

**PAMELA DA ROCHA PATRÍCIO**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTOCIANINA UTILIZANDO SISTEMAS  
AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P314e  
2012

Patrício, Pamela da Rocha, 1987-

Extração e purificação de antocianina utilizando sistemas  
aquosos bifásicos / Pamela da Rocha Patrício. – Viçosa, MG,  
2012.

xvii, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Antocianinas. 2. Corantes - Purificação. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 630.24786

**PAMELA DA ROCHA PATRÍCIO**

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTOCIANINA UTILIZANDO SISTEMAS  
AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de agosto de 2012.

---

Paulo César Stringheta

---

Sukarno Olavo Ferreira

---

Maria do Carmo Hespanhol da Silva  
(Orientadora)

*Aos meus pais, dedico este trabalho!*

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”*

*Simone de Beauvoir*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela concretização de mais um ideal.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelo auxílio financeiro.

A Prof<sup>a</sup>. Maria do Carmo por todos os ensinamentos, orientação, confiança, paciência e incentivo.

Ao Prof. Luis Henrique pela orientação, incentivo e por ser juntamente com a professora Maria do Carmo ser exemplo de profissionalismo.

Ao meu pai pelo zelo, carinho, mimo, paciência e pelas conversas com riqueza de detalhes de tudo o que acontecia a 330 km de distância!

A minha mãe agradeço por ser tudo em minha vida! Agradeço pelo apoio e incentivo, pela infinita preocupação, amizade, pelas longas conversas para suportarmos a saudade.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho, apoio e compreensão nas inúmeras vezes que estive ausente em momentos importantes das nossas vidas.

Ao Rodrigo pelo carinho, pelo apoio incondicional, pela paciência nos meus momentos de fraqueza, pelas diversas vezes em que priorizou meus conflitos e problemas em sua vida. Enfim, agradeço por ter sido meu amigo, minha família e meu companheiro.

Aos amigos, Aparecida, Andiará, Rose, Luciana, Alessandra, Igor, Márcio, Ruth, Athália, LabQuil e as várias gerações do Quivecom! Vocês alegraram essa jornada!!!

À Aparecida, em especial, pela fundamental contribuição no trabalho.

Aos professores que aceitarem o convite para participar desta defesa.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram para este trabalho, o meu sincero agradecimento!

## **BIOGRAFIA**

Pamela da Rocha Patrício, filha de José Patrício Filho e Neusa de Rocha Patrício, nasceu em 07 de Julho de 1987, na cidade de Divinópolis, Minas Gerais.

Em maio de 2006 ingressou no curso de Química da Universidade Federal de Viçosa. Neste mesmo ano iniciou suas atividades como estagiária voluntária no grupo de pesquisa QUIVECOM, onde foi bolsista da Fapemig, no período de março de 2007 a dezembro de 2010 sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Maria do Carmo Hespanhol da Silva no Departamento de Química da UFV.

Em janeiro de 2011 graduou-se em Licenciatura e Bacharelado.

Em março de 2011, iniciou o curso no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, se submetendo a defesa de dissertação em agosto de 2012.



## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
<b>Capítulo 1: Revisão de Literatura.....</b>	<b>1</b>
1. Introdução.....	1
1.1. Estrutura das antocianinas .....	2
1.2. Fontes, usos e aplicações.....	5
1.3. Métodos de extração e purificação de antocianinas .....	6
1.3.1. Extração .....	6
1.3.2. Purificação .....	9
2. Sistemas Aquosos Bifásicos .....	12
2.1. Aplicações dos Sistemas Aquosos Bifásicos .....	15
2.2. Teoria do comportamento de partição de solutos em SABs .....	16
3. Objetivos.....	20
3.1. Objetivos Específicos .....	20
4. Referências Bibliográficas.....	21

Capítulo 2: Sistema aquoso bifásico: uma técnica segura para a purificação de antocianinas .....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1. Introdução .....	29
2. Materiais e Método .....	30
2.1. Reagentes .....	30
2.2. Equipamentos .....	31
2.3. Preparo do sistema aquoso bifásico e experimentos de partição .....	31
2.4. Coeficiente de partição.....	32
2.5. Variação da energia livre de Gibbs de transferência de antocianinas ( $\Delta_{trans}G$ ) .....	32
3. Resultados e Discussão .....	33
3.1. Influência do CLA e eletrólito sobre o comportamento partição.....	33
3.2. Influência da massa molar do polímero .....	39
3.3. Influência da hidrofobicidade do polímero .....	41
3.4. Variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas ( $\Delta_{trans}G$ ) .....	43
4. Conclusão.....	49
5. Referências Bibliográficas .....	50

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

**Figura 1.** Estrutura básica do cátion flavílium ..... 2

**Figura 2.** Principais antocianidinas encontradas na natureza..... 3

**Figura 3.** Estrutura química básica das antocianinas ..... 3

**Figura 4.** Forma química das antocianinas em função do pH do meio e reações de  
degradação..... 5

**Figura 5.** Composição do SAB composto por poli(óxido de etileno) 1500 g mol<sup>-1</sup>  
(PEO1500) + sulfato de amônio + água à 25 ° C [55]. ..... 13

**Figura 6.** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares de um SAB  
formado por um polímero e um sal. .... 14

### Capítulo 2: Sistema aquoso bifásico: uma técnica segura para a purificação de antocianinas

**Figura 1.** Efeito do CLA nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em  
sistemas formados por PEO1500+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O..... 34

- Figura 2.** Efeito do eletrólito nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA para sistemas formados por PEO1500. SAB: (▲)Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (●)Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (▼)MgSO<sub>4</sub>, (■)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. ..... 37
- Figura 3.** Estrutura molecular da antocianina predominante em pH 1.0, cátion flavílium.....39
- Figura 4.** Efeito da massa molar do PEO nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA. SAB: (▲) PEO 1500, (■) PEO 10000 and (●) PEO 35000; (A)Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (B) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (C) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and (D) MgSO<sub>4</sub>. ..... 40
- Figura 5.** Efeito da hidrofobicidade do polímero nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA para sistemas formados por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. SAB: (▲) PEO1500 (■) PEO 10000 (●) PEO 35000 (○) PPO 400. .... 42
- Figura 6.** Estrutura molecular dos monômeros: (A) óxido de etileno, formador do PEO (B) óxido de propileno, formador do PPO. .... 42
- Figura 7.** Efeito da natureza do eletrólito na variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA para sistemas formados por PEO1500. SAB: (□)Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (○) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (Δ)MgSO<sub>4</sub>, (☆)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 46
- Figura 8.** Efeito da hidrofobicidade do polímero na variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA para sistemas

formados por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . SAB: (▲) PEO1500 (■) PEO 10000 (●) PEO 35000  
(○) PPO 400. .... 47

**Figura 9.** Efeito da massa molar do PEO nos valores da variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA. SAB: (▲) PEO 1500, (■) PEO 10000 and (●) PEO 35000; (A)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (B)  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , (C)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e (D)  $\text{MgSO}_4$ . .... 48

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1: Revisão de Literatura

<b>Tabela 1.</b> Substituições do cátion flavílium formando as principais antocianidinas e antocianinas.....	4
--	---

### Capítulo 2: Sistema aquoso bifásico: uma técnica segura para a purificação de antocianinas

<b>Tabela 1.</b> Diferença na concentração de H <sub>2</sub> O (% (m/m)) entre a FS e FI dos SAB analisados a 25 °C. ....	35
---	----

<b>Tabela 2.</b> Valores de $\Delta_{trans}G$ obtidos para a transferência das antocianinas em diferentes SABs.....	44
---	----

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- $A_B$  – Absorbância de antocianina na fase inferior
- $a_{FI}$  – Atividade do soluto na fase inferior
- $a_{FS}$  – Atividade do soluto na fase superior
- CLA – Comprimento da linha de amarração
- $C_p^{FS}$  – Concentração de polímero na fase superior
- $C_p^{FI}$  – Concentração de polímero na fase inferior
- $C_E^{FS}$  – Concentração de eletrólito na fase superior
- $C_E^{FI}$  – Concentração de eletrólito na fase inferior
- EAM – Extração assistida por microondas
- ELP – Extração com Líquido Pressurizado
- EFS – Extração em fase sólida
- ELL – Extração líquido-líquido
- ELT – Extração líquido-líquido tradicional
- FI – Fase inferior
- FS – Fase superior
- $\Phi_i^{FS}$  – Fração volumétrica do componente  $i$  na fase superior
- $\Phi_i^{FI}$  – Fração volumétrica do componente  $i$  na fase inferior
- ITC – Microcalorimetria de Titulação Isotérmica
- K – Coeficiente de partição
- LA – Linha de amarração
- LB – Linha binodal
- $M_A$  – Massa molar do soluto
- $\rho$  - Número de sítios por unidade de volume
- $n_{FS}$  – Número total de moléculas na fase superior
- $n_{FI}$  – Número total de moléculas na fase inferior
- EO – Óxido de etileno
- PO – Óxido de propileno
- PEO – Poli(óxido de etileno)

PPO – Poli(óxido de propileno)

(%(m/m)) – Porcentagem massa/massa

R – Constante dos gases

SAB – Sistema aquoso bifásico

T – Temperatura

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

$\Delta_{trans}G$  – Variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas

$V_{FS}$  – Volume da fase superior

$V_{FI}$  – Volume da fase inferior

$W_{ij}$  – Energia de formação do par entre os componentes  $i$  e  $j$ .

$W_{iA}$  – Energia de formação do par entre o soluto e o componente  $i$



## RESUMO

PATRÍCIO, Pamela da Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2012. **Extração e purificação de antocianina utilizando sistemas aquosos bifásicos.** Orientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Ana Clarissa dos Santos Pires.

As antocianinas têm se destacado como corante natural na indústria alimentícia e cosmética. Além disso, o consumo regular deste corante está associado a possíveis benefícios a saúde humana despertando interesse na indústria farmacêutica e de alimentos. As técnicas utilizadas para obtenção deste corante implicam na co-extração de substâncias indesejadas que podem comprometer sua qualidade, por isso, é essencial uma etapa de purificação destes compostos antes da sua aplicação. A forma usual de purificá-los é através da extração líquido-líquido que emprega solventes orgânicos que podem ser prejudiciais ao homem e ao ambiente. Uma alternativa promissora e ambientalmente segura para substituir esta técnica são os sistemas aquosos bifásicos (SABs). Eles são constituídos majoritariamente por água e os demais componentes são atóxicos, biodegradáveis e economicamente viáveis. Os sistemas estudados eram formados pela mistura de uma solução polimérica (PEO1500, PEO10000, PEO35000 ou PPO400) e uma solução salina ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) sob condições termodinâmicas específicas de temperatura, pressão e composição. Neste trabalho foi investigado o comportamento de partição do corante natural antocianina em diferentes SABs para elucidar os fatores que regem essa partição e propor um novo método de purificação do corante. Para isso, analisou-se o efeito do comprimento da linha de amarração (CLA), natureza do eletrólito, massa molar e hidrofobicidade do polímero sobre os valores de coeficiente de partição das antocianinas ( $K_A$ ). Verificou-se que o fenômeno de partição é dependente dos valores de CLA, natureza do eletrólito e hidrofobicidade do polímero. Os sistemas constituídos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  não foram afetados pela variação da massa molar do polímero. Os valores de  $K_A$  variaram de 1,1 a 89,2, indicando que as moléculas do corante concentraram-se preferencialmente na fase rica em polímero. Este processo de transferência do corante para a fase superior foi espontâneo para todos os sistemas analisados ( $\Delta_{trans}G < 0$ ) devido a um balanço de fatores entrópicos e entálpicos.

## ABSTRACT

PATRÍCIO, Pamela da Rocha M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2012.  
**Extraction and purification of anthocyanin using aqueous two-phase systems.**  
Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Ana Clarissa dos Santos Pires.

Anthocyanins have been highlighted as a natural colorant in food and cosmetic industries. Furthermore, regular consumption of anthocyanins is associated with probable benefits to human health attracting interest in the pharmaceutical industry. The techniques used to obtain this dye involve the co-extraction of unwanted substances which may compromise its quality, so, it is essential one step of purification of these compounds prior to their application. A common manner to purify them is through the liquid-liquid extraction that uses organics solvents that can be harmful to humans and the environment. A promising alternative environmentally safe to replace this technique are the aqueous two-phase systems (ATPS). They are composed mainly by water and the others components are nontoxic, biodegradable and inexpensive. The studied systems were formed by mixing a polymer solution (PEO1500, PEO10000, PEO35000 or PPO400) and an electrolyte solution ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  or  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) at specific thermodynamic conditions of temperature, pressure and composition. In this study the partition behavior of the natural dye anthocyanin in several ATPS was investigated to elucidate the factors that govern the partition and propose a new method of purification of the colorant. So, the effect of tie-line length (TLL), nature of the electrolyte, molar mass and hydrophobicity of the polymer on the partition coefficients of the anthocyanins ( $K_A$ ) were examined. It was verified that the phenomenon of partitioning is dependent of TLL values, electrolyte nature and hydrophobicity of the polymer. The system composed of  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  were not affected by the variation of polymer molar mass. The  $K_A$  values ranged from 1.1 to 89.2, indicating that the dye molecules are preferentially concentrated in the polymer-rich phase. The dye-transfer process, was spontaneous for all studied systems ( $\Delta_{trans}G < 0$ ) due a balance of enthalpic and entropic contributions.

# Capítulo 1

## Revisão de Literatura

### 1. Introdução

O questionamento da população em relação ao impacto exercido por corantes sintéticos à saúde humana levou nos últimos anos à redução do número de corantes permitidos no preparo de alimentos como aditivo alimentar. Assim, o interesse em corantes naturais tem aumentado como consequência das ações normativas, mas também da exigência dos consumidores por alimentos mais saudáveis [1]. Por esse motivo, o estudo de corantes naturais é uma área ampla e ativa de investigação devido ao interesse de substituir corantes com efeitos tóxicos em humanos [2].

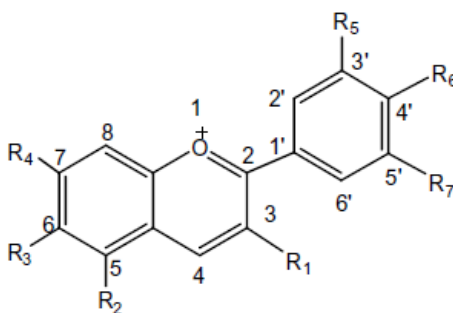
Para o corante natural ter uma boa aceitação no mercado, além de não ser prejudicial à saúde este deve conferir uma boa aparência ao produto. De acordo com a resolução nº 34, de nove de março de 2001, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que versa sobre o uso de aditivos em alimentos industrializados, o corante natural antocianina pode ser livremente utilizado no Brasil, não possuindo limite máximo para aplicação em alimentos [3]. Este corante também se destaca por promover cores atraentes a frutas, flores e legumes como laranja, violeta, púrpura, vermelho e azul despertando interesse em diferentes setores industriais [4,5]. Além dos atributos de cor, o interesse em antocianinas deve-se ao fato do mesmo possivelmente ser um aditivo alimentar funcional [2,6,7].

Todavia, a aplicação das antocianinas é limitada, pois são altamente instáveis e facilmente alteradas por fatores como temperatura, pH, concentração do corante, presença de oxigênio, luz, enzimas, ácido ascórbico, açúcares, sulfitos e sulfatos, estrutura química,

copigmentos, íons metálicos, entre outros fatores [1,2]. Outro entrave para o emprego deste corante é a dificuldade envolvida na sua purificação.

### 1.1 Estrutura das antocianinas

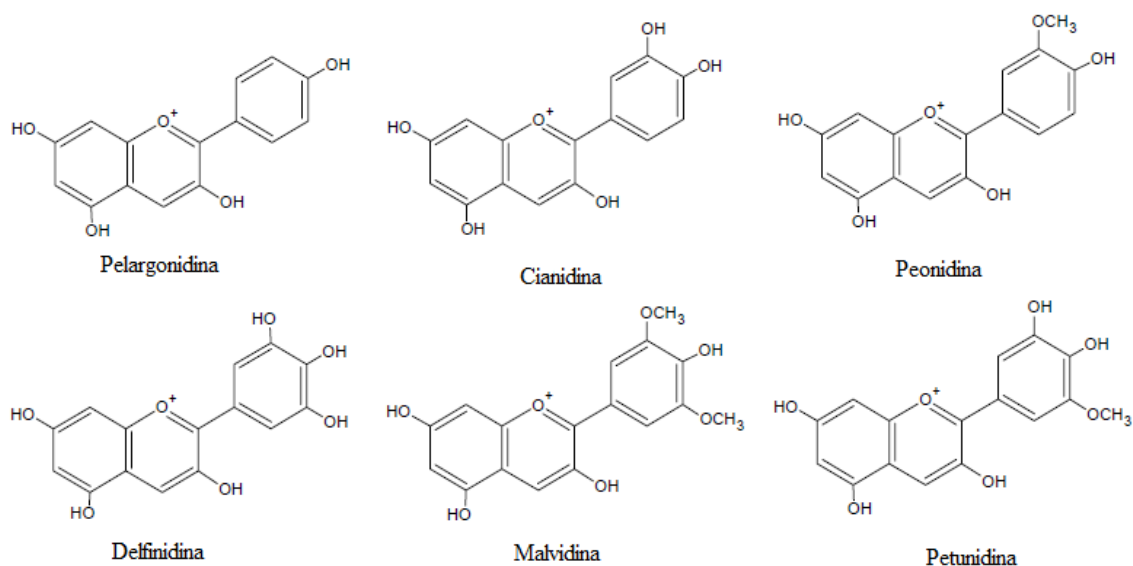
As antocianinas (do grego anthos uma flor, e kianos azul escuro) constituem o maior e mais importante grupo de pigmentos hidrossolúveis encontrado em plantas vasculares na natureza. Pertencem a classe dos flavonóides e, portanto possuem como estrutura básica o esqueleto C6-C3-C6 [7,8]. Estes pigmentos são derivados poli-hidróxi e poly-metoxi glicosilados do cátion flavílium (grupo aglicona) (Figura 1) que contém ligações duplas conjugadas responsáveis pela absorção de luz em torno de 500 nm e conseqüentemente pela cor típica desses pigmentos [1,2]



**Figura 1.** Estrutura básica do cátion flavílium

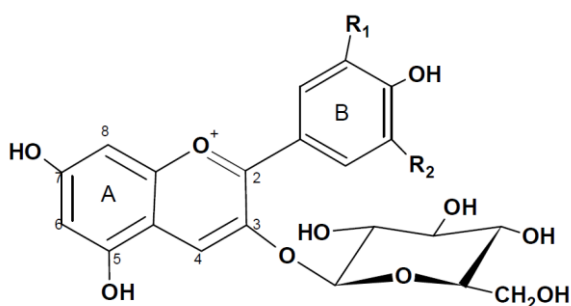
As agliconas ou cátion flavílium também são conhecidos como antocianidinas, as quais são penta (3, 5, 7, 3', 4') ou hexa substituídas (3, 5, 7, 3', 4', 5') [1]. Quando as antocianidinas são encontradas ligadas a um açúcar elas são conhecidas como antocianinas [2]. Assim, essas variações na estrutura das antocianidinas são responsáveis pela existência de

aproximadamente 600 tipos de antocianinas [8]. A estrutura das antocianidinas mais importantes é apresentada na Figura 2.



**Figura 2.** Principais antocianidinas encontradas na natureza

Antocianidinas são raramente encontradas livremente na natureza. Elas estão presentes em flores, frutas e legumes, principalmente em suas formas glicosiladas, ou seja, como antocianinas (Figura 3) [9]. A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar quando presente na molécula encontra-se na posição 5, porém podem ocorrer glicosilações nas posições 7, 3', 4' e 5' (Figura 2)[10].



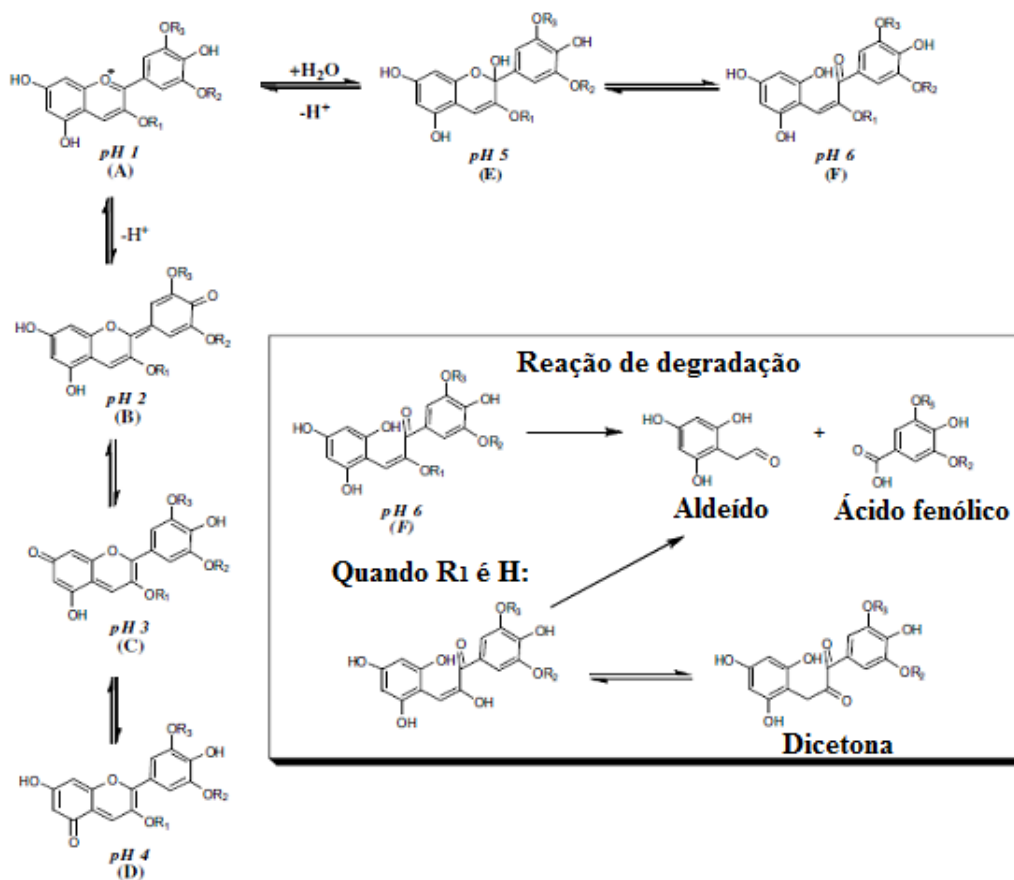
**Figura 3.** Estrutura química básica das antocianinas

Os açúcares das antocianinas podem ser acilados por ácidos orgânicos como *p*-cumárico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzóico, sinápico, malônico, acético, succínico, oxálico, málico entre outros. Os substituintes acila encontram-se comumente ligados à hidroxila do açúcar na posição 3 e com menor frequência nas posições 4 e 6. A metoxilação é mais freqüente nas substituições indicadas por R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> (Figura 3) [10]. Assim, as diferenças entre as diversas antocianinas estão no número de grupos hidroxila, metoxila, natureza e número de açúcares ligados a antocianindina, a posição destes açúcares, natureza e o número de ácidos alifáticos / aromáticos ligados aos açúcares na molécula (Tabela 1) [11].

**Tabela 1.** Substituições do cátion flavílium formando as principais antocianidinas e antocianinas

<b>Aglicona</b> (Estrutura do anel B)		<b>Substituição glicosídica</b> (Substituição nas posições 3 e 5)	<b>Acilação</b> (Esterificação das hidroxilas do açúcar)
R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H	Pelargonidina	D-glicose	<b>Ácido cinâmicos</b>
R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = H	Cianidina	D-galactose	<i>p</i> -cumárico
R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH	Delfinidina	D-xilose	ferúlico
R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = H	Peonidina	L-arabinose	caféico
R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = OH	Petunidina	Rutinose	
R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub>	Malvidina	Soforose	<b>Ácido alifáticos</b>
		Sambubiose	Acético
		Getiobiose	Malônico
			Succínico

A forma química na qual a antocianina é encontrada na natureza também é alterada de acordo com o pH do meio (Figura 4) [2]. Em pH 1,0, as cores vermelha e violeta são recorrentes uma vez que o cátion flavilium, de cor vermelha, é a espécie predominante (Figura 4A). Em valores de pH entre 2,0 e 4,0, as espécies quinoidais azuis são majoritárias (Figura 4B-D). As espécies incolores pseudobase carbinol e chancona são dominantes entre pH 5,0 e 6,0, respectivamente (Figura 4E e 4F). Em valores de pH maiores que 7,0, as antocianinas podem ser degradadas dependendo do grupo substituinte (Figura 4) [2].



**Figura 4 .** Forma química das antocianinas em função do pH do meio e reações de degradação [2].

## 1.2 Fontes, usos e aplicações

Antocianinas estão presentes em frutas e legumes como uva, maçã, acerola, jabuticaba, açaí, amora, morango, framboesa, groselha, batata doce, repolho roxo e também em flores conferindo a estas cores atraentes [5,12]. Por este motivo, este corante se tornou uma alternativa promissora para substituir corantes sintéticos na agregação de valor à imagem de produtos alimentícios. Aplicações típicas para as antocianinas incluem a formulação de iogurtes, queijos tipo *petit suisse*, bebidas isotônicas, refrigerantes, bebidas alcoólicas e tortas. Outro setor industrial que tem explorado a potencialidade das antocianinas como corantes são as indústrias de cosméticos.

Acredita-se que o consumo regular de antocianinas, esteja associado com a prevenção de doenças crônicas. Este corante possivelmente atua como antioxidante, na redução de colesterol, possui propriedades anticancerígenas, antiinflamatória, evita doença cardiovascular, neurodegenerativa entre outros benefícios [1,6,13].

Apesar do grande potencial de aplicação deste corante natural na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêuticos, o mesmo apresenta uso restrito devido à instabilidade, e dificuldades na sua purificação [1]. A purificação das antocianinas requer o emprego de grande volume e variedade de solventes, o que a torna, em alguns casos, economicamente inviável, gera grande quantidade de resíduos e compromete o meio ambiente.

### **1.3 Métodos de extração e purificação de antocianinas**

#### **1.3.1. Extração**

Para se empregar industrialmente as antocianinas, inicialmente deve-se isolar o corante. Este se localiza em células próximas a superfície das plantas facilitando sua obtenção [14]. Este corante geralmente é extraído por secagem ou liofilização de frutas ou apenas por



maceração do fruto seco seguida por sua imersão para a realização de uma extração por solvente. Como as antocianinas são moléculas hidrofílicas, os solventes comumente utilizados nas extrações são misturas aquosas de metanol, etanol ou acetona acidificados com HCl [2,14,15]. Vários procedimentos utilizados para a extração deste analito são eficientes, mas os extratos nem sempre são seguros para consumo humano devido aos efeitos tóxicos dos solventes residuais. Solvente como etanol, metanol e acetona são tóxicos à saúde humana [16].

Outros inconvenientes da técnica de extração por solvente são o longo tempo de extração e alto consumo de solvente [17,18] podendo causar danos ao meio ambiente. Por esta razão, a introdução de técnicas de extração que visem acelerar ou reduzir o volume de solvente empregado na purificação tem sido considerada, tais como extração com líquido pressurizado (ELP) [14,19-21] e extração assistida por microondas (EAM) [6,17,18,22]

ELP é uma técnica que realiza extrações utilizando solventes líquidos à temperatura e pressão elevada para manter o solvente no estado líquido. Ela aumenta o desempenho de extração, em comparação com as técnicas realizadas à temperatura ambiente e à pressão atmosférica [19,23]. Esta técnica é também conhecida como extração com solvente pressurizado; extração por solvente acelerado e extração por solvente melhorada. Quando se utiliza água como solvente de extração refere-se a esta técnica como extração por água quente pressurizada, extração com água superaquecida ou extração com água subcrítica. Neste caso, sob as condições da técnica, os rápidos movimentos das moléculas de água alteram as ligações de hidrogênio e a constante dielétrica do meio é reduzida, o que confere à água característica de solvente hidrofóbico [19,24]. Além disso, a diminuição da viscosidade e tensão interfacial do solvente nestas condições aumenta a solubilidade e a taxa de difusão dos compostos de interesse. A aplicação desta técnica na recuperação de antocianinas é

apresentada nos trabalhos de Araptisas e Turner [21], Petersson et al. [19], Santos et al. [20], entre outros.

Empregando a ELP Santos et al. [20] utilizaram etanol como solvente, pressão de 5 MPa, temperatura de 553 K e tempo de extração de 9 minutos e obtiveram a extração de  $(2,4 \pm 0,5)$  mg g<sup>-1</sup> de antocianinas de cascas de jabuticaba. No mesmo trabalho, também foi realizada uma extração por solvente convencional com etanol do mesmo fruto e obtiveram  $(1,2 \pm 0,2)$  mg g<sup>-1</sup> de antocianinas com um tempo de extração de duas horas.

Já Araptisas e Turner [21] empregaram a ELP/água superaquecida, na extração de antocianinas de repolho roxo. A melhor condição de extração foi pressão de 50 bar, temperatura 99 °C, 7 minutos de extração e composição do solvente de 94 % de água, 5 % de etanol e 1 % de ácido fórmico. A quantidade total de antocianinas, por grama de repolho fresco, com o método otimizado foi  $(0,662 \pm 0,003)$  mg g<sup>-1</sup> e  $(0,680 \pm 0,011)$  mg g<sup>-1</sup> quando a extração convencional com etanol foi utilizada.

Outra forma de obtenção das antocianinas é através da EAM [6,17,18,22]. Esta consiste na utilização de microondas para aquecer uma amostra e facilitar a partição do analito para um solvente. A capacidade de aquecer rapidamente a mistura amostra-solvente é intrínseca a EAM e também sua principal vantagem. Este aquecimento, diferentemente do convencional, se dá por conversão de energia eletromagnética em calor por rotação de dipolos e/ou condução iônica [25]. A aplicação desta técnica é ilustrada nos trabalhos de Ghassempour et al. [22], Liazid et al. [18], Li et al. [6] Yang e Zhai [17], entre outros.

Ghassempour et al. [22] obtiveram uma maior porcentagem de recuperação de antocianinas com a técnica convencional de extração  $(98,0 \pm 1,7)$  % quando comparado com a utilização da EAM,  $(90,0 \pm 8,0)$  %. Todavia, esta técnica mais sofisticada requer menor tempo de extração e menor consumo de solvente.

Yang e Zhai [17] também compararam a EAM com a técnica convencional e obtiveram uma extração mais rápida e mais eficiente de antocianinas do milho roxo. Ao utilizar 19 minutos como tempo de extração na EAM obtiveram  $(1,848 \pm 0,042)$  mg g<sup>-1</sup> do pigmento. Com o mesmo tempo de extração, obtiveram com método clássico de extração por solvente  $(1,253 \pm 0,027)$  mg g<sup>-1</sup>.

No trabalho de Liazid et al. [18] foram recuperadas 11 antocianinas presentes na casca da uva analisada utilizando tempo de extração de 5 minutos e obtiveram quantidades do corante comparáveis a técnica de extração por solvente utilizada.

Outras técnicas também têm sido aplicadas para obtenção deste pigmento como extração assistida por ultrassom [26,27] e extração com alta pressão hidrostática [28-30]. Todavia, todas as técnicas supracitadas extraem juntamente com as antocianinas, substâncias indesejadas que podem comprometer a qualidade do corante, tornando necessária uma etapa de purificação do pigmento antes da sua aplicação [2].

### **1.3.2. Purificação**

O uso de antocianinas para propósitos farmacêuticos e na indústria alimentícia torna necessária a separação deste corante de substâncias co-extraídas na etapa de obtenção do corante [31]. Açúcares, lipídeos, compostos fenólicos, aminoácidos, e metais podem acelerar a degradação das antocianinas. Além disso, estas substâncias e também a presença de toxinas naturais podem alterar a cor e o odor do extrato antociânico [32]. Para purificar estes extratos com diversos contaminantes indesejados, utiliza-se uma grande variedade de técnicas. Estas vão desde simples alternativas como extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL) até a utilização de técnicas cromatográficas mais sofisticadas, como cromatografia em

contracorrente (CCC) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP) [2], sendo esta pouco relatada na literatura.

A CCC tem sido empregada com sucesso no isolamento e fracionamento das diversas antocianinas a partir de um grande número de fontes do corante. Diferentes solventes têm sido utilizados na purificação e fracionamento do corante, uma vez que a composição das antocianinas podem variar consideravelmente de uma fonte para outra [33]. Dentre os solventes utilizados, o mais recorrente é o n-butanol [33-36].

A purificação deste corante empregando a EFS permite uma eficiente remoção de vários compostos interferentes presentes nos extratos brutos [5,32]. Normalmente esta técnica é realizada empregando cartuchos de C18 (Octadecil silano), sephadex e amberlite nos quais as antocianinas são retidas enquanto interferentes como os açúcares e ácidos passam através das colunas. Posteriormente, reduzindo-se gradativamente a hidrofobicidade do solvente removem-se separadamente compostos fenólicos interferentes das antocianinas [2,37].

Do mesmo modo, a ELL é aplicada na extração de concomitantes indesejados, como por exemplo, na remoção de lipídeos com n-hexano [38] ou com uma mistura de acetato de etila + éter de petróleo [39], na separação de outros compostos fenólicos com acetato de etila [40], na extração de clorofila com mistura de éter etílico + éter de petróleo [41] ou também com o acoplamento desta técnica com a EFS [42].

As antocianinas obtidas após as etapas de extração e purificação normalmente são quantificadas por espectrometria de absorção molecular na região do ultra-violeta/visível devido a simplicidade e baixo custo da técnica. Já a identificação deste corante é realizada por espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e com menor frequência por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) devido a dificuldade de se obter compostos de referência [2].

A ELL tradicional vem sendo aplicada na purificação de antocianinas de diferentes fontes, uma vez que a versatilidade da técnica permite a utilização de uma gama de solventes e a separação de muitos compostos indesejados. Entretanto, esta técnica emprega solventes orgânicos tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis [43] que não condizem com a nova tendência mundial de reduzir o impacto da atividade química ao ambiente. Uma técnica alternativa à ELL tradicional que vem sendo empregada com sucesso na extração e purificação de diferentes corantes [13, 44-50] são os sistemas aquosos bifásicos (SABs), que se baseiam nos princípios da química verde [51].

## 2. Sistemas Aquosos Bifásicos

Os SABs são formados majoritariamente por água, e os demais constituintes são atóxicos e não inflamáveis, o que torna esta técnica de extração ambientalmente segura. Além disso, é possível modular finamente os SABs modificando apenas a estrutura química, massa molar ou hidrofobicidade do polímero, bem como a natureza do eletrólito formador do SAB conferindo a esta técnica uma excelente eficiência na separação do soluto de interesse presente em matrizes complexas.

Os SABs podem ser formados através da mistura de uma solução de eletrólito e uma solução polimérica [52], pela combinação de dois polímeros hidrossolúveis e quimicamente distintos [53] ou ainda por duas soluções de eletrólitos [54] em condições termodinâmicas específicas de concentração, temperatura e pressão.

Os SABs apresentam inúmeras vantagens como: os componentes formadores são atóxicos, biodegradáveis, de baixo custo e podem ser reutilizados. Além disso, esses sistemas não utilizam solventes orgânicos, possuem um baixo valor de tensão interfacial e não formam emulsões estáveis o que proporciona um menor tempo para separação das fases.

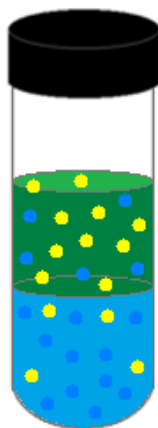
Tipicamente um SAB formado por polímero, eletrólito e água é constituído por duas fases imiscíveis, onde, normalmente a fase superior (FS) é rica em polímero e a fase inferior (FI) é rica em eletrólito como mostrado na Figura 5.

### COMPOSIÇÃO GLOBAL

[PEO 1500] = 16,78 % (m/m)

[NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>] = 11,84 % (m/m)

[ÁGUA] = 71,38 % (m/m)



### FASE SUPERIOR

[PEO 1500] = 31,60 % (m/m)

[NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>] = 5,13 % (m/m)

[ÁGUA] = 63,27 % (m/m)

### FASE INFERIOR

[PEO 1500] = 5,25 % (m/m)

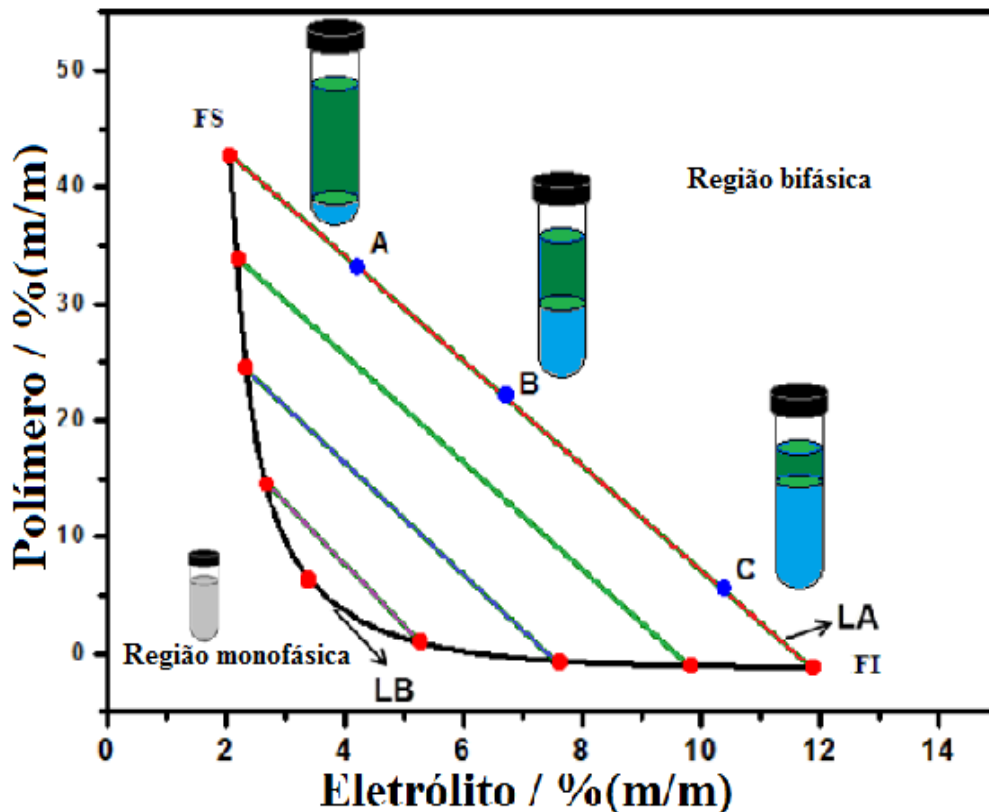
[NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>] = 18,53 % (m/m)

[ÁGUA] = 76,22 % (m/m)

**Figura 5.** Composição do SAB composto por poli(óxido de etileno) 1500 g mol<sup>-1</sup> (PEO1500) + sulfato de amônio + água à 25 ° C [55].

A composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico, é geralmente representada em um diagrama de fases retangular, como na Figura 6. Esta representação é utilizada como ferramenta fundamental para o desenvolvimento de um processo de extração e também é de grande importância para os estudos de partição [43]. Os dados de equilíbrio apresentados nesses diagramas estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema [43].

No diagrama de fases (Figura 6) a abscissa nos informa a concentração de eletrólito e a ordenada a concentração do polímero presente no sistema. Esta representação também nos mostra em quais composições globais o sistema se encontra homogêneo ou heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal (LB). A posição da binodal varia de acordo com o tipo de massa molar do polímero, natureza química do eletrólito, temperatura e pH do meio [56]. Existem diferentes métodos para a obtenção da LB, sendo geralmente utilizados os métodos de titulação turbidimétrica e de análise das composições das fases.



**Figura 6.** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.

Outra informação fornecida pelo diagrama de fases são as linhas de amarração (LA) (ex: linha FS-FI), que para uma determinada composição global do sistema (ponto B), fornece a composição das duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos FS e FI (Figura 6). Este é um parâmetro importante, pois, todas as misturas com composições globais representadas por pontos, presentes em uma mesma linha de amarração, resultarão em fase superior e fase inferior com propriedades termodinâmicas intensivas idênticas (ex: composição), porém com propriedades extensivas diferentes (ex: volume).

O comprimento da linha de amarração (CLA) também é de grande relevância, pois com ele determina o quão diferentes são as propriedades termodinâmicas intensivas das fases



em equilíbrio. Este parâmetro é calculado em função das diferenças de concentrações dos componentes em cada fase, conforme indicado na Equação 1:

$$CLA = \left[ (C_P^{FS} - C_P^{FI})^2 + (C_E^{FS} - C_E^{FI})^2 \right]^{1/2} \quad (1)$$

em que,  $C_P^{FS}$  e  $C_P^{FI}$  são as concentrações de polímero (% (m/m)) na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto  $C_E^{FS}$  e  $C_E^{FI}$  são as concentrações do eletrólito (% (m/m)) na fase superior e inferior respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, podendo elevar a eficiência na extração e/ou partição de um soluto de interesse no SAB.

## 2.1. Aplicações dos Sistemas Aquosos Bifásicos

A formação dos SAB foi descoberta por Beijerinck em 1896. Este cientista verificou que ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, em uma dada faixa de temperatura e concentração, ocorria a separação de fases. A fase inferior era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases [57,58].

No entanto, a primeira aplicação do SAB surgiu apenas em 1956 com os trabalhos de Per-Åke Albertsson, que deixou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas para a partição/purificação de materiais biológicos, como proteínas, vírus, ácidos nucléicos e células [59].

Em 1984 foi iniciada por Zvarova a extração de íons metálicos com estes sistemas, onde se estudou a extração destes íons na presença de extratores solúveis em água. Neste

trabalho também foi investigada a influência dos extratores, composição global, pH, temperatura e tipo do sal formador do SAB sobre a partição dos íons metálicos [60].

Já os trabalhos empregando SAB na partição de corantes tiveram destaque a partir da década de 90 com os trabalhos de Huddleston et al. [44] e Tong et al. [45]. O primeiro estudou o comportamento de partição dos corantes índigo carmim, ácido carmínico, amaranço, eritrosina B, tartrazina e amarelo de quinolina. O outro, o comportamento de extração de antraquinona, vermelho e azul de metileno, porfirina e metaloporfirinas [44,45]. Recentemente, Mageste et al. [50], aplicou esta técnica na partição do corante natural carmim e analisou o efeito do pH do sistema, massa molar e hidrofobicidade do polímero, CLA e natureza do eletrólito no comportamento de partição do corante.

## 2.2. Teoria do comportamento de partição de solutos em SABs

A distribuição de um soluto entre as duas fases em equilíbrio termodinâmico do SAB, quando o soluto se apresenta em uma única forma definida [61], pode ser representada pelo coeficiente de partição,  $K$ , como definido na Equação 2:

$$K = \frac{a_{FS}}{a_{FI}} \approx \frac{[C_{FS}]}{[C_{FI}]} \quad (2)$$

onde,  $a_{FS}$  e  $a_{FI}$  são as atividades do analito na fase superior e inferior respectivamente,  $C_{FS}$  e  $C_{FI}$  são as concentrações do soluto na fase superior e inferior respectivamente. Quando o soluto encontra-se muito diluído pode-se considerar que os valores de concentração e atividade são muito próximos [62].

A partição deste soluto no SAB é influenciada pela natureza do soluto e do SAB utilizado. Em relação ao soluto, os principais fatores são a presença de carga elétrica, hidrofobicidade, composição e conformação. Já em relação ao SAB, os fatores determinantes são a massa molar e a concentração do polímero, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica, o pH, a temperatura e o eletrólito formador do sistema. Outro fator importante relacionado ao SAB é a adição de diferentes eletrólitos que resulta em uma diferença de potencial elétrico na interface, que influencia expressivamente a partição de moléculas carregadas [62].

Johansson et al. [63] afirmam que quando um soluto é adicionado ao SAB sua distribuição entre as duas fases em equilíbrio termodinâmico é determinada por duas forças motrizes: uma entrópica e outra entálpica. A contribuição entrópica está associada com o aumento/redução das possibilidades de distribuição do analito entre as duas fases do sistema. Já a contribuição entálpica está relacionada com as interações intermoleculares rompidas e formadas ao longo do processo de partição do soluto.

Segundo um modelo derivado da teoria Flory–Huggins e desenvolvido por Johansson et al. [63] na ausência de forças entálpicas, a contribuição entrópica no processo de partição pode ser representada pela Equação 3:

$$\ln K_A = \frac{M_A}{\rho} \left( \frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (3)$$

onde,  $n^{FS}$  e  $n^{FI}$  são o número total de moléculas na fase superior e inferior respectivamente,  $M_A$  é a massa molar do soluto particionado,  $V^{FS}$  e  $V^{FI}$  são os volumes da fase superior e inferior e  $\rho$  é o número total de sítios por unidade de volume do sistema [63].

Baseado na Equação 3, pode-se concluir que na ausência de efeitos entálpicos, a partição preferencial do soluto ocorrerá caso exista uma diferença em termos de densidade numérica ( $n/v$ ) entre as duas fases. Assim, a entropia induzirá a migração do soluto para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuir as moléculas do soluto espacialmente, aumentando assim a contribuição da entropia configuracional para a minimização da energia livre de Gibbs de mistura. Como normalmente, as moléculas de água estão presentes em maior quantidade em ambas as fases dos SABs, elas são decisivas para a densidade numérica da FS e FI. Assim, a contribuição entrópica influenciará para que as moléculas de interesse migrem para a fase com maior conteúdo de moléculas de água por unidade de volume [62].

De acordo com de Lemos [64], em sistemas constituídos por um eletrólito e um polímero, forças de natureza entrópica farão com que o soluto particione para a fase rica em eletrólito, pois esta contém uma maior densidade numérica. Neste tipo de SAB, o soluto irá para fase polimérica somente se houver força de natureza entálpica.

Segundo o modelo de Johansson et al., a contribuição entálpica no processo de distribuição do soluto entre as fases pode ser representada pela Equação 4:

$$\ln K_A = -\frac{M_A}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) w_{iA} - \sum_{i=1(i \neq A)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (4)$$

onde  $M_A$  é a massa molar do soluto particionado,  $T$  é a temperatura,  $R$  é a constante dos gases,  $\Phi_i^{FS}$  e  $\Phi_i^{FI}$  são as frações volumétricas do componente  $i$  na fase superior e inferior respectivamente,  $w_{iA}$  é a energia de formação do par entre o soluto e o componente  $i$  e  $w_{ij}$  é a energia resultante da formação do par entre os componentes  $i$  e  $j$  [63].

De acordo com a Equação 4, todas as interações existentes dentro do SAB podem ser representadas por dois somatórios. O primeiro somatório, expressa a contribuição da interação entre o soluto com os componentes do sistema. A energia resultante desta interação é proporcional à diferença de composição entre as duas fases. Quanto mais fortemente o soluto interagir com um componente do sistema, menos positiva será a contribuição entálpica e consequentemente a energia livre de Gibbs do sistema será minimizada. Assim, por este somatório pode-se inferir que o soluto particionará preferencialmente para a fase rica no componente que o mesmo interaja mais entalpicamente [62].

O segundo somatório está relacionado com variação de energia associada à transferência do soluto da FI para FS do SAB. Neste termo, desconsideram-se as interações do soluto com os componentes do sistema. Ele pode ser interpretado como o conteúdo de energia de cada fase proveniente das interações existentes entre componentes das mesmas. A existência dessa variação de energia pode ser atribuída ao fato de que ao se transferir da FI, o soluto libera um volume que permite a interação entre os componentes presentes na fase, enquanto que seu deslocamento para a fase superior induzirá a formação de uma cavidade, impossibilitando a interação entre os componentes da FS. Assim, o soluto tenderá a migrar para a fase na qual haja menor gasto energético para formação da cavidade em que o mesmo será alojado [62].

Baseando-se no modelo apresentado é possível elucidar como algumas propriedades e características do SAB, como CLA, massa molar média do polímero, composição das fases e outros fatores afetam a comportamento de partição de solutos no sistema.

### 3. Objetivos

O trabalho proposto tem como objetivo estudar o comportamento de partição de antocianinas em sistemas aquosos bifásicos a fim de elucidar os fatores que influenciam a sua partição em diferentes SABs. Assim, pretende-se propor um novo método de purificação do corante que seja sustentável tanto do ponto vista econômico quanto ambiental.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Investigar a influência da massa molar média do polímero PEO (1500, 10000 e 35000  $\text{g mol}^{-1}$ ) e da hidrofobicidade do polímero (poli(óxido de propileno), PPO, com massa molar média de 400  $\text{g mol}^{-1}$ ) sobre o coeficiente de partição das antocianinas ( $K_A$ ).
- Avaliar o efeito da natureza do eletrólito formador do sistema no comportamento da partição do corante em SABs formados pelos eletrólitos  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
- Estudar a implicação do aumento do CLA no fenômeno de distribuição do corante entre as duas fases em equilíbrio.
- Definir o parâmetro termodinâmico  $\Delta_{\text{trans}}G$ , do processo de transferência do corante entre as fases dos SABs investigados.

#### 4. Referências Bibliográficas

- [1] Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A.; Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. *Food Research International* 44 (2011) 499–509.
- [2] Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández M. E.; Rodríguez, J. A.; Gálan-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113 (2009) 859-871.
- [3] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUCAO nº 34, de 09 de Março de 2001. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a Categoria de Alimentos 21: Preparações culinárias industriais. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/34\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/34_01rdc.htm)> Acesso em: 20. maio. 2011.
- [4] Cissé, M.; Bohuon, P.; Sambe, F.; Kane, C.; Sakho, M.; Dornier, M.; Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 16–21.
- [5] Kerio, L. C.; Wachira, F. N.; Wanyoko, J. K.; Rotich, M. K.; Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry* 131 (2012) 31–38.
- [6] Li, Y.; Han, L.; Ma, R.; Xu, X.; Zhao, C.; Wang, Z.; Chen, F.; Hu, X.; Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 274–280.
- [7] Volp, P. C. A.; Renhe, T. R. I.; Barra, K.; Stringueta. P. C.; Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 23 (2008) 141-150.
- [8] Barnes, J. S.; Nguyen, H. P.; Shen, S.; Schug, K. A.; General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4728-4735.
- [9] Rein, M.; Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. 2005. 87p. Dissertação - University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2005.
- [10] Malacrida, C. R.; Motta, S.; Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. *Boletim CEPPA* 24 (2006) 59-82.
- [11] Kong, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T.; Brouillard, R.; Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64 (2003) 923–933.

- [12] Wang, L.; Stoner, G.D.; Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269 (2008) 281–290.
- [13] Wu, X.; Liang, L.; Zou, Y.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Yang, L.; Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry* 129 (2011) 443–453.
- [14] Ju, Z. Y.; Howard, L. R.; Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5207-5213.
- [15] Montes, C.; Vicario, I. M.; Raymundo, M.; Fett, R.; Heredia, F.J.; Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* 38 (2005) 983–988.
- [16] Patil, G.; Madhusudhan, M. C.; Babu, B. R.; Raghavarao, K. S. M. S.; Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing* 48 (2009) 364–369.
- [17] Yang, Z.; Zhai, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (2010) 470–476.
- [18] Liazid, A.; Guerrero, R. F.; Cantos, E; Palma, M.; Barroso, C. G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124 (2011) 1238–1243.
- [19] Petersson, E. V.; Liu, J.; Sjöberg, P. J. R.; Danielsson, R.; Turner, C.; Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. *Analytica Chimica Acta* 663 (2010) 27–32.
- [20] Santos, D. T.; Veggi, P. C.; Meireles, M. A. A.; Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering* 108 (2012) 444–452.
- [21] Arapitsas, P.; Turner, C.; Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage. *Talanta* 74 (2008) 1218–1223.
- [22] Ghassempour, A., Heydari, R., Talebpour, Z., Fakhari, A. R., Rassouli, A., Davies, N., Aboul-Enein, H.Y., 2008. Study of new extraction methods for separation of anthocyanins from red grape skin: analysis by HPLC and LC–MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31 (2008) 2686–2703.
- [23] Mustafa, A.; Turner, C.; Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 703 (2011) 8– 18.
- [24] Kronholm, J.; Hartonen, K.; Riekkola, M.-L.; Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (5) (2007) 396–412.



- [25] Eskilsson, C. S.; Björklund, E.; Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 227.
- [26] Chen, F.; Sun, Y.; Zhao, G.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J.; Wang, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (2007) 767–778.
- [27] Adjé, F.; Lozano, Y. F.; Lozano, P.; Adima, A.; Chemat, F.; Gaydou, E. M.; Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 439–444.
- [28] Suthanthangjai, W.; Kajda, P.; Zabetakis. I.; The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). *Food Chemistry* 90 (2005) 193–197.
- [29] Corrales, M.; García, A. F.; Butz, P.; Tauscher, B.; Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 90 (2009) 415–421.
- [30] Ferrari, G.; Maresca, P.; Ciccarone, R.; The effects of high hydrostatic pressure on the polyphenols and anthocyanins in red fruit products. *Procedia Food Science* 1 (2011) 847 – 853.
- [31] Denev, P.; Ciz, M.; Ambrozova, G.; Lojek, A.; Yanakieva, I.; Kratchanova, M.; Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry* 123 (2010) 1055–1061.
- [32] He, J.; Giusti, M. M.; High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 7914– 7922.
- [33] Valls, J.; Millán, S.; Martí, M. P.; Borràs, E.; Arola, L.; Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7143–7172.
- [34] Schwarz, M.; Hillebrand, S.; Habben, S.; Degenhardt, A.; Winterhalter, P.; Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins *Biochemical Engineering Journal* 14 (2003) 179–189.
- [35] Eichhorn, S.; Winterhalter, P.; Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties. *Food Research International* 38 (2005) 943–948.
- [36] Cerezo, A. B.; Cuevas, E.; Winterhalter, P.; Garcia-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry* 123 (2010) 574–582
- [37] Rodriguez-Saona, L.E. and Wrolstad, R.E.; Extraction, isolation and purification of anthocyanins. Unit F2.1, Chapter 2: Anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical*

Chemistry. S. King, M. Gates and L. Scalettar. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, 2001.

[38] Fazeelat, T.; Afzal, W.; Asif, M.; Zamir, M.; Saleem, H.; HPLC Analysis of Strawberry Anthocyanins at Partially Ripe and Ripe Levels. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29 (2007) 243-246.

[39] Constant, P. B. L.; Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (Euterpe Oleracea, M.). 2003. 183p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

[40] Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; Scaccini, C.; Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 361-367.

[41] Teixeira, L. N.; Stringheta, P. C.; de Oliveira, F. A.; Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* 55 (2008) 297-304.

[42] Fossen, T.; Andersen, Ø. M.; Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry* 62 (2003) 1217-1220.

[43] da Silva, M. C. H.; da Silva L. H. M.; Paggioli, F. J.; Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quim. Nova*, 29 (2006) 1332-1339.

[44] Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Boaz, K. R.; Rogers, R. D.; Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins *Journal of Chromatography B* 711 (1998) 237.

[45] Tong, A.; Wu, Y.; Shida, T.; Li, L.; Akama, Y.; Tanaka, S.; Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 11.

[46] Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanaka, S.; The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system *Talanta* 48 (1999) 1133

[47] Pan, I.-H., Chiu H.-H.; Lu, C.-H., Lee, L.-T., Li, Y.-K., Aqueous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit. *Journal of Chromatography A*, 977 (2002) 239-246.

[48] Chethana, S.; Nayak, C. A.; RaghavaraO, K. S. M. S.; Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering* 81 (2007) 679-687.

[49] Patil, G.; RaghavaraO, K.S.M.S.; Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34 (2007) 156-164.

[50] Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A.; Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7623-7629.

- [51] Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C.; “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quimica Nova* 26 (2003) 123-129.
- [52] Patrício, P. R.; Mageste, A. B.; Lemos, L. R.; Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO+organic salts+H<sub>2</sub>O and PPO+organic salts+H<sub>2</sub>O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* 305 (2011) 1–8
- [53] Zaslavsky, B. Y.; Aqueous two-phase partitioning, in: *Physical Chemistry And Bio-analytical applications*, Marcel Dekker, New York, 1995.
- [54] Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). *Green Chemistry*. 9 (2007) 177-183.
- [55] de Lemos, L. R.; Patrício, P. D.; Rodrigues, G. D., de Carvalho, R. M. M.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): experimental and correlation. *Fluid Phase Equilibria* 305 (2011) 19–24.
- [56] Svensson, M.; Joabsson, F.; Linse, P.; Tjerneld, F.; Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. *Journal of Chromatography A*, 761 (1997) 91.
- [57] Beijerinck, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der iosischen starke. *Zbl. Bakt. II Nature* 1896, 627, 697-699.
- [58] Beijerinck, M. W. Ueber Emulsionsbildung bei der vermischung wasseriger losungen gewisser gelatinierender kolloide. *Kolloid Z. Z. Polymer* 7 (1910) 16-20.
- [59] Albertsson, P. A. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. *Nature* 177 (1956) 771-774.
- [60] Zvarova, T. I.; Shkinev, V. M.; Vorob’eva, G. A.; Spinakov, B. Ya.; Zolotov, Yu. A.; Liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: Application of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Mikrochimica Acta* 3 (1984) 449.
- [61] Berthod, A.; Carda-Broch, S.; Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. *Journal of Chromatography A*, 1037 (2004) 3–14.
- [62] da Silva, L. H. M.; Loh, W.; Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* 29 (2006) 1345.
- [63] Johansson, H. O.; Karlström, G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. H.; Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 711 (1998) 3–17.

[64] de Lemos, L. R.; Sistemas aquosos bifásicos: uma nova abordagem para a determinação de *p*-aminofenol. 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

## Capítulo 2

### Sistema aquoso bifásico: uma técnica segura para a purificação de antocianinas

#### Resumo

O comportamento de partição do corante natural antocianina foi verificado em diferentes sistemas aquosos bifásicos (SABs). Os sistemas estudados eram formados pela mistura de uma solução polimérica (PEO1500, PEO10000, PEO35000 ou PPO400) e uma solução salina ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) sob condições termodinâmicas específicas de temperatura, pressão e composição. O coeficiente de partição das antocianinas ( $K_A$ ) foi investigado em função do comprimento da linha de amarração (CLA), natureza do eletrólito, massa molar e hidrofobicidade do polímero. Verificou-se que o fenômeno partição é dependente dos valores de CLA, natureza do eletrólito e hidrofobicidade do sistema. Os sistemas constituídos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  não foram afetados pela variação da massa molar do polímero. Os valores de  $K_A$  variaram de 1,1 a 89,2, indicando que as moléculas do corante concentraram-se preferencialmente na fase rica em polímero. Este processo de transferência do corante para a fase superior foi espontâneo para todos os sistemas analisados ( $\Delta_{trans}G < 0$ ) devido a um balanço de fatores entrópicos e entálpicos.

Palavras-chave: sistema aquoso bifásico, antocianinas, purificação.

## Abstract

The partition behavior of the natural dye anthocyanin was observed for several aqueous two-phase systems (ATPS). The studied systems were formed by mixing a polymer solution (PEO1500, PEO10000, PEO35000 or PPO400) and an electrolyte solution ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  or  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) at specific thermodynamic conditions of temperature, pressure and composition. The partition coefficient of the anthocyanins was investigated depending on the tie-line length (TLL), nature of the electrolyte, molar mass and hydrophobicity of the polymer. It was verified that the phenomenon of partitioning is dependent of TLL values, electrolyte nature and hydrophobicity of the polymer. The system composed of  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  were not affected by the variation of polymer molar mass. The  $K_A$  values ranged from 1.1 to 89.2, indicating that the dye molecules are preferentially concentrated in the polymer-rich phase. The dye-transfer process, was spontaneous for all studied systems ( $\Delta_{trans}G < 0$ ) due to a balance of enthalpic and entropic contributions.

Keywords: aqueous two-phase system, anthocyanins, purification.

## 1. Introdução

A toxicidade de certos corantes sintéticos instigou a redução da quantidade e do número de corantes permitidos como aditivos no preparo de alimentos. Assim, os corantes naturais atóxicos para humanos tornaram-se uma área de interesse no meio científico [1,2].

No entanto, para ter uma boa aceitação no mercado, os corantes naturais, igualmente aos sintéticos, devem promover uma boa aparência aos produtos. Neste contexto, as antocianinas aparecem como uma alternativa promissora uma vez que proporcionam cores atraentes como laranja, violeta, roxo, vermelho e azul à frutas, flores e legumes [3,4] e também podem ser aplicadas a outros alimentos uma vez que não são tóxicas.

A indústria alimentícia foi pioneira no emprego de antocianinas como corante natural. Atualmente este corante tem despertado interesse na indústria de cosméticos e na área da saúde. Acredita-se que o consumo regular de antocianinas esteja associado a possíveis efeitos contra inflamações crônicas, problemas cardiovasculares, câncer, regulação do metabolismo entre outros [2,5].

Este corante usualmente é obtido por extração por solvente, com metanol, etanol ou acetona acidificados [1,6,7]. Técnicas mais sofisticadas também têm sido aplicadas para esta finalidade, como extração por fluido pressurizado, extração assistida por microondas, extração assistida por ultra-som, extração com alta pressão hidrostática entre outras [8-15]. Todavia, essas técnicas envolvem a co-extração de substâncias indesejadas que podem comprometer a estabilidade, odor e sabor do corante [16]. Portanto, o extrato de antocianina, deve ser submetido a uma etapa de purificação antes da sua aplicação. Entre as técnicas empregadas para este propósito encontra-se a extração líquido-líquido tradicional (ELT) [1], a qual utiliza n-hexano, mistura de acetato de etila + éter de petróleo, mistura de éter etílico + éter de petróleo e acetato de etila para remover lipídeos, compostos fenólicos e clorofilas extraídos

com as antocianinas [17-20]. A principal desvantagem desta técnica é a utilização de solventes orgânicos que podem ser tóxicos, cancerígenos e / ou inflamáveis [21], fazendo com que os extratos antociânicos nem sempre sejam seguros para consumo humano [22]. Essa característica também faz com que esta técnica entre em conflito com a nova tendência mundial de reduzir o impacto da atividade química ao meio ambiente [23].

Uma alternativa para substituir a ELT que tem sido utilizada com sucesso na extração e purificação de diferentes corantes são os sistemas aquosos bifásicos (SABs) [24-31], que se baseiam nos princípios da química verde [23]. Os SABs são constituídos majoritariamente por água, e os demais constituintes são atóxicos e não inflamáveis, o que torna esta técnica ambientalmente segura. Estes sistemas são formados pela combinação de uma solução de eletrólito e uma solução polimérica [32] ou por meio da mistura de dois polímeros hidrossolúveis e quimicamente distintos [33] ou por duas soluções salinas [34] em condições termodinâmicas específicas de temperatura, pressão e concentração.

O trabalho proposto teve como objetivo estudar o comportamento de partição de antocianinas em sistemas aquosos bifásicos a fim de elucidar os fatores que influenciam a sua partição em diferentes sistemas. Deste modo, foi investigado o efeito do comprimento da linha de amarração (CLA), a natureza do eletrólito, massa molar e hidrofobicidade do polímero sobre os valores de coeficiente de partição de antocianinas ( $K_A$ ). Também foi determinado o parâmetro termodinâmico variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas ( $\Delta_{trans}G$ ) para se propor um novo método de purificação deste corante.

## **2. Materiais e Método**

### *2.1. Reagentes*



Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos sem purificação adicional. Os polímeros poli(óxido de etileno) (PEO) com massa molar média de 1500, 10000 e 35000 g mol<sup>-1</sup> foram obtidos da Synth (São Paulo, Brasil), Sigma (St. Louis, MO, EUA) e Fluka (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. O polímero poli(óxido de propileno) (PPO) massa molar média de 400 g mol<sup>-1</sup> foi adquirido da Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram fornecidos pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A antocianina foi doada pela Chr. Hansen Ind. Com. Ltd (São Paulo, Brasil). Água destilada foi utilizada durante todos os experimentos.

## 2.2. Equipamentos

As medidas de pH foram realizadas com um medidor de pH digital (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, modelo pH 330i). Foram empregados uma centrífuga (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 11R) e um banho termostatizado (Microquímica Equipamentos Ltda., MQBTC 99-20) no preparo dos SABs. A absorvância foi medida com um espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultra-violeta/visível (UV/Vis) (Shimadzu UV-2550).

## 2.3. Preparo do sistema aquoso bifásico e experimentos de partição

Diversos SABs foram utilizados para realizar os experimentos de partição [35-40]. Para cada sistema, cinco composições descritas na literatura, foram estudadas. Foram preparadas soluções estoque de polímero e eletrólito empregando água em pH 1,0 como solvente. Os SABs foram obtidos pela mistura dessas soluções. Os sistemas resultantes eram agitados manualmente, centrifugados e levados a um banho termostatizado a 25,0 °C onde

permaneciam por no mínimo 24 h para atingir o equilíbrio termodinâmico. Em seguida, a fase superior e inferior eram recolhidas e 3,5 g de cada fase eram misturados com 100 µL de uma solução aquosa saturada de antocianina (*Vitis vinifera* L.). Estes sistemas eram agitados manualmente por 3 minutos e deixados em um banho a 25,0 °C por no mínimo 24 h para alcançar o equilíbrio termodinâmico. Como as antocianinas são fotossensíveis os experimentos foram realizados na ausência de luz para evitar a sua decomposição.

#### 2.4. Coeficiente de partição

Após o alcance do equilíbrio termodinâmico os sistemas tinham alíquotas da fase superior e inferior coletadas com uma seringa e diluídas de uma quantidade apropriada para análise por espectrofotometria no UV/Vís em comprimento de onda de 279 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata. Os valores de  $K_A$  foram obtidos pela relação:

$$K_A = \frac{A_{FS}}{A_{FI}} \quad (1)$$

onde  $A_{FS}$  e  $A_{FI}$  são a absorvância (em 279 nm) das antocianinas na fase superior e inferior, respectivamente. Baseando-se nestes resultados foram estudados o efeito da natureza do eletrólito, massa molar e hidrofobicidade do polímero e CLA.

#### 2.5. Variação da energia livre de Gibbs de transferência de antocianinas ( $\Delta_{trans}G$ )

O parâmetro  $\Delta_{trans}G$  pode ser calculado a partir dos valores de  $K_A$  obtidos nos SABs analisados por meio da relação termodinâmica:

$$\Delta_{trans}G = -RT \ln K_A \quad (2)$$

### 3. Resultados e Discussão

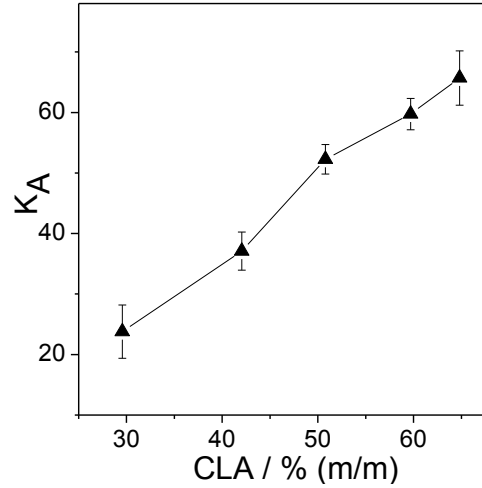
#### 3.1. Influência do CLA e eletrólito sobre o comportamento partição

O CLA é um parâmetro termodinâmico de grande importância nos estudos de partição em SABs, pois ele determina a diferença das propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases em equilíbrio. Este parâmetro é calculado como uma função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase, conforme indicado na Eq. (3):

$$CLA = \left[ (C_P^{FS} - C_P^{FI})^2 + (C_E^{FS} - C_E^{FI})^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

em que,  $C_P^{FS}$  e  $C_P^{FI}$  são as concentrações de polímero (% (m/m)) na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto  $C_E^{FS}$  e  $C_E^{FI}$  são as concentrações do eletrólito (% (m/m)) na fase superior e inferior respectivamente. Assim, o aumento dos valores do CLA torna maior a diferença na composição entre as fases, podendo melhorar a eficiência de extração e / ou partição do analito no SAB.

A Fig. 1 mostra o efeito do CLA no comportamento de partição do corante antocianina no sistema constituído por PEO1500 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O. O aumento do CLA ocasionou um aumento no coeficiente de partição.



**Fig. 1.** Efeito do CLA nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em sistemas formados por PEO1500 + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O.

O aumento dos valores de  $K_A$  com aumento do CLA pode ser analisado baseando-se em um modelo derivado da teoria Flory–Huggins que foi desenvolvido por Johansson et al. [41]. De acordo com esta teoria a distribuição de um soluto entre as fases do SAB é governada por duas forças motrizes: entropia e entalpia [41].

Neste modelo, na ausência de forças entálpicas, a contribuição entrópica é definida pela Eq. (4):

$$\ln K_A = \frac{M_A}{\rho} \left( \frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (4)$$

onde,  $M_A$  é a massa molar do soluto particionado,  $n^{FS}$  e  $n^{FI}$  são o número total de moléculas na fase superior e inferior respectivamente,  $V^{FS}$  e  $V^{FI}$  são os volumes da fase superior e inferior, a razão  $n/V$  é a densidade numérica e  $\rho$  é o número total de sítios por unidade de volume do sistema [41].

De acordo com a Eq. (4) a antocianina será transferida para a fase com maior número de moléculas, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuição espacial das moléculas do corante, acarretando a diminuição da energia livre de Gibbs do sistema [30,42]. Como no SAB ambas as fases são constituídas majoritariamente por água, a concentração deste componente será determinante para a densidade numérica das fases. Assim, o corante deve se transferir preferencialmente para fase rica em eletrólito (fase inferior), uma vez que esta possui maior quantidade de água (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diferença na concentração de H<sub>2</sub>O (% (m/m)) entre a FS e FI de SAB constituídos pelo polímero PEO1500, analisados a 25 °C.

$\Delta[\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}_2\text{O}]_{\text{FI}} - [\text{H}_2\text{O}]_{\text{FS}} \text{ \% (m/m)}$				
CLA	PEO1500			
	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1	17.35	17.10	15.97	12.95
2	19.88	16.78	19.88	17.06
3	22.42	18.58	21.87	17.34
4	24.65	22.13	22.13	20.05
5	27.69	23.32	25.09	20.98

Entretanto, independente do sistema ou CLA analisado, observou-se que o corante particiona-se preferencialmente para a fase rica em polímero (fase superior) (Fig. 1), uma vez que os valores de  $K_A$  foram maior que 1 ( $K_A > 1$ ) para todos SABs estudados. Esse comportamento sugere que a partição de antocianinas é um processo entálpicamente dirigido.

A contribuição entálpica no modelo de Johansson [41] para o coeficiente de partição é representada pela Eq. (5):

$$\ln K_A = -\frac{M_A}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) w_{iA} - \sum_{i=1(i \neq A)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (5)$$

onde  $M_A$  é a massa molar do soluto particionado,  $T$  é a temperatura,  $R$  é a constante dos gases,  $\Phi_i^{FS}$  e  $\Phi_i^{FI}$  são as frações volumétricas do componente  $i$  na fase superior e inferior respectivamente,  $w_{iA}$  é a energia de formação do par entre o soluto e o componente  $i$  e  $w_{ij}$  é a energia resultante da formação do par entre os componentes  $i$  e  $j$  [41].

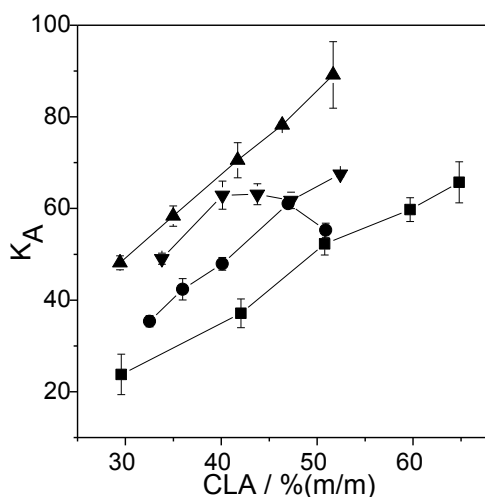
De acordo com a Eq. (5), todas as interações rompidas e formadas no processo de partição das antocianinas no SAB podem ser representadas por dois somatórios. O primeiro expressa a contribuição da interação do corante com os componentes do sistema. A energia resultante desta interação é proporcional a diferença de composição entre as duas fases em equilíbrio. Quanto mais intensa for interação do soluto com um componente, menos positiva ou mais negativa será a contribuição entálpica para a minimização da energia livre de Gibbs do sistema. Assim, por este somatório o soluto particionará preferencialmente para a fase rica no componente que o mesmo interaja mais entalpicamente [43].

A Fig. 1 mostra que o corante transfere-se preferencialmente para a fase superior dos SABs analisados. Portanto, pode-se inferir que a entalpia de interação entre corante e polímero é a força motriz do comportamento de partição das antocianinas. Além disso, a elevação dos valores de  $K_A$  com o aumento do CLA (Fig. 1) pode ser atribuído a maior concentração de polímero na FS com o aumento do CLA [35-40], pois desta forma, o número de interações estabelecidas entre antocianinas e polímero se torna maior e o primeiro termo da Eq. (5) mais negativo ou menos positivo.

O segundo termo do somatório da Eq.(5) pode ser interpretado como o conteúdo entálpico de cada fase derivado das interações entre os componentes (polímero, sal e água),

independente da interação do corante com estes componentes. A existência desta variação de energia pode ser atribuída ao volume liberado na fase inferior quando o corante é transferido para a fase superior do sistema, permitindo a interação entre componentes que antes deste processo não interagiam. Esta transferência também induzirá a formação de uma cavidade na fase superior para receber as moléculas do corante, impedindo a interação entre componentes desta fase [43]. Assim, a antocianina deve migrar para a fase em que haverá um menor gasto energético para a formação da cavidade onde a mesma será alojada. Possivelmente isso ocorre na fase superior dos sistemas estudados.

A influência da natureza do eletrólito nos valores de  $K_A$  para sistemas formados por PEO1500 + eletrólito ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  /  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  /  $\text{MgSO}_4$ ) +  $\text{H}_2\text{O}$  foi analisada (Fig. 2). Para CLAs com valores semelhantes, os SABs constituídos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  apresentaram maiores valores de  $K_A$  quando comparado com sistemas formados por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , alcançando um  $K_A$  máximo de 89,2 para o CLA de 51,67 % (m/m).



**Fig. 2.** Efeito do eletrólito nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA para sistemas formados por PEO1500. SAB: ( $\blacktriangle$ ) $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , ( $\bullet$ )  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ( $\blacktriangledown$ ) $\text{MgSO}_4$ , ( $\blacksquare$ ) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

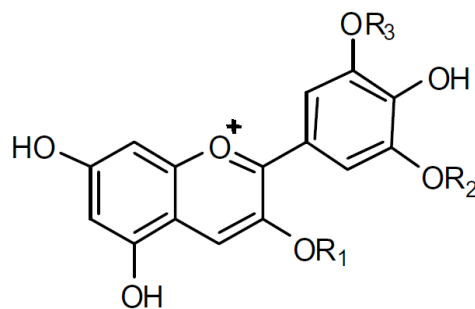
Este comportamento de partição pode ser elucidado por um modelo sugerido por da Silva e Loh [44] para explicar a termodinâmica de formação do SAB. De acordo com esta teoria, quando ocorre a mistura de uma solução polimérica e uma solução salina, os cátions do eletrólito interagem com as macromoléculas do polímero liberando moléculas de água que antes os solvatavam, em um processo governado pelo aumento de entropia do sistema. Este processo continua até que as macromoléculas do polímero se tornam saturadas com os cátions do eletrólito e a adição de novas alíquotas desta solução não resulte em ganho de entropia. Após este ponto de saturação, a adição de sal acarreta maior concentração de íons no seio da solução que ao redor da cadeia polimérica [44]. Nesta nova condição, os íons interagem com as moléculas de água organizando-as em camadas de solvatação, o que reduz a entropia translacional dessas moléculas e a separação de fase se torna mais favorável. Após a separação de fases, a fase rica em polímero consiste de macromoléculas solvatadas por cátions do eletrólito resultando em uma cadeia polimérica carregada positivamente conhecida como pseudopolication. Esta estrutura interage por atração eletrostática com espécies carregadas negativamente.

da Silva e Loh [44] também realizaram medidas calorimétricas, que comprovaram que cátions  $\text{Li}^+$  interagem mais fortemente com os segmentos de óxido de etileno (EO) das macromoléculas de PEO que outros cátions, sugerindo que mais  $\text{Li}^+$  são necessários para saturar a cadeia de polimérica. Deste modo, nos SABs compostos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , o pseudopolication possui maior densidade de carga positiva, permitindo uma forte interação eletrostática com a densidade de carga negativa dos átomos de oxigênio das antocianinas (Fig. 3), sendo estas transferidas para a fase superior do SAB rica em polímero.

O modelo de da Silva e Loh [44] também contribui para compreensão da diminuição dos valores de  $K_A$  com o aumento do CLA, para alguns sistemas analisados (Fig. 2). Este comportamento pode ser atribuído a diminuição da concentração do eletrólito na FS com o



aumento do CLA nos sistemas analisados [35-40], conduzindo a formação de um pseudopolicátion com menor densidade de carga positiva. Consequentemente, a intensidade da interação do pseudopolicátion com as moléculas do corante foi reduzida [30].



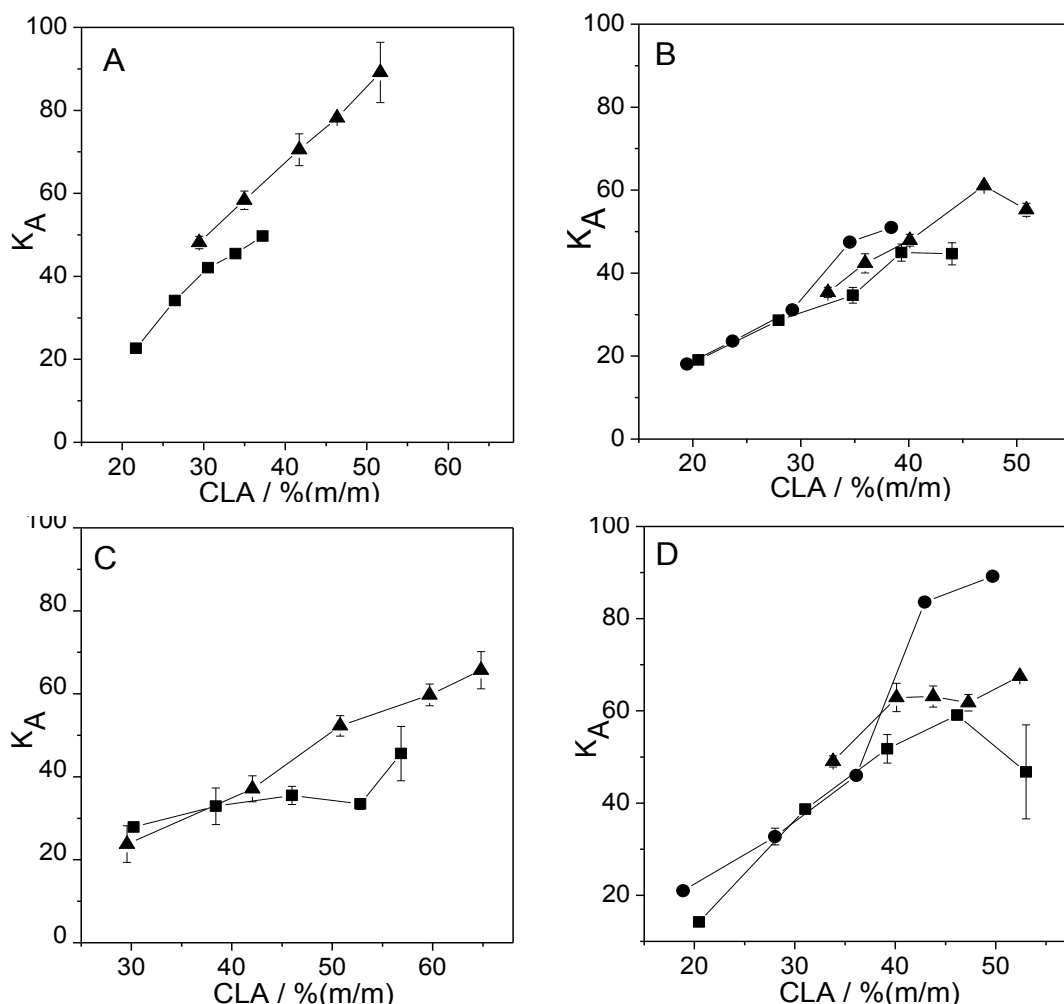
**Fig. 3.** Estrutura molecular da antocianina predominante em pH 1.0, cátion flavílium [1].

A partição preferencial do corante para a fase superior dos sistemas analisados (Fig. 2) pode ser uma possível forma de implementar o SAB na remoção de açúcares extraídos juntamente com as antocianinas. A FI, constituída majoritariamente por água e sal é mais hidrofílica e deve acomodar preferencialmente as moléculas de açúcares. Este comportamento de partição de açúcares foi relatado previamente em um estudo envolvendo a purificação do corante betalaína, onde os açúcares apresentaram coeficiente de partição menor que 1 para todas as condições e sistemas analisados [28].

### 3.2. *Influência da massa molar do polímero*

A Fig. 4 mostra o efeito da massa molar do polímero sobre os valores de  $K_A$ . Os resultados evidenciam que o aumento da massa molar do polímero não ocasionou influência significativa nos valores de  $K_A$ , para CLAs semelhantes, nos sistemas constituídos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Entre os SABs compostos por  $\text{MgSO}_4$ , apenas o formado por PEO35000

apresentou efeito significativo do aumento da massa molar para CLAs maiores que 36,11 % (m/m), atingindo um  $K_A$  máximo de 89,2 no CLA de 49,69 % (m/m). Já nos SABs formados por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , para CLAs maiores que 45,99 % (m/m), o sistema formado por PEO10000 apresentou menores valores de  $K_A$  que o SAB constituído por PEO1500.



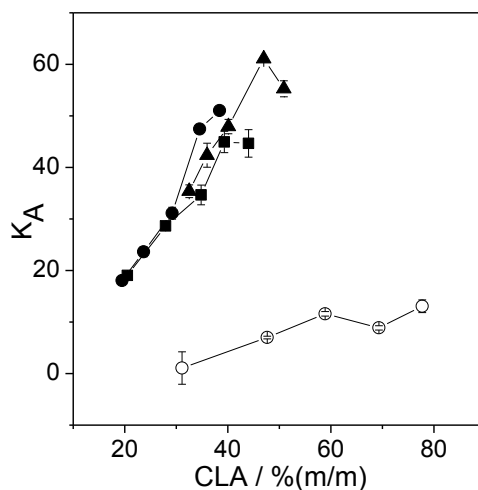
**Fig. 4.** Efeito da massa molar do PEO nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA. SAB: (▲) PEO1500, (■) PEO10000 e (●) PEO35000; (A)  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , (B)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , (C)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and (D)  $\text{MgSO}_4$ .

Em geral, o aumento da massa molar do polímero reduz a concentração do soluto na fase rica neste componente [30,46]. Com base na Eq. (4), isto é atribuído à redução da densidade numérica da fase, uma vez que quanto maior a massa molar do polímero, menor

será o número de moléculas por unidade de volume. Consequentemente, a entropia das moléculas de antocianina na fase superior será reduzida [30]. Esta contribuição entrópica justifica a diminuição nos valores de  $K_A$  para o polímero de maior massa molar na Fig. 4C, para CLAs maiores que 45,99 % (m/m). Já o sistema formado por PEO35000 + MgSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O apresentou comportamento contraditório aos embasamentos do modelo de Johansson et al. [41] com maior  $K_A$  para o sistema formado pelo polímero com maior massa molar. A semelhança dos valores de  $K_A$  apresentada nos sistemas não afetados pela variação da massa molar do polímero nos leva a inferir que o processo de partição do corante nesses sistemas é entalpicamente dirigido. Os sistemas analisados são formados pela mesma unidade repetitiva de óxido de etileno, assim, as interações entre as antocianinas e macromoléculas são idênticas, ou seja, a variável  $w_{iA}$  na Eq (5) terá o mesmo valor para todos os sistemas analisados, justificando os valores semelhantes de  $K_A$ .

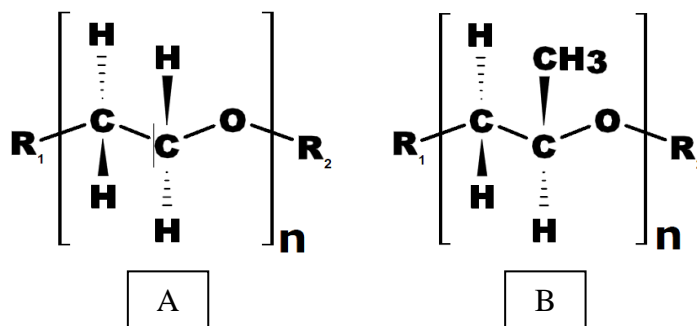
### 3.3. *Influência da hidrofobicidade do polímero*

A Fig. 5 mostra a influência da hidrofobicidade do polímero sobre o comportamento de partição das antocianinas para quatro SABS. Resultados semelhantes foram obtidos para SABS formados por (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>.



**Fig. 5.** Efeito da hidrofobicidade do polímero nos valores de coeficiente de partição de antocianinas em função do CLA para sistemas formados por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. SAB: (▲) PEO1500, (■) PEO10000, (●) PEO35000 e (○) PPO400.

Os sistemas formados por polímeros constituídos por unidades repetitivas hidrofílicas de óxido de etileno (Fig. 6A), PEO, foram mais eficientes na transferência do corante para a fase superior, com  $K_A$  máximo de 61,1 para o CLA de 46,97 % (m/m) do sistema PEO1500 + Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O (Fig. 5). Os sistemas constituídos por polímero com unidades repetitivas hidrofóbicas de óxido de propileno (PO) (Fig. 6B), PPO, apresentaram menores valores de  $K_A$ , sendo o máximo 13,1 para o CLA de 77,72 % (m/m) (Fig. 5). Este comportamento de partição reflete o caráter hidrofílico do corante estudado (Fig. 3).



**Fig. 6.** Estrutura molecular dos monômeros: (A) óxido de etileno, formador do PEO (B) óxido de propileno, formador do PPO.

O baixo coeficiente de partição do corante para a fase rica em PPO indica o potencial destes sistemas para a remoção de lipídeos e compostos hidrofóbicos, tais como clorofilas, extraídos juntamente com as antocianinas. Possivelmente, esses compostos terão maior afinidade pela fase superior dos sistemas hidrofóbicos, enquanto as antocianinas foram igualmente distribuídas ( $K_A = 1,1$ ) entre as duas fases do SAB composto por PPO400 +  $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$  quando o experimento foi realizado no CLA de 31,10 %(m/m). Realizando extrações líquido-líquido consecutivas seria possível recuperar quantitativamente o corante natural antocianina.

#### 3.4. *Variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas* ( $\Delta_{trans}G$ )

Um parâmetro termodinâmico importante que determina a espontaneidade dos fenômenos que ocorrem na natureza é a energia livre de Gibbs. Essa variável expressa a variação da energia livre de Gibbs do sistema, ocasionada pela transferência de 1 mol de antocianinas da fase inferior para a fase superior,  $\Delta_{trans}G$ , através da Eq. (2).

A Tabela 2 apresenta os valores do  $\Delta_{trans}G$  do corante para os sistemas aquosos bifásicos estudados. A espontaneidade da transferência das moléculas de antocianinas foi investigada em função da massa molar e hidrofobicidade do polímero, natureza do eletrólito e CLA. Todos os sistemas analisados apresentaram valores negativos de  $\Delta_{trans}G$ , variando de -0,2 a -11,1  $\text{kJ mol}^{-1}$ , indicando que a transferência das antocianinas da fase inferior para a superior é um processo espontâneo.

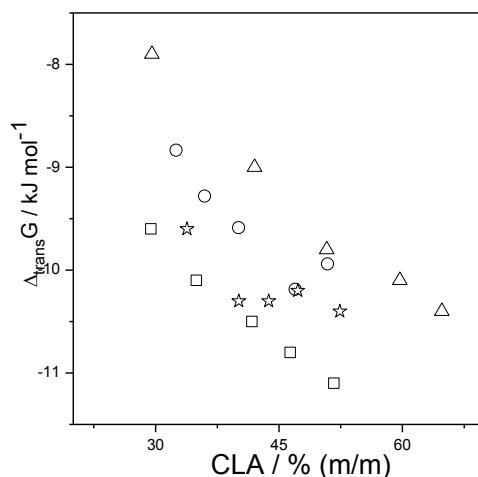
**Tabela 2.** Valores de  $\Delta_{trans}G$  obtidos para a transferência das antocianinas em diferentes SABs.

PEO1500+Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PEO1500+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>	CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>
29,43	-9,6	32,51	-8,8
34,97	-10,1	35,96	-9,3
41,71	-10,5	40,1	-9,6
46,36	-10,8	46,97	-10,2
51,67	-11,1	50,89	-9,9
PEO 1500+MgSO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PEO1500+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>	CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>
33,81	-9,6	29,57	-7,9
40,12	-10,3	42,04	-9,0
43,76	-10,3	50,79	-9,8
47,28	-10,2	59,7	-10,1
52,4	-10,4	64,8	-10,4
PEO10000+Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PEO10000+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>	CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>
21,69	-7,7	20,52	-7,3
26,46	-8,7	27,94	-8,3
30,52	-9,3	34,82	-8,8
33,89	-9,5	39,32	-9,4
37,23	-9,7	44,01	-9,4
PEO10000+MgSO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PEO10000+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>	CLA / % (m/m)	$\Delta_{trans}G /$ kJ mol <sup>-1</sup>
20,46	-6,6	30,22	-8,2
31,03	-9,1	38,41	-8,7
39,2	-9,8	45,99	-8,8

46,16	-10,1	52,79	-8,7
53,01	-9,5	56,84	-9,5
PEO35000+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PEO35000+MgSO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA /	$\Delta_{trans}G/$	CLA /	$\Delta_{trans}G/$
% (m/m)	kJ mol <sup>-1</sup>	% (m/m)	kJ mol <sup>-1</sup>
19,47	-7,2	18,87	-7,5
23,68	-7,8	28,01	-8,6
29,22	-8,5	36,11	-9,5
34,55	-9,6	42,92	-11,0
38,39	-9,7	49,69	-11,1
PPO400+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O		PPO400+MgSO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	
CLA /	$\Delta_{trans}G/$	CLA /	$\Delta_{trans}G/$
% (m/m)	kJ mol <sup>-1</sup>	% (m/m)	kJ mol <sup>-1</sup>
48,35	-6,7	31,77	-7,6
62,78	-4,7	47,85	-8,4
72,89	-4,7	58,22	-8,2
79,73	-5,5	70,95	-8,5
48,35	-6,7	81,03	-8,1
PPO400+Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O			
CLA /	$\Delta_{trans}G/$		
% (m/m)	kJ mol <sup>-1</sup>		
31,1	-0,2		
47,64	-4,8		
58,89	-6,1		
69,34	-5,4		
77,72	-6,4		

A Fig. 7 apresenta uma análise gráfica para a influência do CLA sobre os valores de  $\Delta_{trans}G$  para sistemas formados por PEO1500 + eletrólito (Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / MgSO<sub>4</sub>) + H<sub>2</sub>O. Os resultados indicaram que o aumento do CLA foi responsável pela diminuição dos valores de  $\Delta_{trans}G$ , ou seja, a partição do soluto se torna mais espontânea à

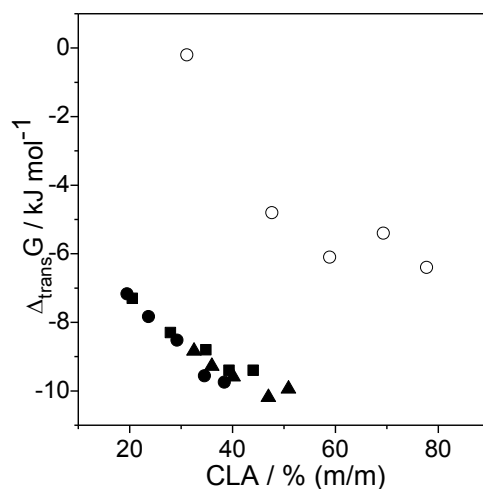
medida que a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases se torna maior. O efeito do eletrólito também pode ser analisado através da Fig. 7, onde o sal  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  foi responsável pelo processo mais espontâneo de partição, independente do CLA analisado.



**Fig. 7.** Efeito da natureza do eletrólito na variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA para sistemas formados por PEO1500. SAB: ( $\square$ )  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , ( $\circ$ )  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ( $\Delta$ )  $\text{MgSO}_4$ , ( $\star$ )  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

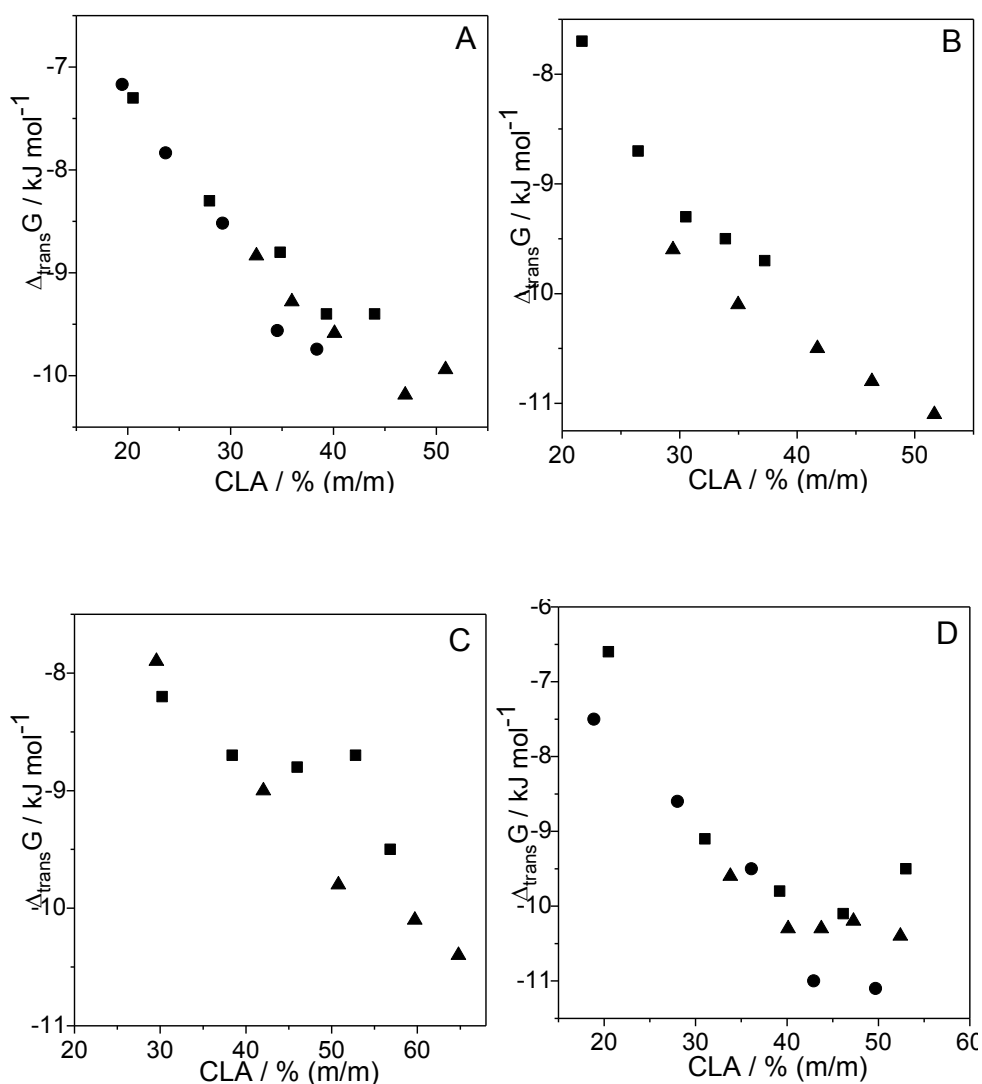
Os resultados da Fig. 8 evidenciam que o segmento óxido de propileno presente no polímero PPO tende a reduzir a eficiência com que o corante particiona para a fase superior, apresentando  $\Delta_{trans}G$  máximo de  $-0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$  para o CLA de 31,10 % (m/m) do sistema  $\text{PPO400} + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ . A semelhança nos valores de  $\Delta_{trans}G$  para CLAs comparáveis, dos sistemas constituídos por PEO indica que a utilização de qualquer um destes sistemas seria viável para a purificação do corante.





**Fig. 8.** Efeito da hidrofobicidade do polímero na variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA para sistemas formados por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. SAB: (▲) PEO1500, (■) PEO 10000, (●) PEO 35000 e (○) PPO 400.

O efeito da massa molar do polímero sobre  $\Delta_{trans}G$  foi estudado para sistemas formados por PEO1500, PEO10000, PEO3500 e os eletrólitos Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub> (Fig. 9). Para CLAs próximos, observou-se que o tamanho da cadeia polimérica não influenciou significativamente na partição do corante, indicando a pequena contribuição entrópica para os valores de  $\Delta_{trans}G$  e semelhança nas interações estabelecidas entre as moléculas das antocianinas e as macromoléculas de PEO.



**Fig. 9.** Efeito da massa molar do PEO nos valores da variação da energia livre de Gibbs de transferência das antocianinas em função do CLA. SAB: (▲) PEO1500, (■) PEO10000 and (●) PEO 35000; (A) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (B) Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (C) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e (D) MgSO<sub>4</sub>.

#### 4. Conclusão

Verificou-se a possibilidade de utilização dos sistemas aquosos bifásicos (SAB) como metodologia de purificação do corante natural antocianina. Os SABs se baseiam nos princípios da química verde, são eficientes e economicamente viáveis. Os SABs foram formados pela mistura de uma solução polimérica (PEO1500, PEO10000, PEO35000 ou PPO400) e uma solução de eletrólito ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). O comportamento de partição do corante foi verificado em função do comprimento da linha de amarração (CLA), natureza do eletrólito, hidrofobicidade e massa molar do polímero. Em geral, o aumento do CLA e o emprego do  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  como eletrólito formador do sistema conduziu a maiores valores de  $K_A$ . O corante transferiu-se preferencialmente para a fase superior dos sistemas formados por polímeros constituídos por unidades repetitivas hidrofílicas de óxido de etileno quando comparado com sistemas formados por polímeros com unidades repetitivas hidrofóbicas de óxido de propileno. Os sistemas constituídos por  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  não foram afetados pela variação da massa molar do polímero. Os valores de  $K_A$  variaram de 1,1 a 89,2, indicando que as moléculas do corante concentraram-se preferencialmente na fase rica em polímero. Este processo de transferência do corante para a fase superior foi espontâneo para todos os sistemas analisados ( $\Delta_{trans}G < 0$ ) devido a um balanço de fatores entrópicos e entálpicos.

## 5. Referências Bibliográficas

- [1] Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández M. E.; Rodríguez, J. A.; Gálan-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* 113 (2009) 859-871.
- [2] Cavalcanti, R. N.; Santos, D. T.; Meireles, M. A. A.; Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. *Food Research International* 44 (2011) 499–509.
- [3] Kerio, L. C.; Wachira, F. N.; Wanyoko, J. K.; Rotich, M. K.; Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry* 131 (2012) 31–38.
- [4] Cissé, M.; Bohuon, P.; Sambe, F.; Kane, C.; Sakho, M.; Dornier, M.; Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* 109 (2012) 16–21.
- [5] Valls, J.; Millán, S.; Martí, M. P.; Borràs, E.; Arola, L.; Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7143–7172.
- [6] Ju, Z. Y.; Howard, L. R.; Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 5207-5213.
- [7] Montes, C.; Vicario, I. M.; Raymundo, M.; Fett, R.; Heredia, F.J.; Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). *Food Research International* 38 (2005) 983–988.
- [8] Petersson, E. V.; Liu, J.; Sjöberg, P. J. R.; Danielsson, R.; Turner, C.; Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. *Analytica Chimica Acta* 663 (2010) 27–32.
- [9] Santos, D. T.; Veggi, P. C.; Meireles, M. A. A.; Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering* 108 (2012) 444–452.
- [10] Liazid, A.; Guerrero, R. F.; Cantos, E; Palma, M.; Barroso, C. G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, 124 (2011) 1238–1243.
- [11] Yang, Z.; Zhai, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (2010) 470–476.
- [12] Chen, F.; Sun, Y.; Zhao, G.; Liao, X.; Hu, X.; Wu, J.; Wang, Z. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of

anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14 (2007) 767–778.

[13] Adjé, F.; Lozano, Y. F.; Lozano, P.; Adima, A.; Chemat, F.; Gaydou, E. M.; Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products* 32 (2010) 439–444

[14] Corrales, M.; García, A. F.; Butz, P.; Tauscher, B.; Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering* 90 (2009) 415–421.

[15] Ferrari, G.; Maresca, P.; Ciccarone, R.; The effects of high hydrostatic pressure on the polyphenols and anthocyanins in red fruit products. *Procedia Food Science* 1 (2011) 847 – 853.

[16] He, J.; Giusti, M. M.; High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables – A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7914– 7922.

[17] Fazeelat, T.; Afzal, W.; Asif, M.; Zamir, M.; Saleem, H.; HPLC Analysis of Strawberry Anthocyanins at Partially Ripe and Ripe Levels. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 29 (2007) 243-246.

[18] Constant, P. B. L.; Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe Oleracea*, M.). 2003. 183p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

[19] Teixeira, L. N.; Stringheta, P. C.; de Oliveira, F. A.; Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* 55 (2008) 297-304.

[20] Ghiselli, A.; Nardini, M.; Baldi, A.; Scaccini, C.; Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (1998) 361-367.

[21] da Silva, M. C. H.; da Silva L. H. M.; Paggioli, F. J.; Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. *Química Nova*, 29 (2006) 1332-1339.

[22] Patil, G.; Madhusudhan, M. C.; Babu, B. R.; Raghavarao, K.S.M.S.; Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing* 48 (2009) 364–369.

[23] Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C.; “Green chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova* 26 (2003) 123-129.

[24] Huddleston, J. G. ; Willauer, H. D. ; Boaz, K. R.; Rogers, R. D.; Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. *Journal of Chromatography B* 711(1998) 237.

- [25] Tong, A.; Wu, Y.; Shida, T.; Li, L.; Akama, Y.; Tanaka, S.; Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins. *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 11.
- [26] Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanaka, S.; The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta* 48 (1999) 1133
- [27] Pan, I.-H., Chiu H.-H.; Lu, C.-H., Lee, L.-T., Li, Y.-K., Aqueous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit. *Journal of Chromatography A*, 977 (2002) 239–246.
- [28] Chethana, S.; Nayak, C. A.; RaghavaraO, K. S. M. S.; Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *Journal of Food Engineering* 81 (2007) 679–687.
- [29] Patil, G.; Raghavarao, K.S.M.S.; Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal* 34 (2007) 156–164.
- [30] Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A.; Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7623–7629.
- [31] Wu, X.; Liang, L.; Zou, Y.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Yang, L.; Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry* 129 (2011) 443–453.
- [32] Patrício, P. R; Mageste, A. B. ; de Lemos, L. R. ; Carvalho, R. M. M. ; da Silva, L. H.M. ; da Silva, M. C. H.; Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO+organic salts+H<sub>2</sub>O and PPO+organic salts+H<sub>2</sub>O aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* 305 (2011) 1–8.
- [33] Zaslavsky, B. Y.; Aqueous two-phase partitioning, in: *Physical Chemistry And Bio-analytical applications*, Marcel Dekker, NewYork, 1995.
- [34] Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). *Green Chemistry* 9 (2007) 177-183.
- [35] de Lemos, L. R.; Patrício, P. D.; Rodrigues, G. D., de Carvalho, R. M. M.; da Silva, M.C.H.; da Silva, L. H. M.; Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene oxide) 1500 and different electrolytes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>): experimental and correlation. *Fluid Phase Equilibria* 305 (2011) 19–24.
- [36] Graber, T. A.; Medina, H.; Galleguillos, H. R.; Taboada, M. E.; Phase Equilibrium and partition of Iodide in an Aqueous Biphasic System formed by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + PEG + H<sub>2</sub>O at 25 °C. *Journal of Chemical and Engineering Data* 52 (2007) 1262-1267.

- [37] Martins, J. P.; Carvalho, P. C.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. R.; da Silva, M. C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A.; Liquid–liquid equilibria of aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* 53 (2008) 238–241.
- [38] da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Aquino, R. A. N.; Francisco, K. R.; Cardoso, M.V.C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. J.; Nitroprusside-PEO Enthalpic Interaction as a Driving Force for Partitioning of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  Anion in Aqueous Two-Phase Systems Formed by Poly(ethylene oxide) and Sulfate Salts. *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006) 23540-23546.
- [39] Zafarani, M. T.; Salabat, A.; Thermodynamics of magnesium sulfate–polypropylene glycol aqueous two-phase system. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilibria* 152 (1998) 57.
- [40] Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R.; Phase Diagram Data for Several PPG + Salt Aqueous Biphasic Systems at 25 °C. *Journal of Chemical and Engineering Data* 50 (2005) 947-950.
- [41] Johansson, H. O.; Karlström, G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. H.; Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 711 (1998) 3–17.
- [42] Rodrigues, G. D.; de Lemos, L. R.; Patrício, P. R.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Aqueous two-phase systems: A new approach for the determination of p-aminophenol. *Journal of Hazardous Materials* 192 (2011) 292– 298.
- [43] da Silva, L. H. M.; Loh, W.; Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* 29 (2006) 1345.
- [44] da Silva, L. H. M.; Loh, W.; Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran). *Journal of Chemical and Engineering Data B* 104 (2000) 10069-10073.