunculus* L. reduce chemically induced mutagenesis *in vitro*. **Phytomedicine,** 11, 673-678, 2004.

→ KUJALA, T.S.; VIENOLA, M.S.; KLIKA, K.D.; LOPONEN, J.M.; PIHLAJA, K.; Betalain and phenolic compositions of four beetroot (Beta vulgaris) cultivars. **European Food Research and Technology**, 214, 505-510, 2002.

→ KULJANABHAGAVAD, T.; THONGPHASUK, P.; CHAMULITRAT, W.; WINK, M.; Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd.. **Phytochemistry**, 69, 1919–1926, 2008.

→ KUMAR, A.; Membrane Separation Technology in Processing Bioactive Components. In: SHI, J.; **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies**. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, USA, 2007.

→ KWON, J.H.; BÉLANGER, J.M.R.; PARÉ, J.R.J.; YAYLAYAN, V.A.; Application of the microwave-assisted process (MAP^{TM}) to the fast extraction of ginseng saponins. **Food Research International**, 36, 491-498, 2003a.

→ KWON, J.H.; LEE, G.D.; BÉLANGER, J.M.R.; PARÉ, J.R.J.; Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAP^{TM}). **International Journal of Food Science and Technology**, 38, 615-622, 2003b

→ KWON, J.H.; BÉLANGER, J.M.R.; PARÉ, J.R.J.; Optimization of microwave-assisted extraction (MAP) for ginseng components by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 51, 1807-1810, 2003c.

→ LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P.; Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research,** 46, 244–282, 2007.

→ LANZOTTI, V.; Bioactive saponins from *Allium* and *Aster* plants. **Phytochemistry Reviews**, 4, 95-110, 2005.

→ LANZOTTI, V.; The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, 1112, 3-22, 2006.

→ LEE, P.S.; HAN, J.Y.; SONG, T.W.; SUNG, J.H.; KWON, O.S.; SONG, S.; CHUNG, Y.B.; Physicochemical characteristics and bioavailability of a novel intestinal metabolite of ginseng saponin (IH901) complexed with β-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, 316, 29-36, 2006.

→ LEE, S.J.; KIM, J.J.; MOON, H.I.; AHN, J.K.; CHUN, S.C.; JUNG, W.S.; LEE, O.K.; CHUNG, I.M.; Analysis of Isoflavones and Phenolic Compounds in Korean Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Seeds of Different Seed Weights. **Journal of Agricultural and Food Chemsitry,** 56, 2751-2758, 2008.

→ LI, Y.; DU, Y.; ZOU, C.; Effects of pH on antioxidant and antimicrobial properties of tea saponins. **European Food Research and Technology**, 228, 1023–1028, 2009.

→ LI, H.; NI, J.; LIU, W.; ZHU, Y.; Cleaner production alternatives for saponin industry by recycling starch. **Resources, Conservation and Recycling**, 54, 1145–1151, 2010a.

→ LI, J.; ZU, Y.G.; FU, Y.J.; YANG, Y.C.; LI, S.M.; LI, Z.N.; WINK, M.; Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 11, 637–643, 2010b.

→ LI, J.; CHASE, H.A.; Applications of membrane techniques for purification of natural products. **Biotechnology Letters**, 32, 601-608, 2010.

→ LI, X.; GUO, R.; ZHANG, X.; LI, X.; Extraction of glabridin using imidazolium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, 88, 146–150, 2012.

→ LIMA, J.D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W.S.; SILVA, R.B.; Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, 39 (4), 1270-1278, 2009.

→ LIN, J.T.; YANG, D.J.; Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). **Food Chemistry,** 108, 1068-1074, 2008.

→ LINDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J.; Microwave assisted organic synthesis – a review. **Tetrahedron,** 57, 9225-9283, 2001.

→ LIU, S.; CUI, M.; LIU, Z.; SONG, F.; MO, W.; Structural Analysis of Saponins from Medicinal Herbs Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of The Amercian Society for Mass Spectrometry**, 15, 133-141, 2004.

→ LIU, L.; DONG, Y.S.; QI, S.S.; WANG, H.; XIU, Z.L.; Biotransformation of steriodal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum*. **Applied Microbiology and Biotechnology,** 85, 933-940, 2010a.

→ LIU, L.; DONG, Y.S.; XIU, Z.I.; Three-liquid-phase extraction of diosgenin and steroidal saponins from fermentation of *Dioscorea zingibernsis* C. H. Wright. **Process Biochemistry**, 45, 752–756, 2010b.

→ LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.; Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry;** v.193, pp.265-275, 1951.

→ LU, Y.; MA, W.; HU, R.; DAÍ, X.; PAN, Y.; Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn.. **Journal of Chromatography A**, 1208, 42–46, 2008.

→ LU, C.; WANG, H.; LV, W.; MA, C.; XU, P.; ZHU, J.; XIE, J.; IIU, B.; ZHOU, Q.; Ionic Liquid-Based Ultrasonic/Microwave-Assisted Extraction Combined with UPLC for the Determination of Anthraquinones in Rhubarb. **Chromatographia,** 74, 139–144, 2011.

→ MA, C.H.; LIU, T.T.; YANG, L.; ZU, Y.G.; CHEN, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHAO, C.; Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of essential oil and biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra chinensis* Baill fruits. **Journal of Chromatography A**, 1218, 8573–8580, 2011.

→ MACIEL, J.S.; CHAVES, L.S.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, A.L.P.; FEITOSA, J.P.A.; DE PAULA, R.C.M.; Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, 71, 559-565, 2008.

→ MAGID, A.A.; VOUTQUENNE, L.; MORETTI, C.; LONG, C.; LAVAUD, C.; Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Caryocar glabrum*. **Journal of Natural Products,** 69 (2), 196-205, 2006.

→ MAJHI, P.R.; MUKHERJEE, K.; MOULIK, S.P.; SEN, S.; SAHU, N.P.; Solution Properties of a Saponin (Acaciaside) in the Presence of Triton X-100 and Igepal. **Langmuir**, 15, 6624-6630, 1999.

→ MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; **Methods in Molecular Biology, vol.393: Plant Secondary Metabolites**. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.

→ MAN, S.; GAO, W.; YAN, Y.; LIU, Z.; LIU, C.; Inhibition of matrix metalloproteinases related to metastasis by diosgenyl and pennogenyl saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 1221-1227, 2011.

→ MANDAL, V.; DEWANJEE, S.; MANDAL, S.C.; Microwave-assisted Extraction of Total Bioactive Saponin Fraction from *Gymnema sylvestre* with Reference to Gymnemagenin: a Potential Biomarker. **Phytochemical Analysis,** 20, 491–497, 2009.

→ MARCIANI, D.J.; PRESS, J.B.; REYNOLDS, R.C.; PATHAK, A.K.; PATHAK, V.; GUNDY, L.E.; FARMER, J.T.; KORATICH, M.S.; MAY, R.D.; Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity. **Vaccine**, 18, 3141-3151, 2000.

→ MARQUI, S.R.; LEMOS, R.B.; SANTOS, L.A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.M.B.; Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii***. Química Nova**, 31 (4), 828-831, 2008.

→ MARTIN, A.R.; MARTINS, M.A.; MATTOSO, L.H.C.; SILVA, O.R.R.F.; Caracterização Química e Estrutural de Fibra de Sisal da Variedade *Agave sisalana*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia,** 19 (1), 40-46, 2009.

→ MARTINEZ, R.; Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 32 (5), 449-460, 2006.

→ MARTINS, E.L.P.; BRANDÃO, M.G.L.; Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-Índia). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 16 (2), 224-229, 2006.

→ MARTIROSYAN, D.M.; MIROSHNICHENKO, L.A.; KULAKOVA, S.N.; POGOJEVA, A.V.; ZOLOEDOV, V.I.; Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. **Lipids in Health and Disease**, 6(1), 1-12, 2007.

→ MASCARENHAS, M.H.T.; RESENDE, L.M.A.; **Situação atual e perspectivas das culturas do inhame e do taro no Sudeste do Brasil.** Anais do 2º Simpósio Nacional sobre as Culturas do Inhame e do Taro, João Pessoa – PB, v. 1, 33-51, 2002.

→ MATSUURA, H.; USHIROGUCHI, T.; ITAKURA, Y.; HAYASHI, H.; FUWA, T. I.; A furostanol glycoside from garlic, bulbs of *Allium sativum*, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** , 36 (9), 3659-3663, 1988.

→ MATTOS, P.P.; SALIS, S.M.; Resultados Preliminares do Plantio do Ginseng-do-Pantanal (*Pfaffia glomerata*) no Pantanal. **Comunicado Técnico da Embrapa**, 49, 1-4, 2005.

→ McCLEMENTS, D.J.; **Food emulsions: principles, practice, and techniques, 2nd ed.,** CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2005.

→ MEDEIROS, J.R.; MEDEIROS, H.; MASCARENHAS, C.; DAVIN, L.B.; LEWIS, N.G.; Bioactive components of Hedera helix. **Arquipélago, Life and Marine Sciences**, 19A: 27-32, 2002.

→ MEIRELLES, F. V. P.; **Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ50682).** Tese (Doutorado), Programa de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

→ MICICH, T.J.; FOGLIA, T.A.; HOLSINGER, V.H.; Polymer-supported saponins: An approach to cholesterol removal from butteroil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 40, 1321-1325, 1992.

→ MIGUEL, L.M.; **Uso sustentável da biodiversidade na Amazônia brasileira: Experiências atuais e perspectivas das bioindústrias de cosméticos e fitoterápicos**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Geografia Humana, USP, São Paulo, 2007.

→ MILLER, G.L.; Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem. ,** 31 (3): 426–428, 1959.

→ MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; Steroidal saponins and alkaloids from the bulbs of *Lilium brownii* var. *colchesteri*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 38 (11), 3055-3059, 1990.

→ MIMAKI, Y.; INOUE, T.; KURODA, M.; SASHIDA, Y.; Steroidal saponins from *Sansevieria trifasciata*. **Phytochemistry**, 43 (6), 1325-1331, 1996.

→ MIMAKI, Y.; SATOU, T.; KURODA, M.; SASHIDA, Y.; HATAKEYAMA, Y.; Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium candidum*. **Phytochemistry,** 51, 567-573, 1999.

→ MINE, Y.; **Egg Bioscience and Biotechnology**. Wiley-Interscience, Hoboken, USA, 2008.

→ MIRANDA, E.M.; SOUSA, J.A.; PEREIRA, R.C.A.; **Subsídios Técnicos para o Manejo Sustentável da Unha-de-gato (*Uncaria* spp.) no Vale do Rio Juruá, AC**. Documentos 68, Embrapa Acre, Rio Branco, 2001.

→ MITHÖFER, A.; JAKUPOVIC, J.; WEILER, E. W.; A triterpenoid glycoside from *Spinacia oleracea*. **Natural Product Research,** 14 (1), 5-10, 1999.

→ MITRA, S.; DUNGAN, S.R.; Micellar properties of quillaja saponina. 1. Effects of temperature, salt and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 45, 1587-1595, 1997.

→ MITRA, S.; DUNGAN, S.R.; Micellar properties of quillaja saponina. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** 17, 117-133, 2000.

→ MITRA, S.; DUNGAN, S.R.; Cholesterol Solubilization in Aqueous Micellar Solutions of Quillaja Saponin, Bile Salts, or Nonionic Surfactants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 49, 384-394, 2001.

→ MIYAKOSHI, M.; TAMURA, Y.; MASUDA, H.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; IKEDA, T.; OHTANI, K.; KASAI. R.; YAMASAKI, K.; Antiyeast Steroidal Saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a New Anti-Food-Deteriorating Agent. **Journal of Natural Products,** 63, 332-338, 2000.

→ MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, **Agrobiodiversidade e Diversidade Cultural**, Brasília, 2006a.

→ MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, **Iniciativas Transversais do Governo Brasileiro sobre Biodiversidade, Alimentação e Nutrição**, Brasília, 2006b.

→ MOHAMMAD, F. V.; NOORWALA, M.; AHMAD, V. U.; SENER, B.; A bidesmosidic hederagenin hexasaccharide from the roots of *Symphytum officinale*. **Phytochemistry,** 40 (1), 213-218, 1995.

→ MONTORO, P.; SKHIRTLADZE, A.; PERRONE, A.; BENIDZE, M.; KEMERTELIDZE, E.; PIACENTE, S.; Determination of steroidal glycosides in *Yucca gloriosa* flowers by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 52, 791–795, 2010.

→ MONTOYA, G.; ARANGO, G.J.; UNGER, M.; HOLZGRABE, U.; *O*-Glycoside Sequence of Pentacyclic Triterpene Saponins from *Phytolacca bogotensis* using HPLC-ESI/Multi-stage Tandem Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, 20, 465–474, 2009.

→ MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T.; Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 1655-1666, 2009.

→ MORITA, T.; NIE, R.L.; FUJINO, H.; ITO, K.; MATSUFUJI, N.; KASAI, R.; ZHOU, J.; WU, C.Y.; YATA, N.; TANAKA, O.; Saponins from Chinese cucurbitaceous plants: Solubilization of saikosaponin-a with hemslosides Ma2 and Ma3 and structure of hemsloside H_1 from *Hemsleya chinensis*. **Chem. Pharm. Bull.,** 34 (1), 401-405, 1986.

→ MORTON, P.A.J.; MURRAY, B.S.; Acid beverage floc: protein-saponin interactions and an unstable emulsion model. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** 21, 101-106, 2001.

→ MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C.; Functionality of oilseed protein products: A review. **Food Research International**, 39, 945-963, 2006.

→ MUIR, A.D.; PATON, D.; BALLANTYNE, K.; AUBIN, A.A.; **Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from quinoa (*Chenopodium quinoa*),** US 6355249 B2, 12 março 2002.

→ MUKHOPADHYAY, M.; PANJA, P.; A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. **Separation and Purification Technology**, 63, 539–545, 2008.

→ MULEY, B.P.; KHADABADI, S.S.; BANARASE, N.B.; Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 8 (5), 455-465, 2009.

→ MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W.; LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 399–403, 2005.

→ MURGU, M.; SANTOS, L. F.A; SOUZA, G.D.; DAOLIO, C.; SCHNEIDER, B.; FERREIRA, A.G.; RODRIGUES-FILHO, E.; Hydroxylation of a Hederagenin Derived Saponin by a Xylareaceous Fungus Found in Fruits of *Sapindus saponaria*. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** 19 (5), 831-835, 2008.

→ MUSTAFA, A.; TURNER, C.; Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, 703, 8– 18, 2011.

→ MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; AYET, G.; PEDROSA, M.M.; CUADRADO, C.; The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.,** 3 (4), 210-216, 1999.

→ MYERS, D.; **Surfactant Science and Technology, 3rd ed.,** John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2006.

→ NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H.; Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry,** 23(8), 1703-1705, 1984.

→ NARVÁEZ-ZAPATA, J.A.; SÁNCHEZ-TEYER, L.F.; Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. **Recent Patents on Biotechnology,** 3, 185-191, 2009.

→ NASSIRI ASL, M.; HOSSEINZADEH, H.; Review of Pharmacological Effects of *Glycyrrhiza* sp. and its Bioactive Compounds. **Phytotherapy Research,** 22, 709-724, 2008.

→ NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada, 2ª Ed.. NCCLS document M27-A2, Wayne, USA, 2002a.

→ NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. NCCLS document M38-A, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002b.

→ NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico;** Norma Aprovada, 6ª ed. NCCLS document M7-A6, Wayne, USA, 2003.

→ NETO, A.G.; COSTA, J.M.L.C.; BELATI, C.C.; VINHÓLIS, A.H.C.; POSSEBOM, L.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; CUNHA, W.R.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A.; Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, 96, 87–91, 2005.

→ NG, A.; HARVEY, A.J.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C.; WALDRON, K.W.; Effect of Oxidative Coupling on the Thermal Stability of Texture and Cell Wall Chemistry of Beet Root (*Beta vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 46, 3365-3370, 1998.

→ NIKI, E.; Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, 49, 503–515, 2010.

→ NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y.; Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry,** 23(1), 139-142, 1984.

→ NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M.; Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova,** 25 (5), 772-776, 2002.

→ NZOWA, L.K.; BARBONI, L.; TEPONNO, R.B.; RICCIUTELLI, M.; LUPIDI, G.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; TAPONDJOU, L.A.; Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from Entada rheedii. **Phytochemistry,** 71, 254-261, 2010.

→ OASHI, M.C.G.; **Estudo da Cadeia Produtiva como Subsídio para P & D do Agronegócio do Sisal na Paraíba**. Doutorado (Tese). Programa de Engenharia de Produção, UFSC, Florianópolis, 1999.

→ OLESZEK, W.; JUNKUSZEW, M.; STOCHMAL, A.; Determination and toxicity of saponins from *Amaranthus cruentus* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 47, 3685-3687, 1999.

→ OLESZEK, W.A.; Saponins. In: NAIDU, A.S.; **Natural Food Antimicrobial Systems**, CRC Press, Boca Raton, 2000.

→ OLESZEK, W.A.; Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, 967, 147–162, 2002.

→ OLESZEK, W.A.; BIALY, Z.; Chromatographic determination of plant saponins - An update (2002-2005). **Journal of Chromatography A**, 1112, 78-91, 2006.

→ OLIVIER-BOURBIGOU, H.; MAGNA, L.; MORVAN, D.; Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications. **Applied Catalysis A: General**, 373, 1–56, 2010.

→ ONG, E.S.; Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, 812, 23–33, 2004.

→ ONG, E.S.; LEN, S.M.; Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. **Analytica Chimica Acta,** 482, 81-89, 2003.

→ ÖNNING, G.; JUILLERAT, M.A.; FAY, L.; ASP, N.G.; Degradation of oat saponins during heat processing – Efect of pH, stainless steel, and iron at different temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 42, 2578-2582, 1994.

→ ÖNNING, G.; ASP, N.G.; Effect of oat saponins and different types of dietary fibre on the digestion of carbohydrates. **British Journal of Nutrition**, 74, 229-231, 1995.

→ ONYILAGHA, J.C.; ISLAM, S.; NTAMATUNGIRO, S.; Comparative phytochemistry of eleven species of Vigna (Fabaceae). **Biochemical Systematics and Ecology,** 37, 16–19, 2009.

→ OSBOURN, A. E.; Saponins in cereals. **Phytochemistry,** 62, 1-4, 2003.

→ OSBOURN, A.; GOSS, R.J.M.; FIELD, R.A.; The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. **Natural Products Reports**, 28, 1261-1268, 2011.

→ PACZKOWSKI, C.; KALINOWSKA, M.; WOJCIECHOWSKI, Z.A.; The 3-O-glucosylation of steroidal sapogenins and alkaloids in eggplant (*Solanum melongena*): Evidence for two separate glucosyltransferases. **Phytochemistry,** 48 (7), 1151-1159, 1998.

→ PALEOLOGOS, E.K.; GIOKAS, D.L.; KARAYANNIS, M.I.; Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 24 (5), 426-436, 2005.

→ PAN, X.; LIU, H.; JIA, G.; SHU, Y.Y.; Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. **Biochemical Engineering Journal,** 5, 173–177, 2000.

→ PARK, J. D.; RHEE, D. K.; LEE, Y. H.; Biological activities and chemistry of saponins from *Panax ginseng* C. A. Meyer. **Phytochemistry Reviews,** 4, 159-175, 2005.

→ PARK, J.Y.; CHOI, Y.J.; MOON, S.; SHIN, D.Y.; NAM, K.; Microbubble suspension as a carrier of oxygen and acclimated bacteria for phenanthrene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, 163, 761–767, 2009.

→ PASUPULETI, V.K.; DEMAIN, A.L.; **Proteins Hydrolysates in Biotechnology**, Springer, Heidelberg, Alemanha, 2010.

→ PEDRALLI, G.; DO CARMO, C.A.S.; CEREDA, M.; PUIATTI, M.; Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil. **Horticultura Brasileira**, 20 (4), 530-532, 2002.

→ PEIXOTO, M.P.G.; TRETER, J.; RESENDE, P.E.; SILVEIRA, N.P.; ORTEGA, G.G.; LAWRENCE, M.J.; DREISS, C.A.; Wormlike Micellar Aggregates of Saponins from *Ilex Paraguariensis* A. St. Hil. (mate): A Characterisation by Cryo-TEM, Rheology, Light Scattering and Small-Angle Neutron Scattering. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100 (2), 536-546, 2011.

→ PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M.C.; URUM, K.; EMULSIFICATION OF CRUDE OIL–WATER SYSTEMS USING BIOSURFACTANTS. **Trans IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection**, 83(B1), 38–46, 2005.

→ PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H.; Characterization of Aescin as a Biosurfactant for Environmental Remediation. **Journal of Surfactants and Detergents,** 2 (3), 337-341, 1999.

→ PENG, Y.; YANG, Z.; WANG, Y.; LIU, Z.; BAO, J.; HONG, Y.; Pathways for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. **Chemical Engineering Research and Design**, 89, 2620-2625, 2011.

→ PENNISI, B.V.; OETTING, R.D.; STEGELIN, F.E.; THOMAS, P.A.; WOODWARD, J.L.; Commercial Production of English Ivy (*Hedera helix* L.). **Bulletin Learning of Life of the University of Georgia,** 1206, 1-22, 2009.

→ PEREIRA, B.M.R.; DA SILVA, B.P.; PEREIRA, N.A.; PARENTE, J.P.; Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. **Phytochemistry**, 54, 409-413, 2000.

→ PEREIRA, J.; BROCARDO-LIMA, G.A.; BETTLER, B.; CHAMONE, D.A.F.; Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular**. Revista Brasileira de Hematologia e Hematoterapia**, 29 (2), 109-113, 2007.

→ PERNAK, J.; SYGUDA, A.; MIRSKA, I.; PERNAK, A.; NAWROT, J.; PRADZYNSKA, A.; GRIFFIN, S.T.; ROGERS, R.D.; Choline-Derivative-Based Ionic Liquids. **Chemistry, A European Journal**, 13, 6817-6827, 2007.

→ PETIT, P.R.; SAUVAIRE, Y.D.; HILLAIRE-BUYS, D.M.; LECONTE, O.M.; BAISSAC, Y.G.; PONSIN, G.R.; RIBES, G.R.; Steroid saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. **Steroids,** 60, 674-680, 1995.

→ PHILIPS, D.R.; RASBERY, J.M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S.P.T.; Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Current Opinion in Plant Biology,** 9, 305-314, 2006.

→ PIACENTE, S.; PIZZA, C.; OLESZEK, W.; Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews,** 4, 177-190, 2005.

→ PIZARRO, A.P.B.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; PARENTE, J.P.; MELO, M.T.V.; DOS SANTOS, C.E.; LIMA, P.R.; O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** 32 (1), 23-29, 1999.

→ POTTER, S.M.; JIMENEZ-FLORES, R.; POLLACK, J.; LONE, T.A.; BERBER-JIMENEZ, M.D.; Protein-Saponin Interaction and Its Influence on Blood Lipids**. Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 41, 1287-1291, 1993.

→ PUANGPRAPHANT, S.; DE MEJIA, E.G.; Saponins in Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NFKB Pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 57, 8873-8883, 2009.

→ QI, X.; IGNATOVA, S.; LUO, G.; LIANG, Q.; JUN, F.W.; WANG, Y.; SUTHERLAND, I.; Preparative isolation and purification of ginsenosides Rf, Re, Rd and Rb1 from the roots of *Panax ginseng* with a salt/containing solvent system and flow step-gradient by high performance counter-current chromatography coupled with an evaporative light scattering detector. **Journal of Chromatography A**, 1217, 1995–2001, 2010.

→ QIAO, L.; EASTEAL, A.J.; The interaction between triton X series surfactants and poly (ethylene glycol) in aqueous solutions. **Colloid & Polymer Science**, 276, 313-320, 1998.

→ QIN, Y.; WU, X.; HUANG, W.; GONG, G.; LI, D.; HE, Y.; ZHAO, Y.; Acute toxicity and sub-chronic toxicity of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 126, 543–550, 2009.

→ QU, C.; BAI, Y.; JIN, X.; WANG, Y. ; ZHANG, K.; YOU, J.; ZHANG, H.; Study on ginsenosides in different parts and ages of Panax quinquefolius L.. **Food Chemistry**, 115, 340–346, 2009.

→ QUINA, F.H.; HINZE, W.L.; Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** 38 (11), 4150-4168, 1999.

→ RAFAMANTANANA, M.H.; ROZET, E.; RAOELISON, G.E.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S.U.; HUBERT, P.; QUETIN-LECLERQ, J.; An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenicglycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). **Journal of Chromatography B**, 877, 2396–2402, 2009.

→ RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E.; Production, characterization and applications of biosurfactants - review. **Biotechnology,** 7 (2), 360-370, 2008.

→ RATES, S.M.K.; GOSMANN, G.; Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12 (2), 85-93, 2002.

→ REGINATTO, F. H.; KAUFFMANN, C.; SCHRIPSEMA, J.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** 12 (1), 32-36, 2001.

→ REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPSEMA, J.; SCHENKEL, E. P.; Assay of Quadranguloside, the Major Saponin of Leaves of *Passiflora alata*, by HPLC-UV. **Phytochemical Analysis,** 15, 195-197, 2004.

→ RESNICK, S.; **QUILLAIA EXTRACTS Type 1 and Type 2**. Chemical and Technical Assessment (CTA), 61st Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2004.

→ REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, 38, 146–166, 2006.

→ RIBEIRO, B.D.; CASTRO, A.M.; COELHO, M.A.Z.; FREIRE, D.M.G.; Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research,** Article ID 615803, 16 pages, 2011.

→ RIDOUT, C.L.; PRICE, K.R.; PARKIN, G.; DIJOUX, M.G.; LAVAUD, C.; Saponins from sugar beet and the floc problem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 42, 279-282, 1994.

→ RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos,** Casa do Pão Editora, Campinas, 2005.

→ RODRIGUES, M.G.; **A pesquisa para a Conservação da Biodiversidade no Brasil: a *ecologia* a partir de um enfoque interdisciplinar.** Tese (Doutorado). Política Científica e Tecnológica, UNICAMP, Campinas, 2009.

→ ROSEN, M.J.; DAHANAYAKE, M.; **Industrial Utilization of Surfactants: Principles and Practice**. AOCS Press, Urbana, Illinois, USA, 2000.

→ ROTHROCK, J.W.; HAMMES, P.A.; McALEER, W.J.; Isolation of Diosgenin by Acid Hydrolysis of Saponin. **Industrial and Engineering Chemistry**, 49 (2), 186-188, 1957.

→ ROY, D.; KOMMALAPATI, R.R.; MANDAVA, S.S.; VALSARAJ, K.T.; CONSTANT, W.D.; Soil washing potential of natural surfactant. **Environ. Sci. Technol.,** 31, 670-675, 1997.

→ RUIZ, R.G.; PRICE, K.R.; ARTHUR, A.E.; ROSE, M.E.; RHODES, M.J.; FENWICK, R.G.; Effect of soaking and cooking on the saponin content and composition of chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 44, 1526-1530, 1996.

→ RYU, C.S.; KIM, C.H.; LEE, S.Y.; LEE, K.S.; CHOUNG, K.J.; SONG, G.Y.; KIM, B.H.; RYU, S.Y.; LEE, H.S.; KIM, S.Y.; Evaluation of the total oxidant scavenging capacity of saponins isolated from Platycodon grandiflorum. **Food Chemistry**, 132, 333-337, 2012.

→ SABBAGH, M.C.; **Redução de porte de girasol ornamental pela aplicação de reguladores vegetais.** Dissertação (Mestrado), Agronomia, UFPR, Curitiba, 2008.

→ SABBIONI, C.; MANDRIOLI, R.; FERRANTI, A.; BUGAMELLI, F.; SARACINO, M. A.; FORTI, G. C.; FANALI, S.; RAGGI, M. A.; Separation and analysis of glycyrrhizin, 18β-glycyrrhetic acid and 18α-glycyrrhetic acid in liquorice roots by means of capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A,** 1081 (1), 65-71, 2005.

→ SAGESAKA, Y. M.; UEMURA, T.; WATANABE, N.; SAKATA, K.; UZAWA, J.; A new glucuronide saponin from tea leaves (*Camellia sinensis* var.*sinensis*). **Bioscience, biotechnology and biochemistry,** 58 (11), 2036-2040, 1994.

→ SAGESAKA, Y. M.; UEMURA, T.; SUZUKI, Y.; SUGIURA, T.; YOSHIDA, M.; YAMAGUCHI, K.; KYUKI, K.; Antimicrobial and anti-inflammatory actions of tea-leaf saponin. **Journal of Pharmaceutical Society of Japan,** 116 (3), 238-243, 1996.

→ SAGRATINI, G.; ZUO, Y.; CAPRIOLI, G.; CRISTALLI, G.; GIARDINA, D.; MAGGI, F.; MOLIN, L.; RICCIUTELLI, M.; TRALDI, P.; VITTORI, S.; Quantification of Soyasaponins I and βg in Italian Lentil Seeds by Solid-Phase Extraction (SPE) and High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 11226-11233, 2009.

→ SALAH, R.B.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y.; Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of Rhizopus oryzae. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** 103 (4), 368-372, 2007.

→ SAMPSON, J.H.; RAMAN, A.; KARLSEN, G.; NAVSARIA, H.; LEIGH, I.M.; *In vitro* keratinocyte antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenoid saponins. **Phytomedicine**, 8(3), 230–235, 2001.

→ SAN MARTÍN, R.; BRIONES, R.; Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) saponins. **Economic Botany**, 53 (3), 302-311, 1999.

→ SAN MARTÍN, R.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K.; Novel molluscicide against Pomacea canaliculata based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. **Crop Protection**, 27, 310–319, 2008.

→ SANTIAGO, G.M.P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.M.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R.; Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e C*ordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre A*edes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(3), 187-190, 2005.

→ SANTOS, W.R.; BERNARDO, R.R.; PEÇANHA, L.M.T.; PALATNIK, M.; PARENTE, J.P.; DE SOUSA, C.B.P.; Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine,** 15 (9), 1024-1029, 1997.

→ SANTOS, W.R.; LIMA, V.M.F.; SOUZA, E.P.; BERNARDO, R.R.; PALATNIK, M.; SOUSA, C.B.P.; Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. **Vaccine,** 21, 30-43, 2002.

→ SANTOS, J.D.G.; BRANCO, A.; SILVA, A.F.; PINHEIRO, C.S.R.; NETO, A.G.; UETANABARO, A.P.T.; QUEIROZ, S.R.O.D.; OSUNA, J.T.A.; Antimicrobial activity of *Agave sisalana.* **African Journal of Biotechnology**, 8 (22), 6181-6184, 2009.

→ SARKAR, S.K.; HOWARTH, R.E.; Specificity of the Vanillin Test for Flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 24 (2), 317-320, 1976.

→ SARNTHEIN-GRAF, C.; LA MESA, C.; Association of saponins in water and water-gelatine mixtures. **Thermochimica Acta**, 418, 79-84, 2004.

→ SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9 (4), 400-406, 2006.

→ SASAKI, Y.; MIZUTANI, K.; KASAI, R.; TANAKA, O.; Solubilizing properties of glycyrrhizin and its derivatives: solubilization of saikosaponin-a, the saponin of bupleuri radix. **Chem. Pharm. Bull.,** 36 (9), 3491-3495, 1988.

→ SAUTOUR, M.; MITAINE-OFFER, A.C.; MIYAMOTO, T.; DONGMO, A.; LACAILLE-DUBOIS, M.A.; Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. **Planta Medica**, 70, 90-92, 2004.

→ SAUTOUR, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE-DUBOIS, M. A.; Steroidal saponins and flavan-3-ol glycosides from *Dioscorea villosa*. **Biochemical Systematics and Ecology,** 34, 60-63, 2006.

→ SAVE, S.V.; PANGARKAR, V.G.; Characterisation of Colloidal Gas Aphrons. **Chemical Engineering Communications**, 127, 35-54, 1994.

→ SAYAR, S.; JANNINK, J.L.; WHITE, P.J.; In Vitro Bile Acid Binding Activity within Flour Fractions from Oat Lines with Typical and High Beta-Glucan Amounts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 54, 5142-5148, 2006.

→ SCHÜHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O.; Novel Triterpene Saponins from *Zizyphus joazeiro*. **Helvetica Chimica Acta,** 83, 1509-1516, 2000.

→ SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A.C.; **Antimicrobial susceptibility testing protocols.** CRC Press/ Taylor and Francis Group, Boca Ratom, USA, 2007.

→ SHAHBAZ, K.; MJALLI, F.S.; HASHIMA, M.A.; AL-NASHEF, I.M.; Prediction of deep eutectic solvents densities at different temperatures. **Thermochimica Acta**, 515, 67–72, 2011.

→ SHARANGI, A.B.; Medicinal and therapeutic potentialities of tea (Camellia sinensis L.) – A review. **Food Research International**, 42, 529–535, 2009.

→ SHEN, S.; CHANG, Z.; LIU, J.; SUN, X.; HU, X.; LIU, H.; Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch extract by three-liquid-phase extraction systems. **Separation and Purification Technology**, 53, 216–223, 2007.

→ SHI, J.; ARUNASALAM, K.; YEUNG, D.; KAKUDA, Y.; MITTAL, G.; JIANG, Y.; Saponins from Edible Legumes: Chemistry, Processing, and Health Benefits. **Journal of Medicine Food,** 7 (1), 67-78, 2004.

→ SHI, W.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, H.; DING, L.; Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panax ginseng*. **Food Chemistry**, 102, 664-668, 2007.

→ SHILL, K.; PADMANABHAN, S.; XIN, Q.; PRAUSNITZ, J.M.; CLARK, D.S.; BLANCH, H.W.; Ionic Liquid Pretreatment of Cellulosic Biomass: Enzymatic Hydrolysis and Ionic Liquid Recycle. **Biotechnology and Bioengineering**, 108, 511–520, 2011.

→ SHIMIZU, K.; OZEKI, M.; IINO, A.; NAKAJYO, S.; URAKAWA, N.; ATSUCHI, M.; Structure-Activity relationships of triterpenoid derivatives extracted from *Gymnema inodorum* leaves on glucose absorption. **Jpn. J. Pharmacol.,** 86, 223-229, 2001.

→ SHIMOYAMADA, M.; OOTSUBO, R.; NARUSE, T.; WATANABE, K.; Effects of soybean saponin on protease hydrolyses on β-lactoglobulin and α-lactalbumin. **Biosciences, Biotechnology and Biochemsitry,** 64 (4), 891-893, 2000.

→ SHU, Y.Y.; KO, M.Y.; CHANG, Y.S.; Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. **Microchemical Journal**, 74, 131–139, 2003.

→ SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A.; Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, 52, 229–233, 2005.

→ SILVEIRA, F.; CIBULSKI, S.P.; VARELA, A.P.; MARQUES, J.M.; CHABALGOITY, A.; DE COSTA, F.; YENDO, A.C.A.; GOSMANN, G.; ROEHE, P.M.; FERNÁNDEZ, C.; FERREIRA, F.; *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. **Vaccine,** 29, 9177– 9182, 2011.

→ SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 7ª ed, LTC Editora, Rio de Janeiro, 2006.

→ SINGH, R.K.; RIZVI, S.S.H.; **Bioseparations Processes in Foods.** Marcel Dekker, New York, USA, 1995.

→ SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P.; Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, 25, 99–121, 2007.

→ SKURTYS, O.; AGUILERA, J.M.; Formation of O/W macroemulsions with a circular microfluidic device using saponin and potato starch. **Food Hydrocolloids,** 23, 1810–1817, 2009.

→ SMITH, H.J.; SIMONS, C.; **Enzymes and Their Inhibition: Drug Development**, CRC Press, Boca Raton, USA, 2005.

→ SOMOGYI, M.; Notes on Sugar Determination. **J. Biol. Chem**. 195, 19 - 23, 1952.

→ SONG, S.; ZHU, L.; ZHOU, W.; Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. **Environmental Pollution**, 156, 1368–1370, 2008.

→ SONG, X.; HU, S.; Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. **Vaccine**, 27, 4883-4890, 2009.

→ SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M.; Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 21, 323-331, 2010.

→ SOULIMANI, R.; YOUNOS, C.; JARMOUNI, S.; BOUSTA, D.; MISSLIN, R.; MORTIER, F.; Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, 57, 11-20, 1997.

→ SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J.; Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology,** 94, 219-243, 2004.

→ SPEHAR, C.R.; SANTOS, R.L.B.; Quinoa BRS Piabiru: alternativa para diversificar os sistemas de produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37 (6), 889-893, 2002.

→ SPEHAR, C.R.; TEIXEIRA, D.L.; CABEZAS, W.A.R.L.; ERASMO, E.A.L.; Amaranto BRS Alegria: alternativa para diversificar os sistemas de produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38 (5), 659-663, 2003.

→ STANIMIROVA, R.; MARINOVA, K.; TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.D.; STOYANOV, S.; PELAN, E.; Surface Rheology of Saponin Adsorption Layers. **Langmuir,** 27, 12486–12498, 2011.

→ STEVENSON, P.C.; VEITCH, N.C.; The distribution of isoflavonoids in *Cicer*. **Phytochemistry**, 48 (6), 995-1001, 1998.

→ STEWART, D.; AZZINI, A.; HALL, A.T.; MORRISON, I.M.; Sisal fibres and their constituent non-cellulosic polymers. **Industrial Crops and Products**, 6, 17-26, 1997.

→ STORY, J.A.; LePAGE, S.L.; PETRO, M.S.; WEST, L.G.; CASSIDY, M.M.; LIGHTFOOT, F.G.; VAHOUNY, G.V.; Interactions of alfalfa plant and sprout saponins with cholesterol in vitro and in cholesterol-fed rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 39, 917-929, 1984.

→ STUARDO, M.; SAN MARTÍN, R.; Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. **Industrial Crops and Products,** 27, 296-302, 2008.

→ SU, L. CHEN, G.; FENG, S.G.; WANG, W.; LI, Z.F.; CHEN, H.; LIU, Y.X.; PEI, Y.H.; Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Steroids**, 74, 399–403, 2009.

→ SUBBAN, R.; VEERAKUMAR, A.; MANIMARAN, R.; HASHIM, K.M.; BALACHANDRAN, I.; Two new flavonoids from *Centella asiatica* (Linn.). **Journal of Natural Medicine**, 62, 369-373, 2008.

→ SUGIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, S.; YAMASHITA, C.; ODA, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M.; Brazilian Natural Medicines. III.1) Structures of Triterpene Oligoglycosides and Lipase Inhibitors from Mate, Leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 57 (3), 257-261, 2009.

→ SÜLEYMAN, H.; MSHVILDADZE, V.; GEPDIREMEN, A.; ELIAS, R.; Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. **Phytomedicine,** 10, 370-374, 2003.

→ SUN, B.; RICARDO-DA-SILVA, J.M.; SPRANGER, I.; Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 46, 4267-4274, 1998.

→ SUN, H.; YANG, Z.; YE, Y.; Structure and biological activity of protopanaxatriol-type saponins from the roots of Panax notoginseng. **International Immunopharmacology**, 6, 14-25, 2006.

→ SUN, C.; XIE, Y.; LIU, H.; Microwave-assisted micellar extraction and determination of glycyrrhizic acid and liquiritin in licorice root by HPLC. **Chin. J. Chem. Eng.**, 15 (4), 474-477, 2007a.

→ SUN, C.; XIE, Y.; TIAN, Q.; LIU, H.; Separation of glycyrrhizic acid and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 305, 42–47, 2007b.

→ SUN, C.; XIE, Y.; TIAN, Q.; LIU, H.; Analysis of Glycyrrhizic Acid and Liquiritin in Liquorice root with Microwave-assisted Micellar Extraction and Pre-concentration. **Phytochemical Analysis**, 19, 160–163, 2008.

→ SUN, H.X.; VIE, Y.; YE, Y.P.; Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine,** 27, 1787–1796, 2009.

→ SUN, Y.; LI, W.; WANG, J.; Ionic liquid based ultrasonic assisted extraction of isoflavones from *Iris tectorum* Maxim and subsequently separation and purification by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, 879, 975–980, 2011.

→ SUNDFELD, E.; YUN, S.; KROCHTA, J.M.; RICHARDSON, T.; Separation of Cholesterol from butteroil using Quillaja saponins. 1. Effects of pH, contact time and adsorbent. **Journal of Food Process Engineering**, 16, 191-205, 1993.

→ SUNG, W.S.; LEE, D.G.; The Combination Effect of Korean Red Ginseng Saponins with Kanamycin and Cefotaxime against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin,** 31(8), 1614—1617, 2008.

→ SUR, P.; CHAUDHURI, T.; VEDASIROMONI, J.R.; GOMES, A.; GANGULY, D.K.; Antiinflammatory and Antioxidant Property of Saponins of Tea [*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze] Root Extract. **Phytotherapy Research**, 15, 174-176, 2001.

→ SUTTISRI, R.; CHUNG, M. S.; KINGHORN, A. D.; STICHER, O.; HASHIMOTO, Y.; Periandrin V, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. **Phytochemistry,** 34 (2), 405-408, 1993.

→ SZAKIEL, A.; GRZELAK, A.; DUDEK, P.; JANISZOWSKA, W.; Biosynthesis of oleanolic acid and its glycosides in *Calendula officinalis* suspension culture. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41, 271–275, 2003.

→ TADROS, T.F.; **Applied Surfactants: Principles and Applications.** Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, 2005.

→ TAKAHASHI, S.; HORI, K.; HOKARI, M.; GOTOH, T.; SUGIYAMA, T.; Inhibition of human renin activity by saponins. **Biomedical Research,** 31 (2), 155-159, 2010.

→ TAM, K.I.; RONER, M.R.; Characterization of in vivo anti-rotavirus activities of saponin extracts from *Quillaja saponaria* Molina. **Antiviral Research**, 90, 231–241, 2011.

→ TAVA, A.; MELLA. M.; BIALY, Z.; JURZYSTA, M.; Stability of Saponins in Alcoholic Solutions: Ester Formation as Artifacts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 51, 1797-1800, 2003.

→ TEIXEIRA, J. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J. R.; Timbós: ichthyotoxic plants used by Brazilian Indians. **Journal of Ethnopharmacology,** 10 (3), 311-318, 1984.

→ TEO, C.C.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; HEW, C.S.; ONG, E.S.; Pressurized hot water extraction (PHWE). **Journal of Chromatography A**, 1217, 2484–2494, 2010.

→ THOMPSON, L.; **Enrichment of Biologically Active Compounds from Selected Plants Using Adsorptive Bubble Separation**. Dissertation (Doktors der Naturwissenschaften). Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Technische Universität München, München, Alemanha, 2004.

→ THRING, T.S.A.; HILI, P.; NAUGHTON, D.P.; Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine,** 9 (27), 11 pages, 2009.

→ TIAN, M.; YAN, H.; ROW, K.H.; Extraction of Glycyrrhizic Acid and Glabridin from Licorice. **International Journal of Molecular Sciences,** 9, 571-577, 2008a.

→ TIAN, M.; YAN, H.; ROW, K.H.; Simultaneous Extraction and Separation of Liquiritin, Glycyrrhizic Acid, and Glabridin from Licorice Root with Analytical and Preparative Chromatography. **Biotechnology and Bioprocess Engineering,** 13, 671-676, 2008b.

→ TIAN, M.; BI, W.; ROW, K.H.; Solid-phase extraction of liquiritin and glycyrrhizic acid from licorice using ionic liquid-based silica sorbent. **Journal of Separation Science,** 32, 4033-4039, 2009.

→ TIANWEI, T.; QING, H.; QIANG, L.; Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system. **Biotechnology Letters**, 24, 1417-11420, 2002.

→ TIWARI, A.; JADON, R.S.; TIWARI, P.; NAYAK, S.; Phytochemical Investigations of Crown of *Solanum melongena* fruit. **International Journal of Phytomedicine,** 1, 9-11, 2009.

→ TORSSELL, K.B.G.; **Natural Product Chemistry: A mechanistic, biosynthetic and ecological approach**, 2nd ed. Swedish Pharmaceutical Press, Estocolmo, Suécia, 1997.

→ TRESCEC, A.; SIMIC, M.; BRANOVIC, K.; GEBAUER, B.; BENKO, B.; Removal of detergent and solvent from solvent–detergent-treated immunoglobulins. **Journal of Chromatography A**, 852, 87–91, 1999.

→ UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KOIKE, K.; TAKAHASHI, A.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y.; Triterpene Glycosides from the Flower Petals of Sunflower (*Helianthus annuus*) and Their Anti-inflammatory Activity. **Journal of Natural Products,** 70, 813-816, 2007.

→ URUM, K.; PEKDEMIR, T.; Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, 57, 1139–1150, 2004.

→ USUKI, T.; YASUDA, N.; YOSHIZAWA-FUJITA, M.; RIKUKAWA, R.; Extraction and isolation of shikimic acid from Ginkgo biloba leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. **Chemical Communications**, 47, 10560–10562, 2011.

→ VALENTE, L.M.M.; ALVES, F.F.; BEZERRA, G.M.; ALMEIDA, M.B.S.; ROSARIO, S.L.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A.; SIANI, A.C.; Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografiaem camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16 (2), 216-223, 2006.

→ VALENTE, L.M.M.; BIZARRI, C.H.B.; LIECHOCKI, S.; BARBOZA, R.S.; PAIXÃO, D.; ALMEIDA, M.B.S.; BENEVIDES, P.J.C.; MAGALHÃES, A.; SIANI, A.C.; Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 20 (6), 1041-1045, 2009.

→ VAN DE VEN, H.; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERG, W.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A.; PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β-aescin: Factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics,** 420, 122–132, 2011.

→ VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P.; Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances,** 24, 604–620, 2006.

→ VAN SETTEN, D.C.; JAN TEN HOVE, G.; WIERTZ, E.J.H.J.; KAMERLING, J.P.; VAN DE WERKEN, G.; Multiple-Stage Tandem Mass Spectrometry for Structural Characterization of Saponins. **Analytical Chemistry**, 70 (20), 4401-4409, 1998.

→ VIDAL-OLLIVIER, E.; BALANSARD, G.; FAURE, R.; BABADJAMIAN, A.; Revised Structures of Triterpenoid Saponins from the Flowers of *Calendula officinalis*. **Journal of Natural Products,** 52 (5), 1156-1159, 1989.

→ VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D.; Applications and opportunities for ultrsound assisted extraction in the food industry – A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9, 161-169, 2008.

→ VINCKEN, J. P.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H.; Saponins, classification and occurrence in plant kingdom. **Phytochemistry,** 68, 275-297, 2007.

→ VOLPATO, A.M.M.; **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. Tese (Doutorado). Química Orgânica, UFPR, Curitiba, 2005.

→ VONGSANGNAK, W.; GUA, J.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG, J.J.; Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*. **Biochemical Engineering Journal**, 18, 115–120, 2004.

→ WALLACE, R.J.; Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63, 621–629, 2004.

→ WALLER, G.R.; Recent Advances in Saponins Used in Foods, Agriculture, and Medicine. In: CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J.; **Biologically Active Natural Products: Agrochemicals**. CRC Press, New York, 1999.

→ WAN, J.B.; YANG, F.Q.; LI, S.P.; WANG, Y.T.; CUI, X.M.; Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, 1596–1601, 2006.

→ WANEZAKI, S.; TSUZAKI, S.; ARAKI, H.; **Soybean saponin-containing material and process for producing the same.** US2005/0123662 A1, 9 junho 2005.

→ WANG, Y.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMAZAKI, K.; Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry,** 45 (4), 811-817, 1997.

→ WANG, H.; PROVAN, G.J.; HELLIWELL, K.; Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. **Trends in Food Science & Technology**, 11, 152-160, 2000.

→ WANG, H.C.; CHEN, C.R.; CHANG, C.J.; Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. **Food Chemistry**, 72, 505-509, 2001.

→ WANG, Q.; MA, S.; FU, B.; LEE, F.S.C.; WANG, X.; Development of multi-stage countercurrent extraction technology for the extraction of glycyrrhizic acid (GA) from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). **Biochemical Engineering Journal,** 21, 285-292, 2004.

→ WANG, L.; WELLER, C.L.; Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology,** 17, 300-312, 2006.

→ WANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; ZHU, S.; LI, Y.; LI, M.; YU, B.; Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** 15, 2528-2532, 2007.

→ WANG, Y.; YAN, Y.; HU, S.; HAN, J.; XU, X.; Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and correlation. **Journal of Chemical Engineering Data**, 55, 876-881, 2010a.

→ WANG, Y.; HU, S.; HAN, J.; YAN, Y.; Measurement and correlation of phase diagram data for several hydrophilic alcohol + citrate aqueous two-phase systems at 298.15 K. **Journal of Chemical Engineering Data**, 55, 4574-4579, 2010b.

→ WANG, X.; LI, H.; CAO, Y.; TANG, Q.; Cellulose extraction from wood chip in an ionic liquid 1-allyl-3-methylimidazolium chloride (AmimCl). **Bioresource Technology,** 102, 7959–7965, 2011.

→ WANG, D.; LIAO, P.Y.; ZHU, H.T.; CHEN, K.K.; XU, M.; ZHANG, Y.J.; YANG, C.R.; The processing of Panax notoginseng and the transformation of its saponin components. **Food Chemistry,** doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.010, 2012.

→ WASSERSCHEID, P.; WELTON, T.; Ionic Liquids in Synthesis, 2nd ed., WILEY-VCH Verlag, Weinheim, Alemanha, 2008.

→ WATERMAN, P. G.; MOLE, S.; **Analysis of Phenolic Plant Metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

→ WEINGÄRTNER, H.; Understanding Ionic Liquids at the Molecular Level: Facts, Problems, and Controversies. **Angewandte Chemie International Edition**, 47, 654–670, 2008.

→ WENZIG, E.; KUNERT, O.; FERRIERA, D.; SCHMID, M.; SCHÜHLY, W.; BAUER, R.; HIERMANN, A.; Flavonolignans from *Avena sativa*. **Journal of Natural Products**, 68, 289-292, 2005.

→ WIE, H.J.; ZHAO, H.L.; CHANG, J.H.; KIM, Y.S.; HWANG, I.K.; JI, G.E.; Enzymatic Modification of Saponins from *Platycodon grandiflorum* with *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 8908-8913, 2007.

→ WILKINSON, J.A.; BROWN, A.M.G.; Horse chestnut – *Aesculus hippocastanum*: potential applications in cosmetic skin-care products. **International Journal of Cosmetic Science,** 21, 437-447, 1999.

→ WOJCIECHOWSKI, K.; PIOTROWSKI, M.; POPIELARZ, W.; SOSNOWSKI, T.R.; Short- and mid-term adsorption behaviour of Quillaja Bark Saponin and its mixtures with lysozyme. **Food Hydrocolloids,** 25, 687-693, 2011.

→ WOLDEMICHAEL, G. M.; WINK, M.; Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 49, 2327-2332, 2001.

→ WOOD, J.A.; BERNARDS, M.A.; WAN, W.K.; CHARPENTIER, P.A.; Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 39, 40–47, 2006.

→ WU, J.; LIN, L.; CHAU, F.T.; Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry,** 8, 347-352, 2001.

→ WU, K.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; TANG, F.; LONG, Y.; YAO, S.; Ionic liquid surfactant-mediated ultrasonic-assisted extraction coupled to HPLC: Application to analysis of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* bunge. **Journal of Separation Science,** 32, 4220-4226, 2009.

→ WU, X.; LIU, L.; ZHANG, M.; WU, D.; WANG, Y.; SUN, Y.; FAWCETT, J.P.; GU, J.; ZHANG, J.; Simultaneous analysis of isomers of escin saponins in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to a pharmacokinetic study after oral administration. **Journal of Chromatography B**, 878, 861–867, 2010.

→ WU, H.; CHEN, M.; FAN, Y.; ELSEBAEI, F.; ZHU, Y.; Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction–liquid chromatography–chemiluminescence detection. **Talanta,** 88, 222-229, 2012.

→ XI, M.; HAI, C.; TANG, H.; CHEN, M.; FANG, K.; LIANG, X.; Antioxidant and Antiglycation Properties of Total Saponins extracted from Traditional Chinese Medicine used to treat Diabetes Mellitus. **Phytotherapy Research**, 22, 228–237, 2008.

→ XIAO, Y.; WANG, Y.; GAO, S.; ZHANG, R.; REN, R.; LI, N.; ZHANG, H.; Determination of the active constituents in *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. by ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, 879, 1833–1838, 2011.

→ XIAO, Y.; ZHANG, H.; Homogeneous ionic liquid microextraction of the active constituents from fruits of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*. **Analytica Chimica Acta,** 712, 78–84, 2012.

→ XIONG, J.; GUO, J.; HUANG, L.; MENG, B.; PING, Q.; Self-micelle formation and the incorporation of lipid in the formulation affect the intestinal absorption of *Panax notoginseng*. **International Journal of Pharmaceutics**, 360, 191–196, 2008.

→ XU, R.; FAZIO, G.C.; MATSUDA, S.P.T.; On the origins of triterpenoidal skeletal diversity. **Phytochemistry,** 65, 261-291, 2004.

→ XU, B.; CHANG, S.K.C.; Phytochemical Profiles and Health-Promoting Effects of Cool-Season Food Legumes As Influenced by Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 57, 10718-10731, 2009.

→ YADA, R.Y.; **Proteins in Food Processing.** CRC Press, Boca Raton, USA, 2004.

→ YAHARA, S.; DING, N.; NOHARA, T.; MASUDA, K.; AGETA, H.; Taraxastane glycosides from *Eclipta alba*. **Phytochemistry,** 44 (1), 131-135, 1997.

→ YAN, J.; WU, Z.; ZHAO, Y.; JIANG, C.; Separation of tea saponin by two-stage foam fractionation. **Separation and Purification Technology**, 80, 300–305, 2011.

→ YANG, C.R.; ZHANG, Y.; JACOB, M.R.; KHAN, S.I.; ZHANG, Y.J.; LI, X.C.; Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50 (5), 1710–1714, 2006.

→ YANG, L.; WANG, H.; ZU, Y.G.; ZHAO, C.; ZHANG, L.; CHEN, X.; ZHANG, Z.; Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, 172, 705–712, 2011a.

→ YANG, L.; LIU, Y.; ZU, Y.G.; ZHAO, C.J.; ZHANG, L.; CHEN, X.Q.; ZHANG, Z.H.; Optimize the process of ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of aesculin and aesculetin from Cortex fraxini by response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, 175, 539–547, 2011b.

→ YAPO, B.M.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; Comparison of alcohol precipitation and membrane filtration effects on sugar beet pulp pectin chemical features and surface properties. **Food Hydrocolloids,** 21, 245–255, 2007.

→ YE, L. ZHOU, C.Q.; ZHOU, W.; ZHOU, P.; CHEN, D.F.; LIU, X.H.; SHI, X.L.; FENG, M.Q.; Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rd by highly substrate-tolerant *Paecilomyces bainier* 229-7. **Bioresource Technology,** 101, 7872-7876, 2010.

→ YOSHIKAWA, K.; ARIHARA, S.; WANG, J. D.; NARUI, T.; OKUYAMA, T.; Structures of two new fibrinolytic saponins from the seed of *Luffa cylindrica* ROEM. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 39 (5), 1185-1188, 1991.

→ YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KADOYA, M.; MATSUDA, H.; MURAOKA, O.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N.; Medicinal Foodstuffs. III. Sugar Beet. (1): Hypoglycemic Oleanolic Acid Oligoglycosides,

Betavulgarosides I, II, III, and IV, from the Root of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** 44 (6), 1212-1217, 1996a.

→ YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N.; KITAGAWA, I.; Bioactive saponins and glycosides. III. Horse Chestnut. (1): The structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** 44 (8), 1454-1464, 1996b.

→ YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KADOYA, M.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H.; Medicinal Foodstuffs. XV. Sugar Beet. (2): Structures of Betavulgarosides V, VI, VII, VIII, IX and X, from the Roots and Leaves of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L., Chenopodiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** 46 (11), 1758-1763, 1998.

→ YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; KAGEURA, T.; MATSUDA, H.; Medicinal Flowers. III.1) Marigold. (1): Hypoglycemic, Gastric Emptying Inhibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis.* **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 49 (7), 863-870, 2001.

→ YOSHIKAWA, M.; MORIKAWA, T.; NAKANO, K.; PONGPIRIYADACHA, Y.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; Characterization of New Sweet Triterpene Saponins from *Albizia myriophylla*. **Journal of Natural Products**, 65, 1638-1642, 2002.

→ YOSHIKI, Y.; KUDOU, S.; OKUBO, K.; Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 62 (12), 2291-2298, 1998.

→ YOSHIKI, Y.; TAKAGI, S.; WATANABE, M.; OKUBO, K**.;** Fractionation of soybean functional glycosides from soy-waste based on the chemical reaction of soyasaponin βg. **Food Chemistry**, 93 (4), 591-597, 2005.

→ YU, Q.L.; DUAN, H.Q.; GAO, W.Y.; TAKAISHI, Y.; A new triterpene and a saponin from *Centella asiatica*. **Chinese Chemical Letters,** 18, 62-64, 2007.

→ YUAN, X.Z.; MENG, Y.T.; ZENG, G.M.; FANG, Y.Y.; SHI, J.G.; Evaluation of tea-derived biosurfactant on removing heavy metal ions from dilute wastewater by ion flotation. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 317, 256–261, 2008.

→ ZENG, H.; WANG, Y.; KONG, J.; NIE, C.; YUAN, Y.; Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants. **Talanta**, 83, 582–590, 2010.

→ ZHANG, Y.; LI, H.Z.; ZHANG, Y.J.; JACOB, M.R.; KHAN, S.I.; LI, X.C.; YANG, C.R.; Atropurosides A–G, new steroidal saponins from *Smilacina atropurpurea*. **Steroids,** 71, 712–719, 2006a.

→ ZHANG, Z.; LI, S.; ZHANG, S.; GORENSTEIN, D.; Triterpenoid saponins from the fruits of *Aesculus pavia***. Phytochemistry,** 67, 784–794, 2006b.

→ ZHANG, S.Q.; ZHANG, J.S.; WANG, C.Z.; Extraction of steroid saponins from *Paris polyphylla* Sm. var. *yunnanensis* using novel ultrahigh pressure extraction technology. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 41 (8), 27-31, 2007.

→ ZHANG, L.; GENG, Y.; DUAN, W.; WANG, D.; FU, M.; WANG, X.; Ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of fangchinoline and tetrandrine from *Stephaniae tetrandrae*. **Journal of Separation Science,** 32, 3550-3554, 2009.

→ ZHANG, L.; WANG, X.; Hydrophobic ionic liquid-based ultrasound-assisted extraction of magnolol and honokiol from cortex *Magnoliae officinalis.* **Journal of Separation Science**, 33, 2035-2038, 2010.

→ ZHANG, H.F.; YANG, X.H.; WANG, Y.; Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. **Trends in Food Science & Technology**, 22, 672-688, 2011.

→ ZHAO, S.; KWOK, K.C.; LIANG, H.; Investigation on ultrasound assisted extraction of saikosaponins from *Radix Bupleuri*. **Separation and Purification Technology,** 55, 307-312, 2007.

→ ZHAO, H.L.; HARDING, S.V.; MARINANGELI, C.P.F.; KIM, Y.S.; JONES, P.J.H.; Hypocholesterolemic and Anti-Obesity Effects of Saponins from *Platycodon grandiflorum* in Hamsters Fed Atherogenic Diets. **Journal of Food Science,** 73 (8), H195-H200, 2008.

→ ZHENG, C.J.; QIN, L.P.; Chemical components of Centella asiatica and their bioactivities. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, 5(3), 348-351, 2007.

→ ZHOU, W.; YANG, J.; LOU, L.; ZHU, L.; Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. **Environmental Pollution**, 159, 1198-1204, 2011.

→ ZIMMER, A.R.; BRUXEL, F.; BASSANI, V.L.; GOSMANN, G.; HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 40, 450–453, 2006.

→ ZOU, P.; FU, J.; YU, H.S.; ZHANG, J.; KANG, L.P.; MA, B.P.; YAN, X.Z.; The NMR studies on two new furostanol saponins from *Agave sisalana* leaves. **Magnetic Resonance in Chemistry,** 44, 1090-1095, 2006.

GLOSSÁRIO

Adjuvantes: compostos que auxiliam os antígenos aumentando de maneira especifica a resposta imune humoral e/ou celular contra os mesmos (Bernardo, 1998).

Biopirataria: prática ilegal de exploração, manipulação, exportação e comercialização de recursos biológicos de um país a outro (http://www.conexaoprofessor.rj.gov.br/, 2009).

Bioprospecção: atividades que acessam recurso genético, seus derivados ou conhecimento tradicional associado, descritas em projeto cujo objetivo preveja aplicações de interesse econômico (http://www.planalto.gov.br/, 2009).

Constante dielétrica: habilidade de um material de armazenar energia potencial elétrica sob a influência de um campo elétrico. Quanto maior a constante dielétrica, mais o solvente converte as microondas em energia térmica (Lidström *et al*, 2001).

Convenção para Diversidade Biológica: foi lançada no Brasil durante a realização da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento em junho de 1992. Considerada o marco referencial para as ações relativas à biodiversidade planetária, tem como objetivos a conservação e a utilização sustentável da biodiversidade e a repartição justa e eqüitativa dos benefícios decorrentes de sua utilização, bem como dos conhecimentos tradicionais a eles associados (Rodrigues, 2009).

Manejo Sustentável de Recursos Naturais: É um planejamento que busca o aproveitamento econômico simultâneo à preservação dos recursos florestais e aquáticos, visando à perpetuação da sua cobertura vegetal, à conservação da biodiversidade e ao desenvolvimento social. Para realizar o manejo dos recursos naturais é preciso ter autorização do órgão competente, ou seja, do IBAMA (Benatti *et al*, 2003).

Produção mais limpa: aplicação continua de uma estratégia ambiental integrada e preventiva a processos e produtos para redução de riscos a população e ao meio ambiente. Em relação aos processos, é associada a conservação de matérias-primas, e a redução da qualidade e toxidez e todas as emissões e resíduos antes que deixem o processo. Em relação aos produtos, a estratégia é focada na redução de impactos durante o ciclo de vida deste, desde a extração da matéria prima até a sua disposição final (Clark & Macquarrie, 2002).

Rasurado: Material que foi submetido à fragmentação por meio de ralador, lima ou raspador (http://michaelis.uol.com.br/, 2010).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos já submetidos:

- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. **Waste and Biomass Valorization.**

Artigos a serem submetidos:

- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; Application of Foam Column as Green Technology for Concentration of Saponins from Sisal (*Agave sisalana*) and Juá (*Ziziphus joazeiro*). **Brazilian Journal of Chemical Engineering.**

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; REBELO, L.P.N.; MARRUCHO, I.M.; Use of Ionic Liquids for Extraction of Saponins from Mate (*Ilex paraguariensis*) and Tea (*Camellia sinensis*). **Separation and Purification Technology.**

Trabalhos apresentados:

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; FREITAS, S.P.; BARRETO, D.W.; **Searching for potential plant extracts as natural surfactants**. 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, 09 a 12 de novembro de 2009.

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; BARRETO, D.W.; **Avaliação das propriedades micelares das saponinas de juá (*Ziziphus joazeiro*) utilizando planejamento experimental**. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 07 a 10 de novembro de 2010.

- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; **Comparação dos métodos de extração de saponinas do juá (*Ziziphus joazeiro*)**. XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 07 a 10 de novembro de 2010.

- SANTOS, R.S.; RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; **Avaliação do efeito inibidor de saponinas do juá (*Ziziphus joazeiro*) sobre lipases.** XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 07 a 10 de novembro de 2010.

- RIBEIRO, B.D.; SANTOS, R.S.; SOUSA, Y.A.V.; COELHO, M.A.Z.; **Effect of Saponins from *Agave sisalana* and *Ziziphus joazeiro* on Digestive Enzymes**. 10th International Symposium on Biocatalysis (Giardini Naxos, Itália), 02 a 06 de outubro de 2011.

Trabalhos a serem apresentados:

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; **Use of biocompatible ionic liquids for extraction of saponins from *Agave sisalana*.** XVI World Congress of Food Science and Technology, 5 a 9 de agosto de 2012.

- SOUSA, Y.A.V.; RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; **Modification of Enzymatic Activity of Proteases by saponins from *Ziziphus joazeiro* and *Agave sisalana*.** XVI World Congress of Food Science and Technology, 5 a 9 de agosto de 2012.

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; **Extraction of saponins from *Ziziphus joazeiro* with cholinium-based ionic liquids and analogues.** 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 25 a 29 de agosto de 2012.

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; REBELO, L.P.N.; MARRUCHO, I.M.; **Extraction of saponins from green tea (*Camellia sinensis*) using ionic liquids.** 4th International IUPAC Conference on Green Chemistry, 25 a 29 de agosto de 2012.

- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; **Uso de coluna de espuma para concentração das saponinas de juá (*Ziziphus joazeiro*)**. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 09 a 12 de setembro de 2012.

- RIBEIRO, B.D.; BARRETO, D.W.; COELHO, M.A.Z.; **Pré-concentração por ponto de névoa das saponinas do resíduo mucilaginoso de sisal (*Agave sisalana*).** XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 09 a 12 de setembro de 2012.

- RIBEIRO, B.D.; COELHO, M.A.Z.; REBELO, L.P.N.; MARRUCHO, I.M.; **Uso de líquidos iônicos para extração de saponinas de mate (*Ilex paraguariensis*).** XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 09 a 12 de setembro de 2012.

ANEXO

Figura 72 – Extratos metanólicos das plantas utilizadas nesta tese

Figura 73 - Atividade antimicrobiana por difusão em ágar. Resultados positivos, 17: Juá e 47: Alho

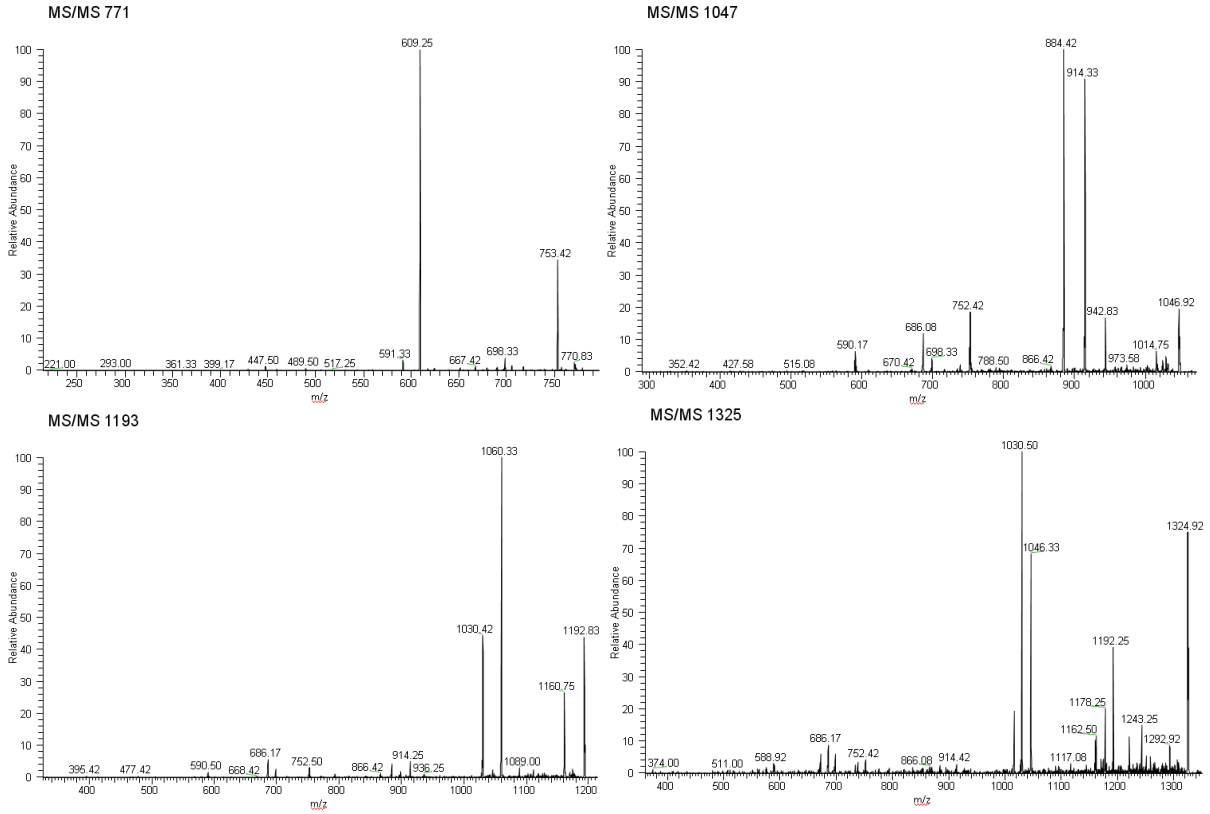


Figura 74 – MS/MS de alguns picos relativos as saponinas do sisal

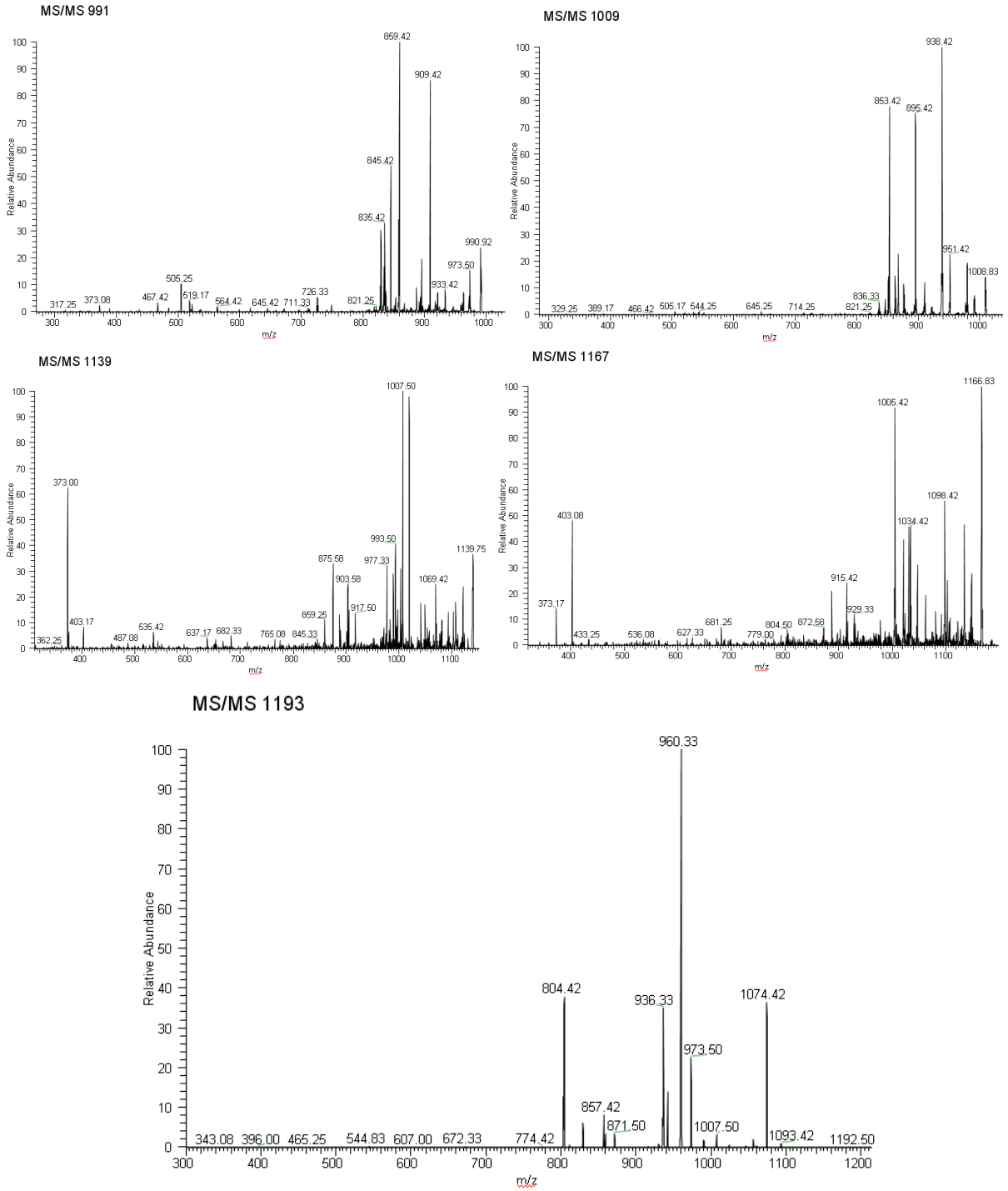


Figura 75 – MS/MS de alguns picos relativos as saponinas do juá

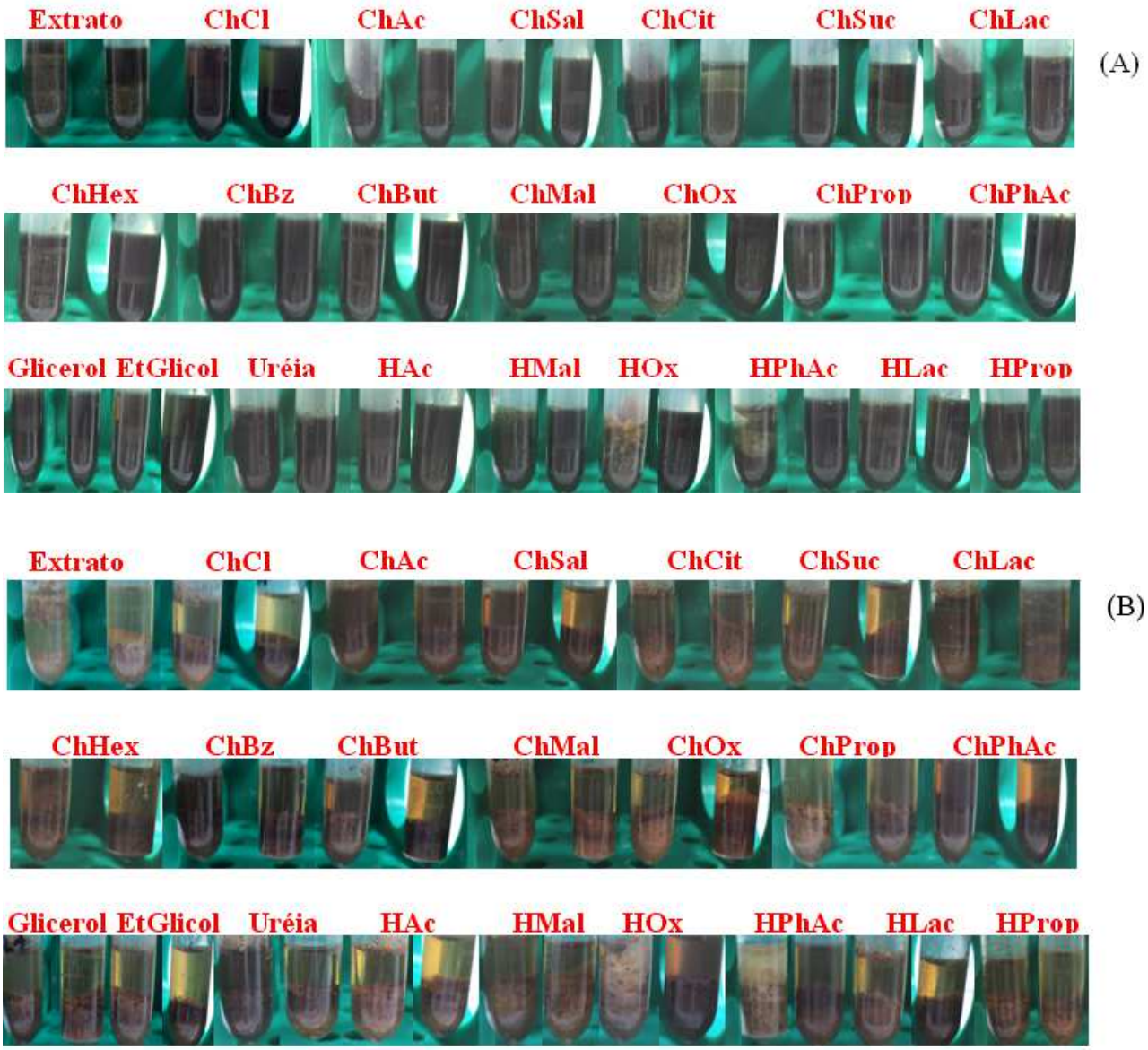


Figura 76 – Extração de saponinas de sisal (A) e de juá (B) utilizando líquidos iônicos e análogos contendo ChCl/aditivo 1/2 molar, e co-solventes sendo a esquerda água e a direita etanol 30%

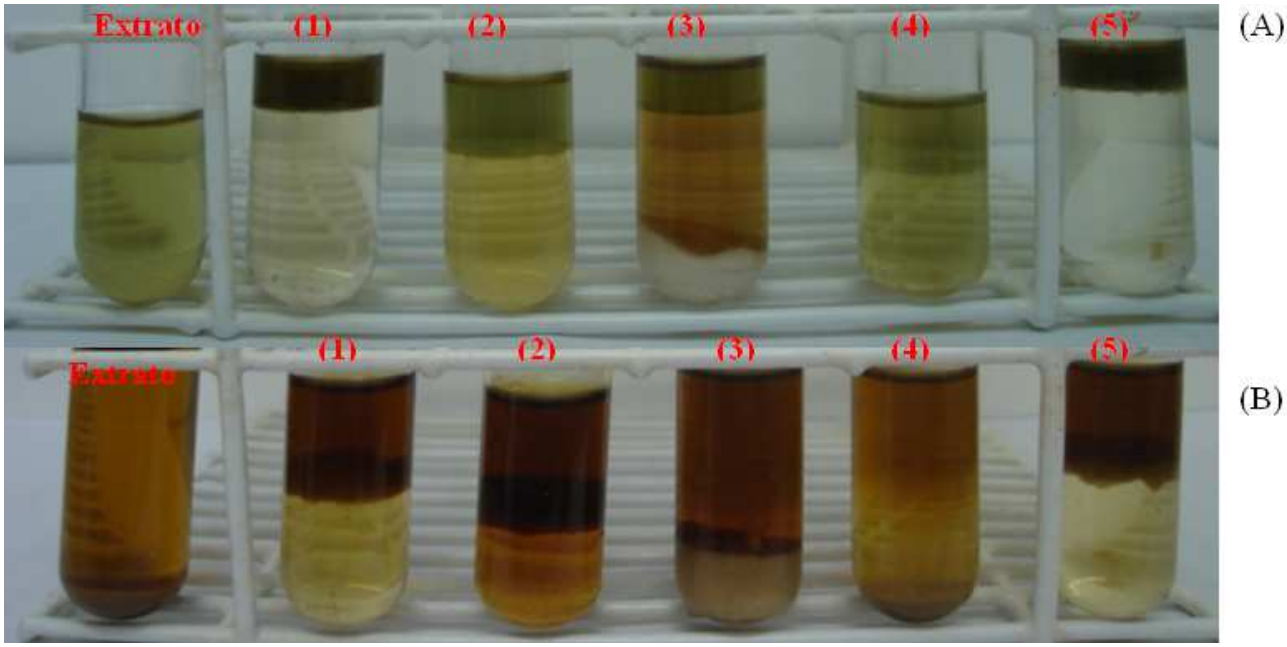


Figura 77 – Exemplos da aplicação de diferentes sais para concentração de saponinas de sisal (A) e de juá (B) por ponto de névoa. (1) citrato de sódio, (2) Na_2CO_3, (3) $NaHCO_3$, (4) $NaNO_3$, (5) $(NH_4)_2SO_4$

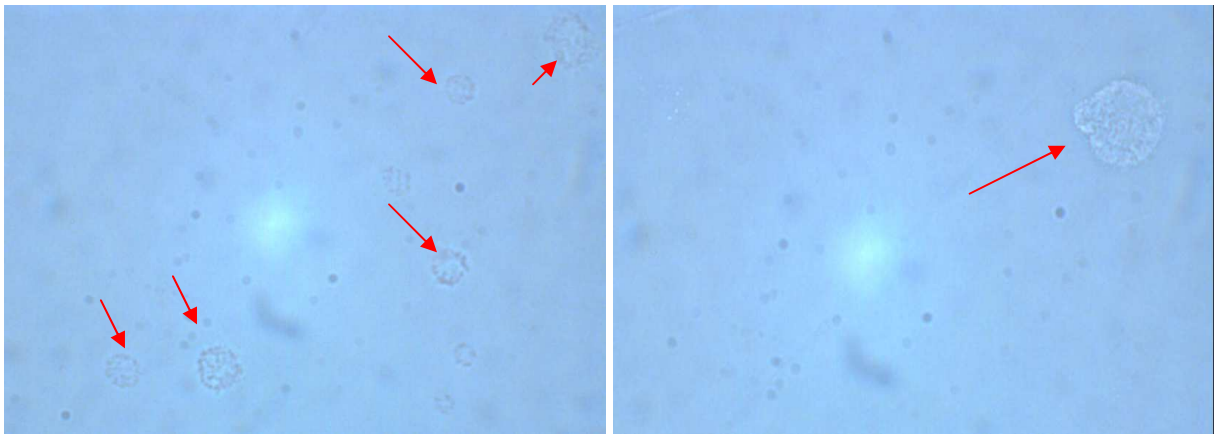


Figura 78 – Interação das saponinas com lipase (seta vermelha)