

Universidade Federal de Ouro Preto

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Química

PPGQUIM

Dissertação

Sistemas aquosos bifásicos mais
amigáveis ambientalmente:
diagramas de fase e aplicação na
partição de antocianinas do farelo
do arroz negro

Lohayne Lígya Barbosa Silva

Ouro Preto
2021





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS MAIS AMIGÁVEIS AMBIENTALMENTE: DIAGRAMAS DE FASE E APLICAÇÃO NA PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DO FARELO DO ARROZ NEGRO

Autora: **Lohayne Ligya Barbosa Silva**

Orientador: **Prof. Dr. Gabriel Max Dias Ferreira**

Coorientadora: **Prof.^a Dr.^a Aparecida Barbosa Mageste**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração:

Físico-química

Ouro Preto/MG

Março de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586s Silva, Lohayne Ligya Barbosa .
Sistemas aquosos bifásicos mais amigáveis ambientalmente
[manuscrito]: diagramas de fase e aplicação na partição de antocianinas
do farelo do arroz negro. / Lohayne Ligya Barbosa Silva. - 2021.
73 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Max Dias Ferreira.
Coorientadora: Profa. Dra. Aparecida Barbosa Mageste.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro
Preto. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Química.
Área de Concentração: Físico Química.

1. Diagramas de fase. 2. Agentes ativos de superfícies. 3. Antocianinas.
4. Extração (Química). I. Ferreira, Gabriel Max Dias . II. Mageste,
Aparecida Barbosa. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 542.8

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Lohayne Ligya Barbosa Silva

Sistemas aquosos bifásicos mais amigáveis ambientalmente: diagramas de fase e aplicação na partição de antocianinas do farelo do arroz negro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 16 de março de 2021

Membros da banca

Doutor - Gabriel Max Dias Ferreira - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor - Leandro Rodrigues de Lemos - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Doutor - Marcus Vinícius Cangussu Cardoso - Universidade Federal de Ouro Preto

Gabriel Max Dias Ferreira, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 17/03/2021



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Max Dias Ferreira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/03/2021, às 22:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0147656** e o código CRC **504AC315**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por não me desamparar em nenhum momento da minha vida, por me dar força e coragem para lutar pelos meus sonhos e por me sustentar nos momentos de desânimo.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudos.

À toda a minha família, em especial, aos meus pais Lidiane e Geraldo, e meus avós Maria Aparecida e José Maurício, que nunca deixaram faltar amor, carinho e apoio, sempre torceram e ainda torcem muito por mim e se esforçaram muito para que eu chegasse até aqui. Vocês são minha fonte de inspiração em tudo o que faço!

Ao meu esposo Tales, por todo amor, companheirismo e apoio ao longo dessa trajetória. Você é parte fundamental de todas as minhas conquistas. Obrigada por sonhar meus sonhos junto comigo e me impulsionar a lutar por eles, todos os dias.

Ao meu orientador Gabriel, agradeço por todo esforço, dedicação, empenho, disponibilidade, compreensão e principalmente pelo grande aprendizado proporcionado. À minha querida coorientadora, Aparecida, por ter me acolhido tão bem ainda na graduação como aluna de iniciação científica, por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar a alcançar meus objetivos. Além de excelentes profissionais vocês são exemplos como pessoa. Foi uma honra poder contar com a orientação e amizade de vocês ao longo desses anos!

À minha amiga Josimara, que me acompanha desde a graduação, agradeço pelos aprendizados e por todos os momentos compartilhados. Às colegas de laboratório, Beatriz e Larissa agradeço pela dedicação e parceria, e por tornarem meus dias no laboratório mais alegres. Aos demais colegas, Vitorino, Renata, Keirom, Matheus, Melany e Gessyca que estiveram presentes no dia a dia da pesquisa, agradeço pela boa convivência e pelas histórias compartilhadas.

Aos professores da banca, por aceitarem o convite e pela contribuição no trabalho.

A todos que me apoiaram, incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

Sistemas aquosos bifásicos mais amigáveis ambientalme: diagramas de fase e aplicação na partição de antocianinas do farelo do arroz negro

Sistemas aquosos bifásicos formados por surfactante não iônico e líquido iônico à base do cátion colina foram estudados neste trabalho quanto ao seu comportamento de fase e quanto à sua aplicação na partição de antocianinas do farelo do arroz negro. Inicialmente, foram obtidos os dados de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) formados por Triton X (TX-165 e TX-305) + líquido iônico à base do cátion colina (bitartarato de colina e dihidrogenocitrato de colina) + água em diferentes temperaturas (25,0, 40,0 e 55,0 °C). Estudou-se o efeito da temperatura, bem como do ânion formador do eletrólito e da hidrofobicidade do surfactante sobre os dados de equilíbrio. Para todos os SABs investigados, constatou-se que a fase superior é rica em surfactante enquanto a fase inferior é rica em eletrólito. Observou-se o aumento da região bifásica nos diagramas de fases com o aumento da temperatura, mostrando que o processo de separação de fases é endotérmico e dirigido entropicamente. O potencial de segregação de fases entre os diferentes ânions estudados seguiu a ordem bitartarato > dihidrogenocitrato, sendo esse resultado atribuído às diferentes capacidades dos ânions para formar complexos de hidratação e induzir um efeito *salting out* no surfactante. Verificou-se ainda que o surfactante TX-305 foi mais eficiente para induzir a segregação de fases que o surfactante TX-165, indicando que o efeito da massa molar compensou o efeito da hidrofobicidade do surfactante na determinação da região de imiscibilidade. Na segunda parte do trabalho, SABs formados por surfactante Triton X (TX-100 ou TX-165) ou Tween (20 ou 80) + cloreto de colina + água à 25,0 °C foram aplicados à partição de antocianinas do farelo do arroz negro. Antocianinas foram extraídas do farelo do arroz negro utilizando um método de extração por solventes e o extrato obtido foi utilizado como fonte de antocianinas para os estudos de partição nos SABs. Para todos os SABs investigados, as espécies de antocianina extraídas do farelo do arroz negro foram preferencialmente transferidas para a fase rica em surfactante do SAB, como indicado por valores de coeficiente de distribuição (K_D) maiores do que a unidade. Esse comportamento foi principalmente atribuído à solubilização das antocianinas no núcleo hidrofóbico das micelas de surfactante presentes na fase rica neste componente. Entretanto, a diminuição de K_D com o aumento do CLA sugeriu que outros fatores também tiveram um papel importante na estabilização de uma fração das antocianinas presentes nessa mesma fase. Valores de K_D mais elevados nos sistemas formados por

Triton X-100 e Tween 80 em comparação aos sistemas formados por TX-165 e Tween 20, respectivamente, indicaram que o aumento da hidrofobicidade do surfactante favoreceu a transferência das antocianinas para a fase rica em surfactante. Os resultados obtidos são importantes no sentido de nortear a aplicação dos SABs em estudo no desenvolvimento de metodologias de extração/purificação de antocianinas.

Palavras-chave: Sistemas aquosos bifásicos, diagramas de fase, surfactantes, cátion colina, antocianinas, extração, farelo do arroz negro.

ABSTRACT

Environmentally friendly aqueous two-phase systems: phase diagrams and application in the partition of black rice bran anthocyanins

Aqueous two-phase systems formed by nonionic surfactant and ionic liquid based on choline cation were studied in this work regarding their phase behavior and application in the partition of anthocyanins of black rice bran. At first, the liquid-liquid equilibrium data of the aqueous two-phase systems (ATPSs) formed by Triton (TX-165 and TX-305) + ionic liquids based on choline cation (choline bitartrate and choline dihydrogenocitrate) + water were obtained in different temperatures (298.15, 313.15, and 328.15 K). The effects of temperature, electrolyte forming anion, and surfactant hydrophobicity on the equilibrium data were evaluated. For all investigated ATPSs, the upper phase was found to be surfactant-rich and the lower phase was electrolyte-rich. An increase of the biphasic region was observed with increasing temperature, showing that the phase separation process is endothermic and entropically driven. The potential of phase segregation between the different anions studied followed the order bitartrate > dihydrogenocitrate, which was attributed to the different capacities of the anions to form hydration complexes and induce a salting out effect on the surfactant. It was also found that the surfactant TX-305 was more efficient to induce phase segregation than the surfactant TX-165, indicating that the effect of molar mass the effect of hydrophobicity of the surfactant in determine the immiscibility region. In the second part of this work, ATPSs formed by surfactant Triton X (TX-100 or TX-165) or Tween (20 or 80) + choline chloride + water at 298.15 K were applied to the partition of anthocyanins of black rice bran. Anthocyanins were extracted from black rice bran using a solvent extraction method and the obtained extract was used as source of anthocyanins for partition studies in ATPSs. For all ATPSs investigated, the anthocyanin species extracted from black rice bran were preferably transferred to the ATPS surfactant-rich phase, as indicated by distribution coefficient (K_D) values higher than the unit. This behavior was mainly attributed to the solubilization of anthocyanins in the hydrophobic core of the surfactant micelles present in the phase enriched with this component. However, the decrease in K_D with the increase of the CLA suggested that other events also played an important role in stabilizing a fraction of the anthocyanins present in that phase. Higher K_D values in systems formed by Triton X-100 and Tween 80 compared to systems formed by TX-165 and Tween 20, respectively, indicated that the increase in surfactant hydrophobicity favored the transfer of anthocyanins to the surfactant-rich phase. The results obtained are important to directing

the application of the ATPSs under study in the development of anthocyanin extraction/purification methodologies.

Keywords: Aqueous two-phase systems, phase diagram, surfactants, cation choline, anthocyanins, extraction, black rice bran.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Diagrama de fase, em coordenadas retangulares, para um sistema aquoso bifásico formado por dois componentes distintos, para uma dada temperatura e pressão.....8
- Figura 1.2.** Estrutura molecular do cátion colina.....14
- Figura 1.3.** Efeito da temperatura sobre a região bifásica do SAB formado por TX-165 + bitartarato de colina + água: (◆) 25,0 °C; (●) 40,0 °C e (▲) 55,0 °C.....25
- Figura 1.4** Efeito do ânion do líquido iônico sobre o comportamento de fase de SABs formados por (a) TX-165 + líquido iônico (BC, DHCC ou CC) + água e (b) TX-305 + líquido iônico (BC, DHCC ou CC) + água, a 55,0 °C. Dados de equilíbrio para o SAB formado por cloreto de colina foram retirados a partir do trabalho de Silva e colaboradores.¹²29
- Figura 1.5** Efeito da hidrofobicidade do surfactante sobre o comportamento de fase dos SABs formados por (a) Surfactante (TX-165 ou TX-305) + bitartarato de colina + água e (b) Surfactante (TX-100, TX-102, TX-165 ou TX-305) + dihidrogenocitrato de colina + água, a 40,0 °C. Dados de equilíbrio do SAB TX-100 (ou TX-102) + dihidrogenocitrato de colina + água foram obtidos do trabalho de Escudero e colaboradores.¹⁰²30

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1.** Estruturas moleculares de corantes pertencentes aos grupos de corantes naturais (a) Clorofilas (clorofila a), (b) Carotenoides (betacaroteno) e (c) Flavonoides (catequina).....41
- Figura 2.2.** Estrutura molecular base das antocianidinas (cátion flavilium). Adaptado de Cavalcanti e colaboradores.¹⁰43
- Figura 2.3.** Principais antocianidinas encontradas na natureza.¹³44
- Figura 2.4.** Formas químicas predominantes das antocianinas. Adaptado de Castañeda-Ovando e colaboradores⁹46
- Figura 2.5.** Reação de degradação da chalcona em pH > 7,0. Adaptado de Castañeda-Ovando e colaboradores⁹47

| | |
|--|----|
| Figura 2.6. Grãos de arroz negro (<i>Oriza sativa L.</i>)..... | 54 |
| Figura 2.7. Fluxograma com as etapas realizadas para extração com solvente das antocianinas a partir do farelo do arroz..... | 58 |
| Figura 2.8. Distribuição das antocianinas nos SABs: (a) Sistemas TX-100 + cloreto de colina + água em diferentes concentrações dos componentes formadores do sistema (concentração global aumenta da esquerda para a direita); (b) Sistemas de Tween 20 + cloreto de colina + água em diferentes concentrações do componentes formadores do sistema (sistemas em duplicata, com diminuição da concentração global do SAB da esquerda para a direita)..... | 62 |
| Figura 2.9. Espectros de absorbância das fases diluídas para o sistema Triton X-165 + cloreto de colina à 25,0 °C (a) fase superior diluída de 10X (b) fase inferior diluída de 40X..... | 63 |
| Figura 2.10. Efeito do CLA sobre o coeficiente de distribuição das antocianinas do arroz negro em SAB: (a) Triton X (TX-100 ou TX-165) + cloreto de colina + água, à 25,0 °C; (b) Tween (20 ou 80) + cloreto de colina + água, à 25,0 °C..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1. Exemplos de alguns grupos de SABs e seus constituintes..... | 6 |
| Tabela 1.2. Estruturas químicas e pureza dos reagentes utilizados..... | 17 |
| Tabela 1.3. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-165 (w_{tx}) + bitartarato de colina (w_{bc}) + água (w_w) em diferentes temperaturas..... | 21 |
| Tabela 1.4. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-165 (w_{tx}) + dihidrogenocitrato de colina (w_{dhcc}) + água (w_w) em diferentes temperaturas..... | 22 |
| Tabela 1.5. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-305 (w_{tx}) + bitartarato de colina (w_{bc}) + água (w_w) em diferentes temperaturas..... | 23 |
| Tabela 1.6. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-305 (w_{tx}) + dihidrogenocitrato de colina (w_{dhcc}) + água (w_w) em diferentes temperaturas..... | 24 |
| Tabela 1.7. Coeficientes de correlação (R^2) e inclinações das linhas de amarração (ILA) para SABs formados por TX-165 + líquido iônico + água em diferentes temperaturas.*..... | 27 |
| Tabela 1.8. Coeficientes de correlação (R^2) e inclinações das linhas de amarração (ILA) para SABs formados por TX-305 + líquido iônico + água em diferentes temperaturas.*..... | 28 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1. Principais antocianinas encontradas na natureza. ^a | 45 |
| Tabela 2.2. Estruturas químicas e pureza dos reagentes utilizados..... | 57 |
| Tabela 2.3. Composições globais e CLA, em % m/m, dos sistemas aquosos bifásicos usados nos estudos de partição..... | 60 |
| Tabela 2.4. Equações da reta e coeficientes de determinação (R^2) para as regressões lineares realizadas com os dados de absorvância versus concentração de antocianina, para diferentes composições do solvente em que a curva de calibração foi preparada..... | 64 |

Tabela 2.5. Coeficiente de distribuição das antocianinas.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| SAB | sistema aquoso bifásico |
| PEG | poli(etileno glicol) |
| LA | linha de amarração |
| CLA | comprimento da linha de amarração |
| ILA | inclinação da linha de amarração |
| EHL | equilíbrio hidrofílico-lipofílico |
| TX | surfactante Triton X |
| LI | líquido iônico |
| BC | bitartarato de colina |
| CC | cloreto de colina |
| DHCC | dihidrogenocitrato de colina |
| RMN | ressonância magnética nuclear |
| CLAE | cromatografia líquida de alta eficiência |
| K_D | coeficiente de distribuição |
| AN | antocianinas |
| FRS | fase rica em surfactante |
| FRCC | fase rica em cloreto de colina |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| Capítulo 1: Diagramas de fase para SAB formado por surfactante não iônico da família Triton X e líquido iônico à base do cátion colina..... | 4 |
| 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 1.1.1 Histórico dos sistemas aquosos bifásicos (SABs): visão geral..... | 4 |
| 1.1.2 Diagramas de fase | 7 |
| 1.1.3 Fatores que influenciam o comportamento de fase de um SAB | 10 |
| 1.1.4 Novas perspectivas para a formação de SABs: aliados ambientais | 13 |
| 1.2 OBJETIVOS | 16 |
| 1.2.1 Objetivo geral..... | 16 |
| 1.2.2 Objetivos específicos..... | 16 |
| 1.3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 17 |
| 1.3.1 Materiais | 17 |
| 1.3.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos | 17 |
| 1.3.3 Quantificação das fases | 18 |
| 1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 20 |
| 1.4.1 Dados de equilíbrio líquido-líquido | 20 |
| 1.4.2 Efeito da temperatura | 25 |
| 1.4.3 Efeito do ânion do líquido iônico..... | 28 |
| 1.4.4 Efeito do surfactante..... | 30 |
| 1.5 CONCLUSÃO | 32 |
| 1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 33 |
| Capítulo 2: Partição de antocianinas do farelo do arroz negro em SABs formados por surfactante não iônico e líquido iônico à base do cátion colina | 40 |
| 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 40 |
| 2.1.1 O uso dos corantes na história da humanidade: natural versus sintético..... | 40 |
| 2.1.2 Antocianinas, um importante substituinte aos corantes sintéticos | 42 |
| 2.1.3 Estrutura molecular das antocianinas | 42 |
| 2.1.4 Estabilidade das antocianinas | 45 |
| 2.1.4.1 Influência do pH..... | 45 |
| 2.1.4.2 Influência da temperatura..... | 47 |
| 2.1.4.3 Presença de luz e oxigênio | 48 |
| 2.1.4.4 Copigmentação | 49 |
| 2.1.5 Extração, purificação, identificação e quantificação de antocianinas | 50 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.1.5.1 | Quantificação pelo método do pH diferencial..... | 51 |
| 2.1.6 | Sistemas aquosos bifásicos como técnica na purificação de antocianinas | 52 |
| 2.1.7 | Antocianinas no arroz negro | 54 |
| 2.2 | OBJETIVOS | 56 |
| 2.2.1 | Objetivos gerais..... | 56 |
| 2.2.2 | Objetivos específicos..... | 56 |
| 2.3 | MATERIAS E MÉTODOS | 57 |
| 2.3.1 | Materiais | 57 |
| 2.3.2 | Extração da antocianina a partir do farelo do arroz negro..... | 57 |
| 2.3.3 | Determinação da concentração de antocianinas no extrato | 58 |
| 2.3.4 | Partição das antocianinas nos SABs..... | 59 |
| 2.3.5 | Quantificação das antocianinas no SAB e cálculo do coeficiente de distribuição | 61 |
| 2.4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 62 |
| 2.4.1 | Concentração de antocianinas totais no extrato de antocianinas | 62 |
| 2.4.2 | Partição das antocianinas do arroz negro nos SABs | 62 |
| 2.4.3 | Efeito da mudança de parâmetros do SAB sobre K_D | 66 |
| 2.5 | CONCLUSÃO | 68 |
| 2.6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |
| 2.7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 73 |

INTRODUÇÃO

Em diversos setores industriais e de química fina, sistemas formados por mais de uma fase são extensivamente empregados em métodos de obtenção de analitos, ao serem utilizados como técnica de extração, separação e/ou pré-concentração. Estes sistemas podem ser do tipo sólido-líquido, quando um líquido é utilizado para extrair um composto presente em uma fase sólida, ou do tipo líquido-líquido, quando uma fase líquida é utilizada para extrair um soluto dissolvido em outra fase líquida.¹

A extração do tipo sólido-líquido é amplamente utilizada na área alimentícia, como por exemplo, na extração da vanilina² e na obtenção de óleos vegetais³ (óleo de soja, algodão, etc), a partir de *Vanilla planifolia* e sementes oleaginosas, respectivamente, empregando-se etanol e hexano como solventes extratores. Cabe citar também sua aplicação nos processos de recuperação de minérios de urânio pela extração com ácido sulfúrico.⁴ A extração líquido-líquido por sua vez é usualmente empregada na área farmacêutica, por exemplo na recuperação da penicilina proveniente do processo de fermentação,⁵ e na área de cosméticos, tal como na obtenção de óleos essenciais através do processo de desterpenação, utilizando-se etanol como solvente extrator.⁶ Vale destacar sua aplicação na remoção de poluentes indesejados de sistemas aquosos, como por exemplo a remoção de fenol na produção do policarbonato⁷ e a recuperação de ácidos orgânicos resultantes de processos de fermentação.⁸

Em vista de sua simplicidade operacional, baixo consumo de energia, preservação das propriedades do analito de interesse, versatilidade e rendimento, a técnica de extração líquido-líquido destaca-se entre as técnicas de extração e separação de solutos. Além disso, por geralmente não envolver aquecimento e evaporação, ela geralmente é realizada em temperaturas próximas à ambiente, sendo mais adequada para a obtenção de produtos que seriam facilmente degradados e termossensíveis.⁹ Em contrapartida, essa modalidade extrativa, quando faz o uso de solventes tóxicos, inflamáveis e voláteis, apresenta uma série de desvantagens, pois os mesmos são capazes de desnaturar proteínas e causar danos ambientais e à saúde humana.^{10,11}

Os SABs são sistemas ternários que podem apresentar de 60 a 80% de água em sua composição e que sob condições específicas de composição, temperatura e pressão, apresentam-se como duas fases em equilíbrio termodinâmico.¹² Por serem formados majoritariamente por água esses sistemas fornecem um ambiente ameno para partição de biomoléculas, evitando sua desnaturação e perda da atividade biológica,¹³ além de se mostrarem eficientes em processos de extração e separação de diferentes analitos de interesse comercial e ambiental, tal como corantes e íons metálicos.

Diferentes combinações de componentes podem levar à formação de um SAB e, atualmente, estudos sobre SABs formados por surfactantes não iônicos da família Triton X combinados com líquidos iônicos à base do cátion colina têm despertado grande atenção pela natureza biocompatível de seus componentes e sua reduzida toxicidade, o que aumenta o impacto de sua utilização em processos de purificação/extração de solutos e em metodologias de remediação ambiental. No entanto, poucos trabalhos envolvendo SABs formados por esses compostos são relatados na literatura, o que permite a exploração de inúmeras combinações dos componentes para a formação de novos SABs, além de sua aplicação na partição de diferentes analitos. A esse respeito, a primeira parte desse trabalho visa estabelecer na literatura novas combinações de substâncias capazes de formar sistemas aquosos bifásicos, particularmente combinações entre surfactantes não iônicos da família Triton (Triton X-165 e Triton X-305) e líquidos iônicos à base do cátion colina (bitartarato de colina e dihidrogenocitrato de colina). Além disso, visando a uma proposta de aplicação desses SABs, a segunda parte desse trabalho objetiva estudar o comportamento de partição de antocianinas nesses sistemas, avaliando diferentes fatores que possam influenciar em sua partição.

O interesse pelas antocianinas neste trabalho ocorre por diferentes aspectos. Em primeiro lugar, as antocianinas constituem uma alternativa promissora de substituição aos corantes artificiais por serem flavonoides hidrossolúveis amplamente encontrados na natureza e responsáveis pela maioria das colorações azul, violeta e vermelho em diversas espécies vegetais.¹⁴ Além disso, elas apresentam capacidade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena cientificamente comprovados.¹⁵

Apesar do grande potencial de aplicação das antocianinas nas indústrias alimentícias, cosmética e farmacêutica, o seu uso ainda é restrito em função de sua instabilidade e das dificuldades encontradas em etapas de purificação. Entre os principais fatores dos quais dependem a estabilidade e aplicação desses compostos pode-se citar a temperatura, o pH, a presença de luz e oxigênio, a sua estrutura química e as dificuldades envolvidas no seu processo de purificação.¹⁶ Neste contexto, os sistemas aquosos bifásicos surgem como uma alternativa à purificação desses compostos devido às suas propriedades estratégicas e às características que permitem enquadrá-los dentro de alguns dos Princípios da Química Verde,¹⁷ especialmente os SABs propostos nesse trabalho.

O presente trabalho encontra-se dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo é abordado a parte do trabalho referente à obtenção de novos diagramas de fase de SABs formados por surfactante não iônico da família Triton X e líquido iônico à base do cátion colina (trabalho já publicado no periódico *Journal of Molecular Liquids* - DOI: 10.1016/j.molliq.2020.114030). Para contextualizar o trabalho, é apresentada uma revisão de

literatura contendo um breve histórico a respeito dos SABs, a forma de apresentar seu comportamento na forma de um diagrama de fase, os principais fatores que influenciam no comportamento de fases desses sistemas e as novas perspectivas para o estudo destes sistemas. No capítulo seguinte é abordado a parte do trabalho referente ao estudo de partição de antocianinas do farelo de arroz negro nos referidos SABs. Na revisão de literatura deste capítulo são apresentadas as principais características estruturais das antocianinas e os fatores que interferem na sua estabilidade, bem como os principais processos envolvidos em sua extração, purificação e quantificação. Além disso, é apresentada uma contextualização sobre o uso do arroz negro e seus resíduos como fonte potencial de antocianinas e sobre os trabalhos que já aplicaram outros tipos de SABs para partição de antocianinas de outras fontes.

CAPÍTULO 1: DIAGRAMAS DE FASE PARA SAB FORMADO POR SURFACTANTE NÃO IÔNICO DA FAMÍLIA TRITON X E LÍQUIDO IÔNICO À BASE DO CÁTION COLINA

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Histórico dos sistemas aquosos bifásicos (SABs): visão geral

Os primeiros estudos reportados na literatura sobre a descoberta dos sistemas aquosos bifásicos datam de 1896, quando o microbiologista e pesquisador Beijerinck misturou soluções de ágar e gelatina ou gelatina e amido solúvel e verificou a formação espontânea de duas fases no sistema. O estudo dos sistemas obtidos, constatou que uma das fases era rica em gelatina e a outra era rica em ágar (ou amido), sendo ambas as fases compostas majoritariamente por água.^{18,19} Em continuidade ao estudo desses sistemas, cerca de 40 anos depois, em 1936, Ostwald e Hertel, verificaram que amidos de origem distintas (arroz, milho, etc.) com diferentes frações de amilose e amilopectina geravam sistemas com diferentes propriedades como, por exemplo, diferentes composições das fases em equilíbrio, em consequência das variações nas interações intermoleculares existentes entre os componentes formadores do sistema.²⁰

Em 1947, Dobry e Boyer-Kawenoki²¹ investigaram a miscibilidade de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos e a ocorrência ou não de separação de fases nestes sistemas e observaram que de trinta e cinco pares de polímeros avaliados, apenas quatro não apresentaram a formação de duas fases, o que permitiu-lhes concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno evidente.

Posteriormente, no final da década de 50, Albertsson, apresentou à comunidade científica o grande potencial dos SABs para a extração de materiais biológicos²² ao constatar que fragmentos de cloroplastos particionavam preferencialmente para uma das fases do sistema formado por poli(etileno glicol) (PEG) e fosfato de potássio, tornando-se evidente que os sistemas aquosos bifásicos representavam uma alternativa promissora para a separação de analitos diversos.

Com o desenvolvimento desta área de pesquisa, diferentes combinações de compostos apresentaram a habilidade de levar à formação de SABs, sendo reportados na literatura as combinações entre dois polímeros distintos,²³ um polímero e um eletrólito,²⁴ dois eletrólitos,²⁵ um polímero e um surfactante,²⁶ um surfactante e um eletrólito²⁷ ou dois surfactantes.²⁸ A princípio, as combinações mais recorrentes para os SABs eram resultantes da mistura de

soluções aquosas de dois polímeros distintos ou de um polímero e um sal inorgânico, sendo que este último, na maioria das vezes, apresentava uma fase superior rica em polímero e uma fase inferior rica em eletrólito. Gutowski e colaboradores²⁹ descobriram em 2003 os primeiros SABs formados pela combinação de dois eletrólitos, sendo um destes componentes um líquido iônico à base de imidazólio e o outro um sal inorgânico. Desde então tem crescido o número de trabalhos que fazem uso de líquidos iônicos como potenciais formadores de SABs. Além disso, frente a inúmeras possibilidades de combinações dos componentes e com o crescimento dos estudos sobre sistemas aquosos bifásicos ao longo dos anos, diferentes tipos de SABs estão sendo propostos, conforme indicado na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Exemplos de alguns grupos de SABs e seus constituintes.

| Grupos de SAB | Constituintes | Referência |
|--------------------------------------|--|--|
| Polímero – Polímero | PEG ^a /Dextrana | Gündüz, 2000 ³⁰ |
| | PEG/PVA ^b | Pessoa Junior et al., 2005 ³¹ |
| | PEG/Maltodextrina | Giraldo-Zuñiga et al., 2006 ³² |
| Polímero – Sal inorgânico | PEG/Fosfato de Potássio | Carvalho et al., 2007 ³³ |
| | PEG/Sulfato de Lítio | Martins et al., 2008 ³⁴ |
| | PEG/Sulfato de Magnésio | de Oliveira et al., 2009 ³⁵ |
| Copolímero tribloco – Sal inorgânico | F68/Sulfato de Magnésio | da Silva et al., 2006 ³⁶ |
| | L35/Tartarato de Sódio | Martins et al., 2009 ³⁷ |
| | L64/Sulfato de Sódio | Rodrigues et al., 2009 ³⁸ |
| Copolímero tribloco – Sal orgânico | F68/Citrato de amônio F68/Fumarato de sódio | Rodrigues et al., 2010 ³⁹ |
| Solvente orgânico – Sal orgânico | Álcool/Citrato de Sódio | Ooi et al., 2009 ⁴⁰ |
| Solvente orgânico – Sal inorgânico | Álcool/Sais de Potássio | Reis et al., 2014 ⁴¹ |
| Líquido iônico – Aminoácidos | [C4min]Cl ^c /L-Lisina | Domínguez-Pérez et al., 2009 ⁴² |
| Líquido iônico – Sal inorgânico | [C4min]Cl/Fosfato de Potássio | Louros et al., 2010 ⁴³ |
| | [C4mim]Cl/Fosfato de Potássio | Ventura et al., 2012 ⁴⁴ |
| Líquido iônico – Carboidratos | [C4min]Cl/D-Matitol | Freire et al., 2011 ⁴⁵ |
| Surfactante – Sacarose | Triton X-114/Sucrose | Ramalakshmi et al., 2014 ⁴⁶ |
| Copolímero – Líquido iônico | L35/Bitartarato de colina | e Silva et al., 2017 ⁴⁷ |
| Polímero – Líquido iônico | PEG-600/Cloreto de colina | dos Santos et al., 2018 ⁴⁸ |
| Surfactante – Líquido iônico | Triton X-165/Cloreto de colina | Silva et al., 2019 ¹² |

^a Poli(etileno glicol); ^b Álcool polivinílico; ^c Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio.

Fonte: Própria autora.

Em geral, as pesquisas na área de SABs seguem uma tendência que consiste inicialmente na descoberta de novos SABs, que pode ser acompanhada de uma investigação sobre as forças que regem a formação desses sistemas, com posterior aplicação dos SABs em processos de extração/purificação de uma ampla variedade de solutos. Estudos relatam a eficiência dos SABs na partição de enzimas, proteínas, aminoácidos, antioxidantes,

alcaloides;^{49,50} e têm se destacado em processos de remediação de matrizes aquosas contendo poluentes diversos como íons metálicos e corantes.^{51,52} O primeiro trabalho utilizando SABs aplicados à extração de íons metálicos foi publicado por Zvarova e colaboradores⁵³ em 1984 e representou um marco na expansão da técnica para além das aplicações em matrizes biológicas. Por outro lado, os primeiros estudos de partição de corantes em SABs datam de 1998, quando Tong e colaboradores⁵⁴ avaliaram a partição dos corantes antraquinona, vermelho de metila e azul de metileno em SABs formados por surfactantes.

Além das aplicações no contexto biológico, como técnica de separação e/ou purificação de biomoléculas, células ou organelas e no âmbito da reciclagem de metais e corantes, os SABs também têm sido empregados em diversas pesquisas na área ambiental. Alguns exemplos são no desenvolvimento de métodos para determinação de fenol, fármacos, hormônios e pesticidas.⁵⁵⁻⁵⁸ Muitas destas aplicações resultam das características atrativas destes sistemas que, dependendo da natureza dos componentes que o formam, podem ser a elevada biodegradabilidade e baixo custo destes componentes, curto tempo para que ocorra a segregação de fases, baixa tensão interfacial e possibilidade de escalonamento.⁵⁹

1.1.2 Diagramas de fase

A caracterização inicial de um SAB ocorre através da determinação de seu diagrama de fases. Uma fase é uma região microscopicamente homogênea de um sistema, ao longo da qual as propriedades termodinâmicas intensivas são iguais ponto a ponto ao longo de toda a sua extensão. Dependendo do estado de equilíbrio termodinâmico de um sistema, este pode apresentar uma ou mais fases e a representação destes estados de equilíbrio, por meio das variáveis que o definem, em um sistema de coordenadas apropriado permite a obtenção do diagrama de fases daquele sistema. Assim, um diagrama de fases corresponde à representação gráfica dos dados de equilíbrio de um sistema e são ferramentas essenciais para a compreensão de seu comportamento de fase e obtenção de algumas de suas propriedades. Para obter-se o diagrama de um SAB, usualmente representa-se as composições químicas das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico para diferentes composições globais do sistema. Essa representação pode ser feita em um sistema de coordenadas cartesianas⁶⁰ como mostrado na Figura 1.1 que apresenta um diagrama de fase para um SAB formado pelos componentes 1 e 2, no qual as concentrações dos componentes 1 e 2 são representadas na abscissa e na ordenada, respectivamente, com as composições dos componentes expressas em porcentagem mássica (% (m/m)).

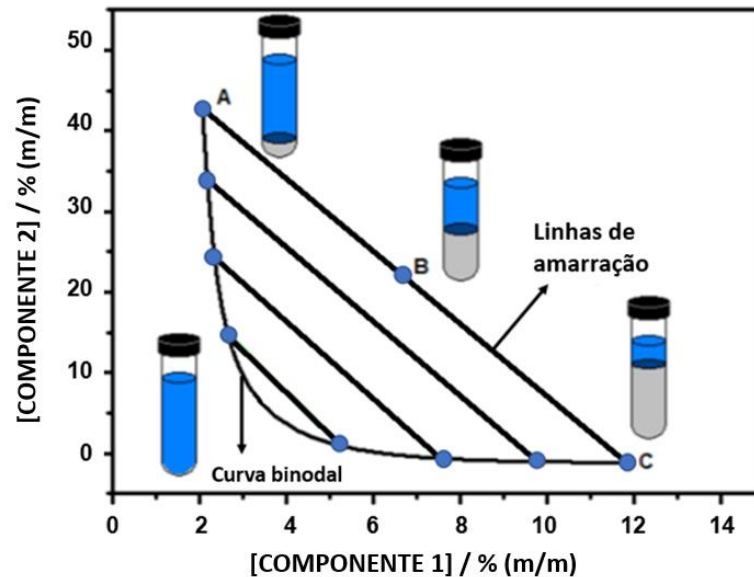


Figura 1.1. Diagrama de fase, em coordenadas retangulares, para um sistema aquoso bifásico formado por dois componentes distintos, para uma dada temperatura e pressão.

Fonte: Própria autora.

A curva binodal é a linha que separa regiões do diagrama que representam composições globais que formarão sistemas monofásicos de regiões do diagrama que representam composições globais que formam sistemas bifásicos. Os pontos que definem a linha binodal representam as concentrações mínimas de cada componente necessárias para que um sistema bifásico seja obtido na temperatura e pressão em que o diagrama está representado. Além da binodal, o diagrama apresenta diferentes linhas de amarração (LA), que são segmentos de reta que unem pontos do diagrama que representam as composições de duas fases que coexistem em equilíbrio termodinâmico (por exemplo, A e C na figura 1.1), passando por um ponto que representa a composição global que gerou o SAB (por exemplo, B na figura 1.1). Qualquer conjunto de pontos sobre uma mesma linha de amarração corresponde a SABs que apresentam fases correspondentes (superiores ou inferiores) com propriedades termodinâmicas intensivas idênticas entre si (concentração, densidade, condutividade etc.). Porém, as propriedades termodinâmicas extensivas das fases correspondentes (volume, massa etc.) são diferentes entre si.^{60,61} Assim, para a linha de amarração que passa pelos pontos A, B e C na figura 1.1, composições globais próximas ao ponto A levarão à formação de SAB com o volume de fase superior maior que o volume da fase inferior, enquanto composições globais próximas ao ponto C levarão à formação de SAB com volume de fase inferior maior. Por outro lado, uma composição global correspondente ao ponto médio da linha de amarração irá gerar um SAB com volumes de fase superior e inferior iguais.

Um parâmetro termodinâmico de fundamental importância é o comprimento da linha de amarração (CLA). Seu valor expressa a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases em equilíbrio. O CLA pode ser calculado de acordo com a equação 1.1:

$$CLA = \sqrt{(w_{C2}^S - w_{C2}^I)^2 + (w_{C1}^S - w_{C1}^I)^2} \quad (1.1)$$

em que o termo $(w_{C2}^S - w_{C2}^I)^2$ representa o quadrado da diferença entre as concentrações do componente 2 nas fases superior e inferior e, analogamente, $(w_{C1}^S - w_{C1}^I)^2$ representa o quadrado da diferença entre as concentrações do componente 1 nas fases superior e inferior. Como as concentrações são expressas em porcentagem mássica (% m/m), o CLA também é expresso nessa unidade. Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases.²⁰ Nesse sentido, valores de CLA mais elevados podem ser mais atrativos quando se pretende aplicar um SAB para extração de um analito, pois uma maior distinção entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases pode significar maior seletividade na partição/extração do analito alvo. Porém, tratando-se do fator econômico, CLAs menores são mais vantajosas, pois requerem menores quantidades dos componentes formadores do sistema para obtenção do SAB.

Outro parâmetro importante é a inclinação da linha de amarração (ILA). A ILA pode ser calculada de acordo com a equação 1.2:

$$ILA = \frac{(w_{C1}^S - w_{C1}^I)}{(w_{C2}^S - w_{C2}^I)} \quad (1.2)$$

em que w_{C1}^S e w_{C1}^I são as porcentagens mássicas do componente 1 e w_{C2}^S e w_{C2}^I são as porcentagens mássicas do componente 2 nas fases superior e inferior, respectivamente.

Pesquisas recentes retratam a obtenção de diagramas de fases a partir de novas combinações dos componentes formadores de SABs. Esses estudos são baseados principalmente na investigação da termodinâmica de formação de fases e na aplicação desses novos SABs na partição de solutos. Nesse sentido, a partir de um diagrama de fases é possível obter as informações mencionadas e empregar o SAB em estudos de separação/extração de analitos diversos.

1.1.3 Fatores que influenciam o comportamento de fase de um SAB

Após a descoberta de novos SABs, a tendência dos estudos nessa área consiste na investigação das principais forças que regem a formação e o equilíbrio de fases nesses sistemas. Porém, alguns aspectos ainda dificultam essa tarefa como, por exemplo, a ausência de dados termodinâmicos associados aos processos de mistura dos componentes formadores dos SABs, incluindo variações de entalpia, de energia livre de Gibbs de hidratação, de entropia, de volume e de capacidade calorífica.

Estudos estabelecidos na literatura envolvendo SABs apontam que o processo de separação de fases pode ser afetado pela mudança de parâmetros como o pH, a temperatura e, em casos particulares, a massa molar do polímero, a estrutura do cátion e ânion do eletrólito e a hidrofobicidade do surfactante em SABs formados por estes componentes específicos.^{62,63} A seguir será apresentada uma descrição breve de como estes fatores podem influenciar o processo de segregação das fases em um SAB.

- *Efeito do pH*: estudos sobre a influência da variação do pH no processo de separação de fase em SABs formados por polímero e eletrólito mostram que a mudança de pH pode afetar a posição da curva binodal. Em geral, o aumento do pH promove a expansão da região bifásica, deslocando a curva binodal para regiões em que menores concentrações dos componentes são necessárias para a formação do SAB.⁶⁴ Esse resultado é correlacionado com fato que em valores de pH mais altos os ânions podem apresentar maior valência, sendo mais eficientes para promover a separação de fase quando comparados aos ânions correspondentes que apresentam menor valência em valores de pH mais baixos. Isso pode ser explicado com base na capacidade cosmotrópica dos ânions formadores dos eletrólitos, a qual consiste na sua habilidade em estruturar as moléculas de água em sua camada de solvatação, uma vez que esses ânions interagem mais fortemente com as moléculas de água do que as moléculas de água entre si.⁶⁵ Quando em solução aquosa, os íons provenientes da dissociação do eletrólito são solvatados por moléculas de água, ocorrendo um processo de hidratação dos íons. Quando um ânion cosmotrópico é adicionado a uma solução aquosa contendo um polímero hidrofílico, eles competem com o polímero pelas moléculas de água e devido à maior afinidade dos íons (especialmente dos ânions) do eletrólito pela água em relação ao polímero, há uma diminuição na hidratação e solubilidade do polímero. Isso tem como resultado, em certas concentrações, a exclusão do polímero para uma segunda fase líquida e, conseqüentemente, a formação do SAB.⁶⁶ Por isso, à medida que o pH do

meio aumenta, o ânion tende a se tornar mais hidratado devido a sua maior valência em valores de pH mais elevados, conseqüentemente reduzindo as interações entre moléculas de água e polímero e tornando mais eficiente o processo de separação de fases.⁶⁷ Vale a pena ressaltar que o próprio agente utilizado para alterar o pH do SAB, como por exemplo NaOH ou H₂SO₄, constitui uma fonte de eletrólitos para o sistema que pode alterar o comportamento de fase do sistema, favorecendo que a separação de fases ocorra em concentrações mais baixas dos constituintes do SAB.

- *Efeito da temperatura:* a mudança de temperatura pode modificar o tamanho da região bifásica de um SAB, aumentando-a ou diminuindo-a. Dessa forma, o efeito da temperatura muda de sistema para sistema, dependendo, em parte, da natureza dos compostos que competem pelas moléculas de água, influenciando diretamente o caráter hidrofóbico de um componente específico do SAB (polímero, surfactante ou eletrólito, por exemplo). Sistemas formados por compostos orgânicos, como os de surfactantes combinados com sais inorgânicos ou orgânicos em geral, apresentam um aumento da região bifásica com o aumento da temperatura. Isso se deve ao desfavorecimento da formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a parte hidrofílica do polímero ou surfactante e, conseqüentemente, ao aumento do caráter hidrofóbico desses com o aumento da temperatura.^{68,69} Por outro lado, sistemas formados por líquidos iônicos e sais inorgânicos ou orgânicos apresentam diminuição da região bifásica com o aumento da temperatura. Em função das propriedades dos líquidos iônicos, esses interagem mais com as moléculas de água em temperaturas mais elevadas.^{70,71} Ao misturarmos um surfactante não iônico com líquido iônico no mesmo sistema, um efeito sinérgico é observado a temperaturas mais altas, de forma que a elevada capacidade de solvatação dos líquidos iônicos pelas moléculas de água é somada à baixa capacidade de interação das moléculas de água com a região hidrofílica do surfactante, promovendo um aumento da região bifásica.⁷²
- *Efeito da massa molar do polímero:* a massa molar do polímero em SABs formados com esse tipo de componente é um fator relevante na segregação das fases do sistema. Já nos primeiros estudos nessa área, Albertsson⁷³ observou que o aumento da massa molar do polímero promovia o aumento da região de imiscibilidade entre os componentes formadores do sistema. Em sistemas formados por poli(etileno glicol) (PEG), por exemplo, a origem desse comportamento foi relacionada ao aumento da hidrofobicidade do polímero com o aumento de sua massa molar.⁷⁴ À medida que se

aumenta o número de monômeros de óxido de etileno na cadeia deste polímero, ocorre uma diminuição da sua solubilidade em água como consequência do aumento do seu caráter hidrofóbico. Isso aumenta a incompatibilidade entre os componentes do sistema, promovendo a segregação das fases em composições globais menores.

- *Efeito da hidrofobicidade do surfactante:* alguns estudos de SABs formados por surfactante apontam o balanço dos efeitos hidrofóbico-lipofílico do surfactante como fator responsável pela segregação das fases.¹² Em 1949, Griffin introduziu a noção de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), com base na intensidade das interações entre as moléculas de água e as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas dos surfactantes, de modo que a solubilidade final da substância é o resultado da combinação entre essas duas porções.⁷⁵ Esse parâmetro é útil para classificar um determinado composto com relação à sua hidrofobicidade, sendo específico para cada molécula e podendo variar de 0 a 20, dependendo de sua estrutura química. Quanto menor o EHL da molécula, menor o número de grupos hidrofílicos em relação aos grupos lipofílicos, portanto, maior sua hidrofobicidade e capacidade de segregação de fases em um SAB e vice-versa.⁷⁶
- *Efeito do cátion e ânion do eletrólito:* ao modificarmos o eletrólito formador do SAB, é possível observarmos algumas mudanças do comportamento de fases do sistema. A natureza do eletrólito pode ou não favorecer o processo de separação de fases através da ocorrência dos efeitos *salting in* e *salting out*. No efeito *salting out* ocorre a formação preferencial de complexos de hidratação entre os íons formadores do eletrólito e as moléculas de água, o que diminui a hidratação do outro componente formador do SAB (polímero ou surfactante, por exemplo) e possibilita a formação de fases em menores concentrações dos componentes do sistema. Por outro lado, no efeito *salting in*, esse processo é contrário e maiores quantidades dos constituintes do sistema são necessárias para que ocorra a separação de fases.^{77,78} Estudos que investigaram a formação de fases de SABs constituídos por diferentes sais de sódio constataram que o aumento da carga do ânion diminui a concentração de sal necessária para a separação das fases, visto que o ânion de maior valência torna-se mais hidratado e assim, diminui a quantidade de moléculas de água disponíveis para hidratar o polímero.⁷⁹ Dessa forma, eletrólitos que apresentam valores mais negativos de energia livre de Gibbs de hidratação ($\Delta_{\text{hid}}G^0$) são mais solvatados e conseqüentemente promovem uma maior desidratação da cadeia polimérica, prevalecendo o efeito *salting out*. Uma outra proposta existente na literatura para auxiliar na compreensão do efeito dos constituintes do eletrólito sobre a formação

de SABs, baseado no estudo de sistemas formados por PEG + sal inorgânico + água, é conhecida como modelo do pseudopolication.⁸⁰ Segundo esse modelo, as unidades de óxido de etileno contidas na estrutura do polímero interagem com os cátions do eletrólito, formando uma espécie com elevada densidade de cargas positivas em torno da cadeia polimérica, a qual é chamada de pseudopolication. Esta por sua vez, é capaz de atrair eletrostaticamente os ânions do sal, desprendendo moléculas de água que soltavam a macromolécula e aumentando, portanto, a entropia do processo. Nesse modelo, o cátion interage com o polímero até um ponto de saturação em que não há mais ganho entrópico, sendo mais favorável o sistema separar fases.⁸¹

1.1.4 Novas perspectivas para a formação de SABs: aliados ambientais

Os sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros são conhecidos há mais de meio século,⁸² por serem empregados na extração e separação de íons metálicos,⁸³ células sanguíneas,⁸⁴ enzimas,⁸⁵ aminoácidos,⁸⁶ entre outros. No entanto, sistemas constituídos por dois polímeros hidrofóbicos ou ainda por um polímero e um sal inorgânico possuem polaridade de fases limitadas e apresentam viscosidade relativamente alta, podendo desacelerar o processo de equilíbrio de fases, além de afetar a transferência de massa dos analitos durante a extração, dificultando, do ponto de vista prático, a manipulação do sistema.^{82,87,88}

Nesse sentido, os líquidos iônicos surgiram como uma nova perspectiva, a fim de contornar algumas das desvantagens dos SABs à base de polímeros. Eles compreendem uma família de sais orgânicos e inorgânicos que apresenta baixo ponto de fusão e são líquidos a temperaturas inferiores à 100 °C.⁸⁹ Por apresentarem propriedades físico-químicas fascinantes, como viscosidade relativamente baixa, alta estabilidade térmica, pressão de vapor desprezível, baixa inflamabilidade, além da capacidade e versatilidade de solvatação de vários compostos, ajustando-se à estrutura química de seus cátions e ânions,⁹⁰ tornaram-se interessantes para uma ampla variedade de aplicações. Essas aplicações compreendem o seu uso em catálise, síntese orgânica, eletroquímica, química analítica, extração e processos de separação.⁹¹ A elevada aplicabilidade dos líquidos iônicos permite prever, segundo Lin e colaboradores,⁹² o destaque que esses solventes podem ter em breve no desenvolvimento de um novo sistema de bateria recarregável, proporcionando tempo de carregamento de aproximadamente um minuto.

Na contramão destes pontos positivos está a desconfiança com a elevada toxicidade de alguns líquidos iônicos⁹³ que, adicionado ao custo elevado que alguns deles podem apresentar, tem redirecionado a pesquisa na área no sentido de estabelecer líquidos iônicos que, além de

permitirem a obtenção de SABs com características estratégicas, possam ser aplicados em conformidade com a demanda por uma química “mais verde”.

Neste contexto, destacam-se os líquidos iônicos à base do cátion colina que se caracterizam por apresentarem custo mais baixo e serem mais fáceis de manusear quando comparados aos líquidos iônicos mais comumente empregados (à base de imidazólio, piridínio, pirrolidínio e amônio), além de serem biodegradáveis e não-tóxicos.^{94,95} Desde o primeiro trabalho relatado em 2012,⁵⁹ vários SABs foram desenvolvidos utilizando esses componentes, isto é, sais do cátion 2-hidroxiethyl – *N, N, N* – trimetilamônio combinado com numerosos contra íons. Na figura 1.2 é apresentada a estrutura do cátion colina.

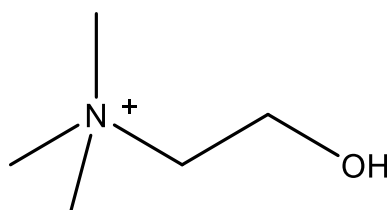


Figura 1.2. Estrutura molecular do cátion colina.

Fonte: Própria autora.

A combinação de líquidos iônicos à base do cátion colina com surfactantes não iônicos, torna ainda mais atrativo os SABs formados por estes compostos. Sabe-se que SABs formados por estes surfactantes apresentam características positivas como baixa tensão interfacial, menor quantidade de eletrólito necessária para induzir a separação de fase, inflamabilidade nula e demanda de menor tempo para separação de fase. Além disso, a capacidade que estes surfactantes possuem de formar agregados micelares quando em solução, proporciona aos SABs que eles constituem o potencial de serem aplicados na extração/purificação de solutos hidrofóbicos.⁹⁶ Estas características despertam a atenção para a relevância do estudo de novos SABs formados pela combinação de surfactantes não-iônicos com os líquidos iônicos à base do cátion colina, atendendo ao apelo pela utilização de compostos ambientalmente amigáveis e possibilitando o desenvolvimento de sistemas não tóxicos e de baixo custo para serem aplicados no setor biotecnológico (purificação de enzimas, solubilização de agentes poluentes, biorremediação e extração de diversos solutos hidrofóbicos).^{97,98}

Neste contexto, estudos de SABs formados por líquidos iônicos à base do cátion colina e surfactantes não iônicos têm recebido destaque especial. Álvarez e colaboradores estudaram a imiscibilidade de SABs formados por Triton X-100 ou Triton X-102 e cloreto de colina em diferentes temperaturas. Nesse estudo, foi observado que a fase inferior era composta majoritariamente por água e líquido iônico enquanto a fase superior era constituída de altas

concentrações de surfactante. Além disso, os autores constataram que tanto o aumento da temperatura dos sistemas quanto a hidrofobicidade do surfactante promoveram o aumento da região bifásica.⁹⁶ Em outro trabalho, Álvarez e colaboradores⁷² demonstraram a capacidade de sistemas aquosos bifásicos formados por Tween 20 e Tween 80 + cloreto de colina + água na remoção de ibuprofeno e diclofenaco de efluentes aquosos.

Xavier e colaboradores⁹⁹ estudaram SABs formados por Tween 20 e dihidrogenocitrato de colina para otimizar a extração de ácido fenólico de soluções aquosas. E recentemente, Kholany e colaboradores¹⁰⁰ investigaram o potencial de extração da violaceína de células *Yarrowia lipolytica* em SABs formados por Tween 20 + líquidos iônicos à base de colina (acetato, dihidrogenofosfato, dihidrogenocitrato, bicarbonato e cloreto de colina) + água. Outros exemplos recentes da aplicação desses sistemas foram relatados por Tian e colaboradores, em que SABs formados por surfactante não iônico (Triton X-100) e líquido iônico à base de colina (acetato de colina, propanoato de colina e butirato de colina) foram obtidos, sendo o sistema TX-100 + acetato de colina + água aplicado à extração de três herbicidas (simetrina, prometrina e atrazina). A influência do ânion e da temperatura sobre os dados de equilíbrio foram investigadas, sendo observado o aumento da região bifásica com a diminuição da cadeia carbônica dos ânions do líquido iônico e com o aumento da temperatura. Além disso, constatou-se que os herbicidas concentraram-se preferencialmente na fase rica em surfactante, indicando o potencial dos sistemas para remoção destes compostos.¹⁰¹

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Na primeira parte desse trabalho, o objetivo geral foi obter e caracterizar novos diagramas de fase de SABs formados por surfactantes não iônicos da família Triton X (Triton X-165 e Triton X-305), líquidos iônicos à base do cátion colina (bitartarato de colina e dihidrogenocitrato de colina) e água.

1.2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos da primeira parte desse trabalho:

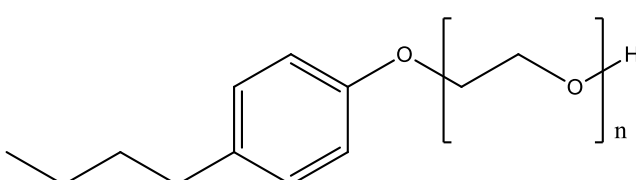
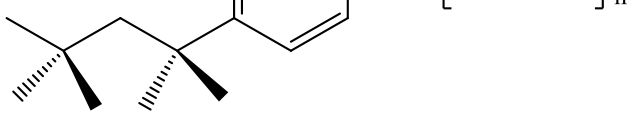
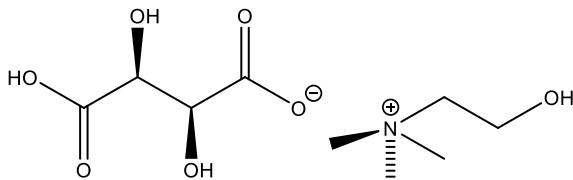
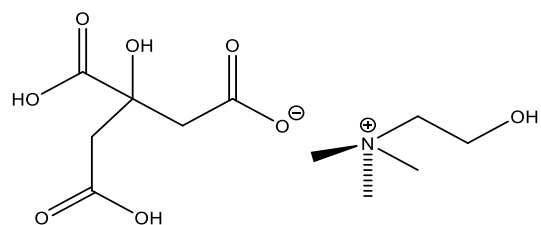
- Obter os diagramas de fase de SABs formados por surfactante Triton X-165, bitartarato de colina e água nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C.
- Obter os diagramas de fase de SABs formados por surfactante Triton X-165, dihidrogenocitrato de colina e água nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C.
- Obter os diagramas de fase de SABs formados por surfactante Triton X-305, bitartarato de colina e água nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C.
- Obter os diagramas de fase de SABs formados por surfactante Triton X-305, dihidrogenocitrato de colina e água nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C.
- Verificar a influência do comprimento da cadeia hidrofílica do surfactante, do ânion formador do sal e da temperatura sobre as propriedades dos sistemas aquosos bifásicos investigados.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho, com suas respectivas estruturas químicas e purezas, são listados na Tabela 1.2. Água deionizada ($1.00 \mu\text{S cm}^{-1}$) foi utilizada em todos os experimentos.

Tabela 1.2. Estruturas químicas e pureza dos reagentes utilizados.

| Reagente ^a | Fórmula estrutural | Pureza |
|--|--|------------------|
| Triton X-165 / n = 16 ^b (TX-165) |  | 70% ^c |
| Triton X-305 / n = 30 ^b (TX-305) |  | 70% ^c |
| Bitartarato de colina (BC) |  | 100% |
| Dihidrogenocitrato de colina (DHCC) |  | 98% |

^a Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich. ^b O índice n representa o número de grupos de óxidos de etileno na cadeia hidrofílica do surfactante; ^c Surfactantes fornecidos na forma de soluções aquosas.

1.3.2 Preparo dos sistemas aquosos bifásicos

Aproximadamente 8 g de cada SAB foram preparados em um tubo de vidro de 12 mL a partir da mistura de solução aquosa de Triton X (TX-165 ou TX-305), solução aquosa de líquido iônico (bitartarato de colina ou dihidrogenocitrato de colina) e água, em proporção previamente definida para obter as composições globais desejadas. Essas proporções foram estabelecidas a partir das composições globais de sistemas que levariam à formação de duas fases em equilíbrio termodinâmico, as quais foram estimadas a partir da obtenção de uma curva de titulação

turbidimétrica que fornece o limite entre as composições do sistema que levam a sistemas bifásicos ou a sistemas monofásicos.⁶⁰ No mínimo quatro composições globais diferentes foram preparadas para cada combinação surfactante-líquido iônico, nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C, sendo o número de composições globais definido pelos fatores de limite de solubilidade dos componentes do SAB ou tamanho reduzido da região bifásica do sistema. Os tubos contendo as misturas dos componentes foram agitados em um vórtex (Tecnal AP-56) durante 3 min. Após esta etapa, os sistemas foram deixados em repouso, por no mínimo 72 h, em um banho termostático (MA184, Marconi, incerteza de $\pm 0,1$ °C) na temperatura desejada até atingir o equilíbrio de fases, o qual foi definido pela presença de duas fases bem distintas e límpidas. Depois disto, alíquotas da fase superior e a fase inferior foram separadamente coletadas, diluídas quando necessário, e analisadas para quantificação dos componentes. Cada SAB em determinada composição foi preparado em duplicata.

1.3.3 Quantificação das fases

A quantificação dos líquidos iônicos em cada fase foi realizada utilizando um condutivímetro (Gehaka CG 1800, com incerteza de $\pm 0,05$ %). Curvas de calibração foram preparadas usando água deionizada como solvente, com a concentração de líquido iônico variando de $2,5 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-2}$ % (m/m), para a determinação da concentração de bitartarato de colina ou dihidroxicitrato de colina nas fases diluídas.

A quantificação do surfactante foi realizada utilizando um espectrômetro de absorção molecular na região do UV-Vis (Shimadzu UV-1800). Os espectros de absorção molecular das fases diluídas foram similares àqueles de soluções aquosas de surfactante. O comprimento de onda de absorção máxima para ambos os surfactantes foi 275 nm. Curvas de calibração foram preparadas usando água como solvente, com concentração de surfactante variando de $7,0 \times 10^{-4}$ a $6,0 \times 10^{-2}$ % (m/m), para a determinação da concentração de TX-165 e TX-305 nas fases diluídas.

A possibilidade de influência na análise da quantificação de um componente devido a presença do outro foi descartada a partir da realização da quantificação de amostras padrões contendo concentrações conhecidas dos componentes. Erros relativos associados a esses testes foram menores do que 2,5%.

Os experimentos foram realizados em duplicata e as incertezas das composições de líquido iônico e surfactante foram de 0,40% (w/w) e 0,95% (w/w), respectivamente. A porcentagem mássica de água em cada fase foi determinada a partir de balanço de massa, conforme expresso pela equação 1.3.

$$w_w = 100 - w_{Surf} - w_{LI} \quad (1.3)$$

em que w_{Surf} e w_{LI} são as concentrações, em % (m/m), do surfactante e do líquido iônico na fase, respectivamente. A incerteza da composição da água por esse método foi de 0,98% (w/w). Para cada composição global avaliada, o comprimento (CLA) e a inclinação (ILA) da linha de amarração foram determinados de acordo com as equações 1.1 e 1.2, respectivamente, em que pode-se considerar o surfactante como o componente 1 e o líquido iônico como o componente 2.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

1.4.1 Dados de equilíbrio líquido-líquido

Soluções aquosas de surfactantes Triton X são conhecidas por exibirem o fenômeno do ponto de nuvem, tornando-os capazes de formar sistemas aquosos bifásicos na ausência de outro componente formador de fase. Tanto para TX-165 quanto TX-305, os pontos de nuvem são superiores a 100 °C (estimados experimentalmente) e, portanto, a presença de líquido iônico foi necessária para promover a separação de fases nas temperaturas avaliadas.

As tabelas 1.3–1.6 apresentam os dados de equilíbrio líquido-líquido experimental, expressos em porcentagem mássica, para os SABs formados por Triton X (TX-165 ou TX-305) + líquido iônico (bitartarato de colina ou dihidrogenocitrato de colina) + água nas temperaturas de 25,0, 40,0 e 55,0 °C. Para SABs formados por dihidrogenocitrato de colina nas temperaturas de 25,0 e 40,0 °C apenas quatro linhas de amarração foram obtidas em virtude da limitação de solubilidade deste líquido iônico.

De forma geral, para todas as condições termodinâmicas investigadas, os SABs avaliados apresentaram a fase superior enriquecida em surfactante e a fase inferior enriquecida em líquido iônico. Esse comportamento foi semelhante àquele relatado por Escudero e colaboradores¹⁰² para SAB formado por Triton X-100 (ou Triton X-102) + dihidrogenocitrato de colina + água, mas diferiu daquele reportado por Silva e colaboradores¹² para SAB formado por surfactante Triton X (TX-100, TX-165 ou TX-305) + cloreto de colina + água. Neste caso, a fase superior foi enriquecida em líquido iônico e a fase inferior em surfactante para a maioria das composições globais investigadas.

À medida que a composição global do sistema aumentou houve um aumento no valor do CLA, diretamente associado à mudança relativa das composições das fases em equilíbrio. Com o aumento do CLA, a concentração de surfactante aumentou na fase superior e permaneceu praticamente constante e muito baixa na fase inferior. Ao mesmo tempo, ocorreu uma diminuição da concentração de líquido iônico na fase superior e um aumento desta na fase inferior. Além disso, a concentração de água diminuiu em ambas as fases, sendo esta diminuição mais pronunciada na fase superior do que na fase inferior.

Tabela 1.3. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-165 (w_{TX}) + bitartrato de colina (w_{BC}) + água (w_w) em diferentes temperaturas.

| LA ^a | CLA ^b | Composição global | | | Fase superior | | | Fase inferior | | |
|-----------------|------------------|-------------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|
| | | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w |
| 25,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 47,72 | 22,75 | 29,25 | 48,00 | 40,75 | 17,69 | 41,56 | 0,10 | 42,69 | 57,21 |
| 2 | 58,19 | 25,00 | 31,00 | 44,00 | 49,11 | 14,10 | 36,79 | 0,02 | 45,34 | 54,64 |
| 3 | 67,30 | 27,00 | 32,50 | 40,50 | 56,85 | 11,67 | 31,48 | 0,03 | 47,74 | 52,23 |
| 4 | 75,92 | 28,99 | 34,01 | 37,00 | 64,60 | 10,79 | 24,61 | 0,07 | 50,79 | 49,14 |
| 5 | 86,32 | 31,00 | 35,50 | 33,50 | 72,55 | 9,25 | 18,20 | 0,02 | 56,06 | 43,92 |
| 40,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 37,65 | 24,50 | 22,50 | 53,00 | 35,32 | 17,45 | 47,23 | 1,16 | 33,27 | 65,57 |
| 2 | 58,46 | 27,00 | 24,50 | 48,50 | 51,92 | 12,29 | 35,79 | 0,12 | 39,39 | 60,49 |
| 3 | 69,13 | 29,50 | 26,50 | 44,00 | 61,68 | 11,21 | 27,11 | 0,05 | 42,53 | 57,42 |
| 4 | 78,63 | 32,00 | 28,50 | 39,50 | 69,22 | 9,62 | 21,16 | 0,03 | 47,00 | 52,96 |
| 5 | 85,83 | 34,46 | 30,46 | 35,08 | 74,66 | 8,29 | 17,05 | 0,03 | 50,68 | 49,29 |
| 55,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 41,09 | 26,50 | 18,00 | 55,50 | 38,14 | 13,59 | 48,27 | 0,53 | 30,13 | 69,34 |
| 2 | 55,65 | 27,99 | 20,01 | 52,00 | 51,32 | 10,73 | 37,95 | 0,22 | 32,76 | 67,02 |
| 3 | 65,09 | 29,50 | 22,00 | 48,50 | 59,27 | 9,40 | 31,33 | 0,07 | 36,47 | 63,46 |
| 4 | 74,46 | 31,00 | 24,00 | 45,00 | 67,22 | 8,26 | 24,52 | 0,04 | 40,37 | 59,59 |
| 5 | 81,12 | 32,50 | 26,00 | 41,50 | 75,85 | 7,59 | 19,56 | 0,04 | 43,36 | 56,60 |

^a Linha de amarração; ^b comprimento da linha de amarração, em % (m/m), foi calculado de acordo com a equação (1.1). Incertezas padrões: $u(T) = 0,1$ °C, $u(w_{TX(FS)}) = 1,17\%$ (w/w), $u(w_{TX(FI)}) = 0,03\%$ (w/w), $u(w_{BC(FS)}) = 0,17\%$ (w/w), $u(w_{BC(FI)}) = 0,38\%$ (w/w), $u(w_w(FS)) = 1,19\%$ (w/w), $u(w_w(FI)) = 0,37\%$ (w/w).

Tabela 1.4. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-165 (w_{TX}) + dihidroxicitrato de colina (w_{DHCC}) + água (w_w) em diferentes temperaturas.

| LA ^a | CLA ^b | Composição global | | | Fase superior | | | Fase inferior | | |
|-----------------|------------------|-------------------|----------------|-----------|---------------|----------------|-----------|---------------|----------------|-----------|
| | | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w |
| 25,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 55,22 | 30,00 | 33,50 | 36,50 | 46,79 | 22,85 | 30,36 | 0,26 | 52,58 | 47,16 |
| 2 | 69,69 | 32,01 | 35,01 | 33,00 | 58,36 | 19,02 | 22,62 | 0,09 | 57,25 | 42,66 |
| 3 | 76,88 | 33,75 | 36,23 | 30,02 | 64,70 | 17,98 | 17,32 | 0,14 | 59,72 | 40,14 |
| 4 | 84,13 | 35,79 | 37,64 | 26,57 | 71,44 | 16,71 | 11,85 | 0,13 | 61,35 | 38,52 |
| 40,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 52,97 | 27,99 | 32,00 | 40,01 | 45,78 | 21,61 | 32,61 | 0,27 | 48,71 | 51,02 |
| 2 | 64,10 | 30,00 | 33,49 | 36,51 | 55,66 | 18,90 | 25,44 | 0,10 | 50,87 | 49,03 |
| 3 | 75,73 | 32,00 | 35,01 | 32,99 | 65,51 | 16,92 | 17,57 | 0,04 | 54,98 | 44,98 |
| 4 | 83,64 | 34,00 | 36,50 | 29,50 | 72,05 | 15,60 | 12,35 | 0,03 | 58,14 | 41,83 |
| 55,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 51,23 | 24,00 | 29,00 | 47,00 | 46,99 | 19,38 | 33,63 | 0,53 | 40,97 | 58,50 |
| 2 | 62,16 | 26,01 | 30,52 | 43,47 | 55,65 | 17,05 | 27,30 | 0,11 | 44,97 | 54,92 |
| 3 | 69,39 | 28,00 | 32,00 | 40,00 | 61,38 | 15,60 | 23,02 | 0,11 | 48,17 | 51,72 |
| 4 | 76,34 | 30,00 | 33,50 | 36,50 | 67,32 | 14,66 | 18,02 | 0,13 | 50,91 | 48,96 |
| 5 | 84,68 | 32,01 | 35,01 | 32,98 | 74,26 | 13,48 | 12,26 | 0,11 | 54,37 | 45,52 |

^a Linha de amarração; ^b comprimento da linha de amarração, em % (m/m), foi calculado de acordo com a equação (1.1). Incertezas padrões: $u(T) = 0,1$ °C, $u(w_{TX(FS)}) = 0.73\%$ (w/w), $u(w_{TX(FI)}) = 0.10\%$ (w/w), $u(w_{DHCC(FS)}) = 0.23\%$ (w/w), $u(w_{DHCC(FI)}) = 0.44\%$ (w/w), $u(w_w(FS)) = 0.71\%$ (w/w), $u(w_w(FI)) = 0.51\%$ (w/w).

Tabela 1.5. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-305 (w_{TX}) + bitartarato de colina (w_{BC}) + água (w_w) em diferentes temperaturas.

| LA ^a | CLA ^b | Composição global | | | Fase superior | | | Fase inferior | | |
|-----------------|------------------|-------------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|
| | | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{BC} | 100 w_w |
| 25,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 43,44 | 30,00 | 23,00 | 47,00 | 36,30 | 17,31 | 46,39 | 0,14 | 41,38 | 58,48 |
| 2 | 55,70 | 32,00 | 25,00 | 43,00 | 46,99 | 14,82 | 38,19 | 0,05 | 44,80 | 55,15 |
| 3 | 63,47 | 34,00 | 27,00 | 39,00 | 53,21 | 12,79 | 34,00 | 0,03 | 47,43 | 52,54 |
| 4 | 72,88 | 36,00 | 29,00 | 35,00 | 60,38 | 11,43 | 28,19 | 0,02 | 52,28 | 47,70 |
| 5 | 87,31 | 37,00 | 32,05 | 30,95 | 74,27 | 9,72 | 16,01 | 0,06 | 55,73 | 44,21 |
| 40,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 40,46 | 24,50 | 22,50 | 53,00 | 36,30 | 16,43 | 47,27 | 0,48 | 35,24 | 64,28 |
| 2 | 52,63 | 27,00 | 24,50 | 48,50 | 46,03 | 13,80 | 40,17 | 0,30 | 39,85 | 59,85 |
| 3 | 63,97 | 29,49 | 26,51 | 44,00 | 55,92 | 12,15 | 31,93 | 0,05 | 43,31 | 56,64 |
| 4 | 73,33 | 32,00 | 28,50 | 39,50 | 63,09 | 10,76 | 26,15 | 0,03 | 48,18 | 51,79 |
| 5 | 83,92 | 34,46 | 30,47 | 35,07 | 72,66 | 9,60 | 17,74 | 0,02 | 51,62 | 48,36 |
| 55,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 39,27 | 22,00 | 20,00 | 58,00 | 36,62 | 14,48 | 48,90 | 0,71 | 30,37 | 68,92 |
| 2 | 54,91 | 25,00 | 22,50 | 52,50 | 49,54 | 11,48 | 38,98 | 0,16 | 35,50 | 64,34 |
| 3 | 62,86 | 28,00 | 25,00 | 47,00 | 54,80 | 10,20 | 35,00 | 0,06 | 41,10 | 58,84 |
| 4 | 70,49 | 30,98 | 27,52 | 41,50 | 61,02 | 9,61 | 29,37 | 0,05 | 44,98 | 54,97 |
| 5 | 84,36 | 34,00 | 30,00 | 36,00 | 72,99 | 7,80 | 19,21 | 0,04 | 50,17 | 49,79 |

^a Linha de amarração; ^b comprimento da linha de amarração, em % (m/m), foi calculado de acordo com a equação (1.1). Incertezas padrões: $u(T) = 0,1$ °C, $u(w_{TX(FS)}) = 1,41\%$ (w/w), $u(w_{TX(FI)}) = 0,09\%$ (w/w), $u(w_{BC(FS)}) = 0,26\%$ (w/w), $u(w_{BC(FI)}) = 0,58\%$ (w/w), $u(w_w(FS)) = 1,24\%$ (w/w), $u(w_w(FI)) = 0,61\%$ (w/w).

Tabela 1.6. Dados de equilíbrio líquido-líquido em % (m/m), para o sistema Triton X-305 (w_{TX}) + dihidroxicitrato de colina (w_{DHCC}) + água (w_w) em diferentes temperaturas.

| LA ^a | CLA ^b | Composição global | | | Fase superior | | | Fase inferior | | |
|-----------------|------------------|-------------------|----------------|-----------|---------------|----------------|-----------|---------------|----------------|-----------|
| | | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w | 100 w_{TX} | 100 w_{DHCC} | 100 w_w |
| 25,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 42,32 | 28,50 | 32,00 | 39,50 | 35,66 | 26,93 | 37,41 | 0,34 | 50,24 | 49,42 |
| 2 | 53,82 | 30,00 | 33,50 | 36,50 | 43,66 | 23,07 | 33,27 | 0,08 | 54,65 | 45,27 |
| 3 | 62,59 | 32,01 | 35,01 | 32,98 | 50,33 | 21,30 | 28,37 | 0,05 | 58,57 | 41,38 |
| 4 | 72,73 | 33,75 | 36,23 | 36,50 | 59,27 | 19,91 | 23,43 | 0,06 | 62,14 | 37,80 |
| 40,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 34,51 | 26,01 | 30,51 | 43,48 | 31,67 | 27,13 | 41,20 | 1,71 | 44,25 | 54,04 |
| 2 | 51,84 | 27,98 | 32,02 | 40,00 | 44,59 | 22,44 | 32,97 | 0,14 | 49,11 | 50,75 |
| 3 | 61,90 | 30,00 | 33,50 | 36,50 | 52,53 | 19,99 | 27,48 | 0,10 | 52,89 | 47,01 |
| 4 | 66,69 | 32,01 | 35,01 | 32,98 | 55,76 | 18,93 | 25,31 | 0,10 | 55,67 | 44,23 |
| 55,0 °C | | | | | | | | | | |
| 1 | 46,47 | 23,99 | 29,00 | 47,01 | 39,49 | 19,59 | 40,92 | 0,39 | 44,71 | 54,90 |
| 2 | 53,86 | 26,01 | 30,51 | 43,48 | 45,23 | 18,62 | 36,15 | 0,08 | 47,98 | 51,94 |
| 3 | 62,99 | 28,00 | 32,00 | 40,00 | 53,20 | 17,94 | 28,86 | 0,07 | 51,77 | 48,16 |
| 4 | 69,57 | 30,00 | 33,50 | 36,50 | 59,59 | 16,98 | 23,43 | 0,07 | 53,01 | 46,92 |
| 5 | 77,81 | 32,01 | 35,01 | 32,98 | 66,60 | 16,11 | 17,29 | 0,06 | 56,44 | 43,50 |

^a Linha de amarração; ^b comprimento da linha de amarração, em % (m/m), foi calculado de acordo com a equação (1.1). Incertezas padrões: $u(T) = 0,1$ °C, $u(w_{TX(FS)}) = 1.81\%$ (w/w), $u(w_{TX(FI)}) = 0.11\%$ (w/w), $u(w_{DHCC(FS)}) = 0.31\%$ (w/w), $u(w_{DHCC(FI)}) = 0.63\%$ (w/w), $u(w_w(FS)) = 1.76\%$ (w/w), $u(w_w(FI)) = 0.61\%$ (w/w).

1.4.2 Efeito da temperatura

A mudança na temperatura de um SAB geralmente apresenta grande influência sobre as propriedades de miscibilidade dos componentes formadores do sistema, tendo como consequência alterações nas concentrações dos componentes nas fases que coexistem em equilíbrio.¹⁰³ Em SABs formados por surfactantes, esse efeito pode ser ainda mais pronunciado em virtude da grande influência que a temperatura pode apresentar sobre as propriedades destes compostos. A Figura 1.3 apresenta o efeito da temperatura sobre o diagrama de fases do SAB TX-165 + bitartarato de colina + água a 25,0, 40,0 e 55,0 °C.

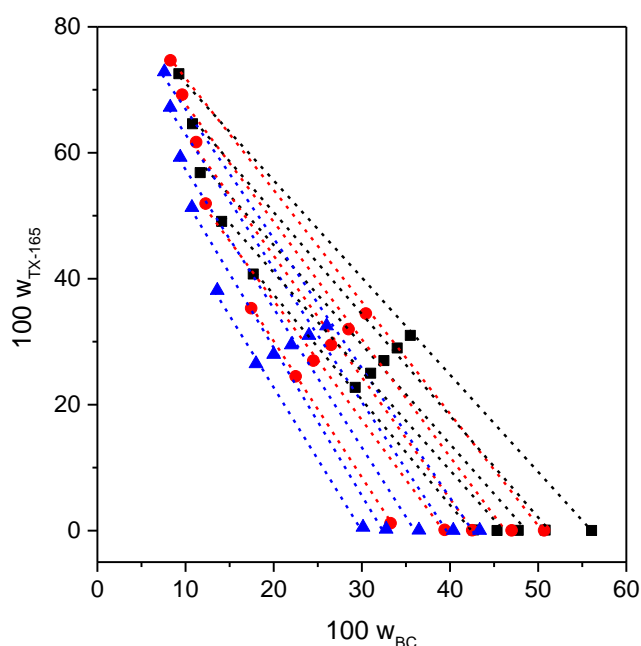


Figura 1.3. Efeito da temperatura sobre a região bifásica do SAB formado por TX-165 + bitartarato de colina + água: (◆) 25,0 °C; (●) 40,0 °C e (▲) 55,0 °C.

A partir da análise da figura 1.3, o aumento da temperatura resultou em uma maior região bifásica do sistema. Isso também é evidenciado pelo aumento do CLA associado a uma mesma composição global de um SAB com o aumento da temperatura (Tabelas 1.3-1.6). Esse resultado indica que o processo de separação de fases foi endotérmico e, consequentemente, dirigido entropicamente.¹⁰⁴ Esse mesmo comportamento foi observado para os demais SABs investigados neste trabalho, assim como para outros SABs formados por surfactantes da família Triton X com diferentes eletrólitos,^{105,106} e, em particular, para SABs formados por TX-165 e TX-305 com o líquido iônico cloreto de colina.¹² Esses resultados corroboram com a hipótese de que o efeito da temperatura sobre as propriedades das fases dos SABs formados por Triton

X está associado à influência da temperatura sobre o balanço hidrofóbico-hidrofílico das interações que determinam a hidratação do surfactante, essencialmente associado com o estabelecimento de ligações de hidrogênio entre o surfactante e a água.¹⁰⁷

O aumento da temperatura causa o desfavorecimento na formação das ligações de hidrogênio entre moléculas de água estruturadas ao redor da região hidrofóbica do surfactante, contribuindo para diminuição do seu caráter hidrofóbico. Ao mesmo tempo, o aumento da temperatura leva ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio entre moléculas de água e as cadeias de óxido de etileno do surfactante, contribuindo para um aumento do seu caráter hidrofóbico. Conseqüentemente, o balanço entre esses dois efeitos determina maior ou menor caráter hidrofóbico do surfactante. Desde que ocorreu o aumento da região bifásica com o aumento da temperatura, é esperado que a influência da temperatura tenha sido maior sobre as ligações de hidrogênio entre moléculas de água e a região hidrofílica do surfactante, resultando em uma diminuição do grau de hidratação da sua porção hidrofílica. De fato, a influência da temperatura sobre ligações de hidrogênio entre moléculas de água ao redor de regiões hidrofóbicas do surfactante deve ser pequena, pois a maior fração da porção hidrofóbica do surfactante está oculta no núcleo das micelas de surfactante.

Além do aumento do tamanho da região bifásica, o aumento da temperatura promove a mudança relativa das composições das fases que se encontram em equilíbrio. Essa mudança é evidente quando comparamos as composições das fases em equilíbrio que estão associadas a uma mesma composição global de um SAB em temperaturas diferentes. Por exemplo, para o SAB TX-165 + dihidrogenocitrato de colina + água cuja composição global é 32,01 % (m/m) de surfactante e 35,01 % (m/m) de líquido iônico (Tabela 1.4), pode-se verificar que o aumento da temperatura promoveu, na fase superior, o aumento da concentração de surfactante (de 58,36 % (m/m) a 25,0 °C para 74,26 % (m/m) a 55,0 °C) e a diminuição das concentrações de água (de 22,62 % (m/m) a 25,0 °C para 12,26 % (m/m) a 55,0 °C) e líquido iônico (de 19,02 % (m/m) a 25,0 °C para 13,48 % (m/m) a 55,0 °C). Ao mesmo tempo, na fase inferior, ocorreu uma pequena redução da concentração de líquido iônico (de 57,25 % (m/m) a 25,0 °C para 54,37 % (m/m) a 55,0 °C) e um pequeno aumento na concentração de água (de 42,66 % (m/m) a 25,0 °C para 45,52 % (m/m) a 55,0 °C), enquanto a concentração de surfactante praticamente não foi alterada. Esses resultados indicaram que o aumento da temperatura promoveu a transferência de moléculas de água da fase superior para a fase inferior, em acordo com a hipótese de que o caráter hidrofóbico do surfactante foi aumentado quando a temperatura aumentou. Em adição, as moléculas de água que foram transferidas da fase superior para a fase inferior carregaram consigo íons do líquido iônico, ou de outra forma, a concentração de líquido iônico na fase superior deveria ter aumentado. Por fim, em função dos fenômenos ocorridos, pode ser

observado na Figura 1.3 que houve um aumento das inclinações das linhas de amarração quando a temperatura aumentou, o que corrobora com o aumento elevado da concentração de surfactante na fase superior influenciado principalmente pelo aumento do seu caráter hidrofóbico. As Tabelas 1.7 e 1.8 apresentam os valores de inclinação da linha de amarração (ILA) para os SABs TX-165 + bitartarato de colina + água, TX-305 + bitartarato de colina + água, TX-165 + dihidrogenocitrato de colina + água e TX-305 + dihidrogenocitrato de colina + água, nas diferentes temperaturas avaliadas. Para todos os sistemas avaliados, os valores reportados confirmam um aumento no módulo do valor de ILA à medida que a temperatura aumenta. Além disso, os valores de ILA variam com o aumento do CLA, indicando que as linhas de amarração também não são paralelas.

Tabela 1.7. Coeficientes de determinação (R^2) e inclinações das linhas de amarração (ILA) para SABs formados por TX-165 + líquido iônico + água em diferentes temperaturas.*

| CLA / % (m/m) | R^2 | ILA | CLA / % (m/m) | R^2 | ILA |
|------------------|--------|---------|------------------|--------|---------|
| BC | | | DHCC | | |
| 25,0 °C | | | | | |
| 47,72 | 0,9990 | -1,6260 | 55,22 | 0,9999 | -1,5651 |
| 58,19 | 0,9934 | -1,5714 | 69,69 | 0,9969 | -1,5242 |
| 67,30 | 0,9928 | -1,5753 | 76,88 | 0,9952 | -1,5467 |
| 75,92 | 0,9978 | -1,6132 | 84,13 | 0,9974 | -1,5974 |
| 86,32 | 0,9996 | -1,5494 | 55,22 | 0,9999 | -1,5651 |
| 40,0 °C | | | | | |
| 37,65 | 0,9999 | -2,1593 | 52,97 | 0,9999 | -1,6793 |
| 58,46 | 0,9975 | -1,9114 | 64,10 | 0,9999 | -1,7379 |
| 68,75 | 0,9969 | -1,9677 | 75,73 | 0,9964 | -1,7202 |
| 78,64 | 0,9971 | -1,8507 | 83,64 | 0,9963 | -1,6930 |
| 85,83 | 0,9994 | -1,7605 | 52,97 | 0,9999 | -1,6793 |
| 55,0 °C | | | | | |
| 41,09 | 0,9956 | -2,2739 | 51,23 | 0,9936 | -2,1519 |
| 55,65 | 0,9967 | -2,3196 | 62,16 | 0,9929 | -1,9892 |
| 65,09 | 0,9963 | -2,1869 | 69,39 | 0,9954 | -1,8812 |
| 74,46 | 0,9936 | -2,0922 | 76,34 | 0,9966 | -1,8835 |
| 81,12 | 0,9959 | -2,0355 | 84,68 | 0,9950 | -1,8134 |

* R^2 é o coeficiente de determinação da regressão linear dos dados de composição global e composição das fases em equilíbrio.

Tabela 1.8. Coeficientes de determinação (R^2) e inclinações das linhas de amarração (ILA) para SABs formados por TX-305 + líquido iônico + água em diferentes temperaturas.*

| CLA / % (m/m) | R^2 | ILA | CLA / % (m/m) | R^2 | ILA |
|------------------|--------|---------|------------------|--------|---------|
| BC | | | DHCC | | |
| 25,0 °C | | | | | |
| 43,44 | 0,9918 | -1,5023 | 42,32 | 0,9995 | -1,5152 |
| 55,70 | 0,9990 | -1,5657 | 53,82 | 0,9993 | -1,3800 |
| 63,47 | 0,9939 | -1,5352 | 62,59 | 0,9999 | -1,3491 |
| 72,88 | 0,9982 | -1,4776 | 72,73 | 0,9948 | -1,4021 |
| 87,31 | 0,9992 | -1,6129 | - | - | - |
| 40,0 °C | | | | | |
| 40,46 | 0,9999 | -1,9043 | 34,51 | 0,9998 | -1,7500 |
| 52,63 | 0,9999 | -1,7555 | 51,84 | 0,9995 | -1,6667 |
| 63,97 | 0,9996 | -1,7930 | 61,90 | 0,9990 | -1,5936 |
| 73,33 | 0,9990 | -1,6852 | 66,69 | 0,9997 | -1,5150 |
| 83,92 | 0,9977 | -1,7287 | - | - | - |
| 55,0 °C | | | | | |
| 39,27 | 0,9908 | -2,2599 | 46,47 | 0,9988 | -1,5565 |
| 54,91 | 0,9961 | -2,0558 | 53,86 | 0,9987 | -1,5378 |
| 62,86 | 0,9997 | -1,7715 | 62,99 | 0,9899 | -1,5705 |
| 70,49 | 0,9995 | -1,7238 | 69,77 | 0,9960 | -1,6519 |
| 84,36 | 0,9997 | -1,7217 | 77,81 | 0,9930 | -1,6499 |

* R^2 é o coeficiente de determinação da regressão linear dos dados de composição global e composição das fases em equilíbrio.

1.4.3 Efeito do ânion do líquido iônico

O cátion colina é comum em todos os SABs investigados neste trabalho. Portanto, a capacidade de indução de separação de fases dos diferentes ânions que os constituem pode ser comparada. A figura 1.4 apresenta o efeito da natureza do ânion sobre o tamanho da região bifásica nos diagramas de fase para os SABs TX-165 + líquido iônico + água e TX-305 + líquido iônico + água, a 55,0 °C. Os dados de equilíbrio para o sistema formado pelos mesmos surfactantes e o líquido iônico cloreto de colina (CC), reportados por Silva e colaboradores,¹² também são apresentados. As concentrações do líquido iônico (C_{IL}) e do surfactante (C_{TX}) são expressas em mol kg⁻¹ uma vez que os líquidos iônicos avaliados possuem massas molares diferentes.

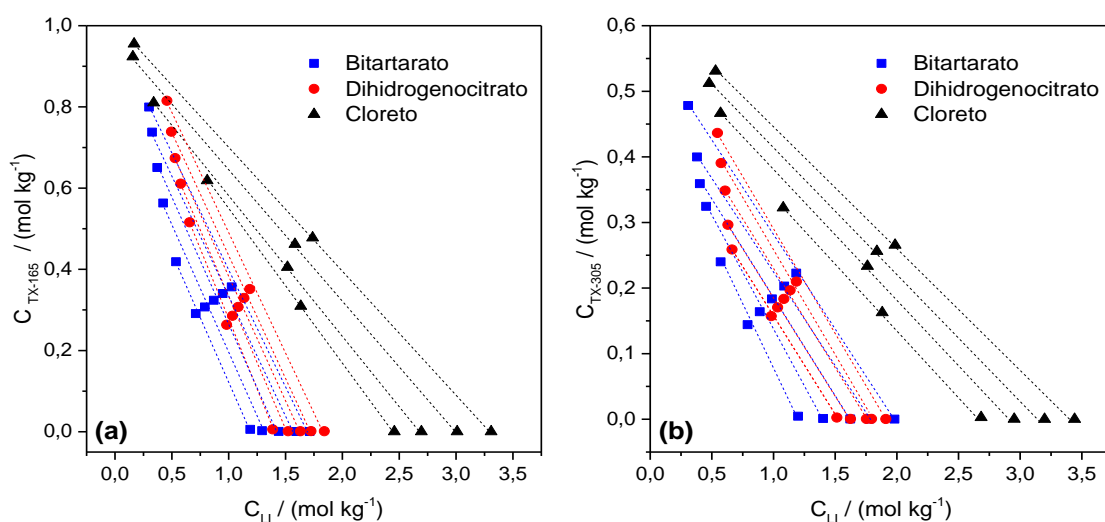


Figura 1.4. Efeito do ânion do líquido iônico sobre o comportamento de fase de SABs formados por (a) TX-165 + líquido iônico (BC, DHCC ou CC) + água e (b) TX-305 + líquido iônico (BC, DHCC ou CC) + água, a 55,0 °C. Dados de equilíbrio para o SAB formado por cloreto de colina foram retirados a partir do trabalho de Silva e colaboradores.¹²

Todos os SABs formados pelo ânion bitartarato apresentaram a maior região bifásica e o potencial de segregação de fases entre os diferentes ânions investigados seguiu a ordem bitartarato > dihidrogenocitrato >> cloreto. Esse resultado é similar àquele verificado em SABs formados por tetrahydrofurano e os mesmos líquidos iônicos avaliados neste trabalho, podendo ser atribuído às diferentes capacidades daqueles ânions para formar complexos de hidratação e induzir um efeito *salting out* no surfactante.¹⁰⁸

Em geral, ânions com densidades de carga elevada são mais fortemente hidratados e apresentam maior caráter hidrofílico do que ânions com baixa densidade de carga. Quando em soluções aquosas de surfactantes como TX-165 e TX-305, aqueles ânions podem contribuir com a exclusão desses compostos hidrofóbicos para uma nova fase líquida, levando à formação de um SAB. O tamanho da região de imiscibilidade do SAB formado será maior quanto maior for a habilidade do ânion em formar complexos de hidratação.^{109,110} Comparado ao ânion dihidrogenocitrato, o bitartarato deve ser o mais fortemente hidratado, resultado de uma elevada polaridade proveniente dos grupos carboxílicos/carboxilatos e hidroxilas distribuídos em uma cadeia carbônica mais curta, os quais são capazes de interagir com as moléculas de água por meio de interações do tipo íon-dipolo e ligações de hidrogênio. Conseqüentemente, o bitartarato apresenta uma densidade de carga mais elevada e um maior efeito *salting out*, levando à segregação de duas fases em menores concentrações dos componentes do sistema.¹¹¹ A mesma conclusão é obtida considerando que uma porção dos íons bitartarato e dihidrogenocitrato está desprotonada, levando à formação das respectivas espécies bivalentes. É mais provável que essa situação ocorra, pois significaria uma maior densidade de carga nessas espécies em relação ao ânion cloreto, o qual induziu a segregação de fases em uma concentração muito maior dos

componentes do sistema. Além disso, é pouco provável que o ânion dihidrogenocitrato esteja completamente desprotonado, formando um ânion trivalente, devido a este ser proveniente de um ácido fraco com baixos valores de constante de ionização. Considerando-se os valores de pKa para o ácido cítrico ($pK_{a1} = 3.15$, $pK_{a2} = 4.77$ e $pK_{a3} = 6.40$)¹¹² e para o ácido tartárico ($pK_{a1} = 3.04$, $pK_{a2} = 4.34$)¹¹³, poderíamos inferir que o pH das fases dos sistemas estudados varia entre 4.5 a 5.0. No entanto, em virtude da controversa existente sobre a confiabilidade de medidas de pH realizadas em sistemas com forças iônicas tão elevadas como é o caso dos SABs propostos neste trabalho, optamos por não realizar as medidas de pH das fases.

1.4.4 Efeito do surfactante

Em SABs formados por surfactantes, é esperado que a hidrofobicidade do surfactante influencie o processo de segregação de fases do sistema, o qual é usualmente associado ao balanço hidrofílico-lipofílico do surfactante. A figura 1.5a apresenta o efeito da mudança do surfactante nos diagramas de fase formados por Triton X (TX-165 ou TX-305) + bitartarato de colina + água, a 40,0 °C. Na figura 1.5b é apresentado o mesmo efeito em SABs formados com dihidrogenocitrato de colina a 40,0 °C, em que os dados de binodais para sistemas formados por TX-100 e TX-102, obtidos por Escudero e colaboradores,¹⁰² são também apresentados. As concentrações do líquido iônico (C_{LI}) e do surfactante (C_{TX}) são expressas em mol kg⁻¹ uma vez que os surfactantes possuem massas molares distintas.

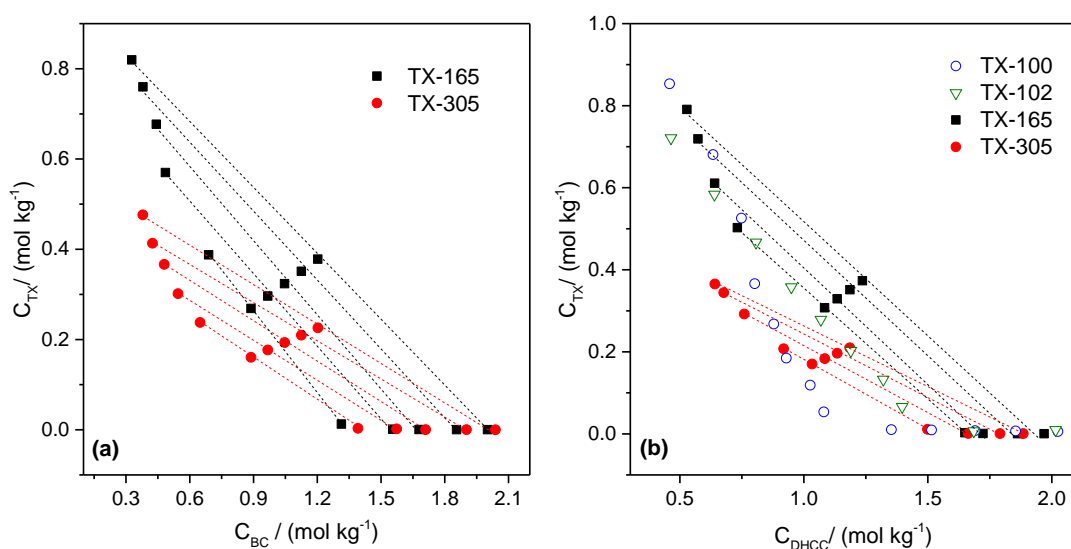


Figura 1.5. Efeito da hidrofobicidade do surfactante sobre o comportamento de fase dos SABs formados por (a) Surfactante (TX-165 ou TX-305) + bitartarato de colina + água e (b) Surfactante (TX-100, TX-102, TX-165 ou TX-305) + dihidrogenocitrato de colina + água, a 40,0 °C. Dados de equilíbrio do SAB TX-100 (ou TX-102) + dihidrogenocitrato de colina + água foram obtidos do trabalho de Escudero e colaboradores.¹⁰²

Na presença de ambos os líquidos iônicos investigados, o surfactante TX-305 foi mais eficiente para induzir a separação de fases que o surfactante TX-165, indicando que a maior hidrofilicidade do surfactante resultou em uma maior região bifásica. Este resultado foi o mesmo para as demais temperaturas investigadas. Surpreendentemente, este resultado é diferente daquele comumente reportado na literatura, no qual um aumento da hidrofobicidade do surfactante resulta em um aumento da região bifásica do SAB.^{13,114} Quando os surfactantes TX-102 e TX-100 são incluídos nessa análise (Figura 1.5b), observa-se que a região de imiscibilidade diminui na ordem TX-100 > TX-305 > TX-102 \approx TX-165, sugerindo que um balanço de diferentes contribuições, e não apenas a hidrofobicidade do surfactante, deve estar definindo este comportamento.

O aumento do equilíbrio hidrofílico-lipofílico do surfactante tende a promover uma diminuição da região bifásica do SAB. Portanto, se este fosse o único fator responsável pelo tamanho da região bifásica, o SAB formado por TX-305 deveria ser aquele com a menor região de imiscibilidade (valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico para os surfactantes TX-100, TX-102, TX-165 e TX-305 são 13,4, 14,4, 15,5 e 17,3, respectivamente). Sob este aspecto, apesar do EHL do surfactante contribuir para uma mudança no comportamento de fase dos sistemas, este parâmetro não deve ser utilizado de forma isolada para avaliar o efeito da hidrofobicidade do surfactante. Em virtude de sua maior cadeia de poli(óxido de etileno), o surfactante TX-305 é aquele que apresenta a maior massa molar dentre os surfactantes avaliados e um aumento na massa molar é reconhecido promover um aumento da região bifásica do SAB.¹¹⁵ Nesse caso, um aumento da cadeia de poli(óxido de etileno) do Triton X leva à uma diminuição da entropia configuracional da solução, reduzindo a contribuição de $\Delta_{\text{mix}}S$ para a variação de energia livre de Gibbs de mistura e fazendo com que o processo de separação de fases ocorra em concentrações mais baixas dos constituintes do SAB.¹¹⁶ Portanto, um balanço entre a hidrofobicidade e a massa molar do surfactante determinam o comportamento observado.

1.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram obtidos novos dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas aquosos bifásicos formados por surfactantes não iônicos da família Triton X (TX-165 e TX-305) e líquidos iônicos baseados no cátion colina (bitartarato e dihidrogenocitrato de colina) em diferentes temperaturas. O processo de segregação de fases foi dependente da temperatura, do ânion do líquido iônico e do balanço entre a hidrofobicidade e a massa molar do surfactante, sendo verificado que o parâmetro EHL não deve ser utilizado de forma isolada para avaliar o efeito da hidrofobicidade do surfactante sobre o comportamento de fase do sistema. Um aumento da região bifásica foi promovido pelo aumento da temperatura e pela substituição do ânion dihidrogenocitrato pelo ânion bitartarato enquanto o efeito da massa molar se sobressaiu ao efeito da hidrofobicidade do surfactante para determinar o tamanho da região bifásica. Os novos sistemas aquosos bifásicos atendem a alguns dos Princípios da Química Verde, pois foram obtidos a partir de compostos não voláteis e não tóxicos, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis. Estes SABs apresentam grande potencial de aplicação em processos de extração/purificação de solutos hidrofóbicos.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Voguel, A. I. *Practical organic chemistry*, 1989.
- (2) Costa, L. M. A. Simulação da extração sólido-líquido de vanilina de favas de *Vanilla planifolia*. **2017**.
- (3) Sá, L. A. de. Desacidificação de óleo de soja por extração líquido-líquido. **2007**.
- (4) Ribeiro, V. A. L.; Afonso, J. C.; Wildhagen, G. R. D. S.; Da Cunha, J. W. S. D. Extração líquido-líquido de urânio (VI) do colofanito de itaia (Santa Quitéria, Ceará) por extratantes orgânicos em presença de ácido fosfórico. *Química Nova* **2008**, *31*, 2159–2164.
- (5) Treybal, R. E. *Mass transfers operations*, 1980.
- (6) Gonçalves, D.; Teschke, M. E. E.; Koshima, C. C.; Gonçalves, C. B.; Oliveira, A. L.; Rodrigues, C. E. C. Fractionation of orange essential oil using liquid-liquid extraction: equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilibria* **2015**, *399*, 87–97.
- (7) Palma, M. S. A.; Shibata, C.; Paiva, J. L.; Zilli, M.; Converti, A. Batch liquid-liquid extraction of phenol from aqueous solutions. *Chemical Engineering and Technology* **2010**, *33*, 39–43.
- (8) Moraes, L. de S. Extração líquido-líquido de ácido succínico usando contactores com membranas de fibra oca. **2011**.
- (9) Treybal, R. E. *Liquid extraction*, 1963.
- (10) Rydberg, J.; Cox, M.; Musikas, C.; Choppin, G. R. *Solvent Extraction: Principles and Practice*, 2004.
- (11) Rodrigues, G. D.; da Silva, M. do C. H.; da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. dos R. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Separation and Purification Technology* **2008**, *62*, 687–693.
- (12) Silva, S. J. B. e; Ferreira, G. M. D.; de Lemos, L. R.; Rodrigues, G. D.; Mageste, A. B. Liquid-Liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of nonionic surfactante (Triton X-100, Triton X-165, or Triton X-305) and choline chloride. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2019**, *64*, 1632–1639.
- (13) Haraguchi, L. H.; Mohamed, R. S.; Loh, W. Pessôa Filho, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibria* **2004**, *215*, 1–15.
- (14) Schiozer, A. L.; Barata, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. *Revista Fitos* **2013**, *3*, 6–24.
- (15) 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 **2011**, *129*, 443–453.
- (16) 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* **2011**, *44*, 499–509.
- (17) Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. da C. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova* **2003**, *26*, 123–129.
- (18) Walter, H.; Brooks, D.; Fisher, D. *Partitioning in aqueous two-phase systems. Theory, methods, uses and applications to biotechnology*, 1985.
- (19) Beijerinck, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. *Zbl. Bakt. II Nature* **1896**, *627*, 697–699.
- (20) da Silva, L. H. M.; Loh, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* **2006**, *29*, 1345–1351.
- (21) Dobry, A.; Boyer-Kawenoki, F. Phase separation in polymer solution. *Journal of Polymer Science* **1947**, *2*, 90–100.

- (22) Tiselius, A.; Porath, J.; Albertsson, P. -Å. Separation and fractionation of macromolecules and particles. *Science* **1963**, *141*, 13–20.
- (23) Chen, J. -P.; Lee, M. -S.; Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, *17*, 1021–1027.
- (24) Schmidt, A. S.; Ventom, A. M.; Asenjo, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, **1994**, *16*, 131–142.
- (25) 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*, **2007**, *9*, 177–183.
- (26) Liu, Y.; Wu, Z.; Zhang, Y.; Yuan, H. Partitioning of biomolecules in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and nonionic surfactant. *Biochemical Engineering Journal* **2012**, *69*, 93–99.
- (27) Lopes, A. M.; Santos-Ebinuma, V. C.; Pessoa Júnior, A.; Rangel-Yagui, C. O. Influence of salts on the coexistence curve and protein partitioning in nonionic aqueous two-phase micellar systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2014**, *31*, 1057–1064.
- (28) Liu, C. -L.; Nikas, Y. J.; Blankschtein, D. *Two-phase aqueous surfactant systems for the purification of biomaterials*, 1995.
- (29) Gutowski, K. E.; Broker, G. A.; Willauer, H. D.; Huddleston, J. G.; Swatloski, R. P.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6632–6633.
- (30) Gündüz, U. Viscosity prediction of polyethylene glycol-dextran-water solutions used in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2000**, *743*, 181–185.
- (31) Pessoa Júnior, A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2005**, *41*, 440.
- (32) Giraldo-Zuñiga, A. D.; Coimbra, J. S. dos R.; Minim, L. A. Coeficientes de partição da α -Lactalbumina e β -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: influência da massa molar do polímero. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **2001**, *3*, 149–155.
- (33) Carvalho, C. P.; Coimbra, J. S. dos R.; Costa, I. A. F.; Minim, L. A.; da Silva, L. H. M.; Maffia, M. C. Equilibrium data for PEG 4000 + salt + water systems from (278.15 to 318.15) K. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2007**, *52*, 351–356.
- (34) Martins, J. P.; Carvalho, C. de P.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. dos R.; da Silva, M. do C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2008**, *53*, 238–241.
- (35) de Oliveira, F. C.; Coimbra, J. S. dos R.; da Silva, L. H. M.; Rojas, E. E. G.; da Silva, M. do C. H. Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal* **2009**, *47*, 55–60.
- (36) da Silva, M. do C. H.; da Silva, L. H. M.; Júnior, J. A.; Guimarães, R. O.; Martins, J. P. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , or MgSO_4 . *Journal of Chemical and Engineering Data* **2006**, *51*, 2260–2264.
- (37) Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da Silva, M. do C. H.; da Silva, L. H. M.; Patrício, P. da R.; Coimbra, J. S. dos R.; Minim, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2009**, *54*, 2891–2894.
- (38) Rodrigues, G. D.; da Silva, M. do C. H.; da Silva, L. H. M.; Teixeira, L. da S. T.; de Andrade, V. M. Liquid-liquid phase equilibrium of triblock copolymer L64, poly(ethylene oxide-b-propylene oxide-b-ethylene oxide), with sulfate salts from (278.15 to 298.15) K. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2009**, *54*, 1894–1898.

- (39) Rodrigues, G. D.; Teixeira, L. da S.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. do C. H.; da Silva, L. H. M.; de Carvalho, R. M. M. Phase diagrams of aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2010**, *55*, 1158–1165.
- (40) Ooi, C. W.; Tey, B. T.; Hii, S. L.; Kamal, S. M. M.; Lan, J. C. W.; Ariff, A.; Ling, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* **2009**, *44*, 1083–1087.
- (41) Reis, I. A. O.; Santos, S. B.; Pereira, F. D. S.; Sobral, C. R. S.; Freire, M. G.; Freitas L. S.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. *Separation Science and Technology* **2014**, *49*, 656–663.
- (42) Domínguez-Pérez, M.; Tomé, L. I. N.; Freire, M. G.; Marrucho, I. M.; Cabeza, O.; Coutinho, J. A. P. (Extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids. *Separation and Purification Technology* **2010**, *72*, 85–91.
- (43) Louros, C. L. S.; Cláudio, A. F. M.; Neves, C. M. S. S.; Freire, M. G.; Marrucho, I. M.; Pauly, J.; Coutinho, J. A. P. Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K_3PO_4 aqueous biphasic systems. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 1777–1791.
- (44) Ventura, S. P. M.; de Barros, R. L. F.; Barbosa, J. M. de P.; Soares, C. M. F.; Lima, Á. S.; Coutinho, J. A. P. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry* **2012**, *14*, 734–740.
- (45) Freire, M. G.; Louros, C. L. S.; Rebelo, L. P. N.; Coutinho, J. A. P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. *Green Chemistry* **2011**, *13*, 1536–1545.
- (46) Ramalakshmi, S.; Ramanan, R. N.; Ariff, A. B.; Ooi, C. W. Liquid-liquid equilibrium of primary and secondary aqueous two-phase systems composed of sucrose + triton X-114 + water at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2014**, *59*, 2756–2762.
- (47) e Silva, F. A.; Carmo, R. M. C.; Fernandes, A. P. M.; Kholany, M.; Coutinho, J. A. P. Ventura, S. P. M. Using ionic liquids to tune the performance of aqueous biphasic systems based on pluronic L-35 for the purification of naringin and rutin. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2017**, *5*, 6409–6419.
- (48) dos Santos, N. V.; Martins, M.; Santos-Ebinuma, V. C.; Ventura, S. P. M.; Coutinho, J. A. P.; Valentini, S. R.; Pereira, J. F. B. Aqueous biphasic systems composed of cholinium chloride and polymers as effective platforms for the purification of recombinant green fluorescent protein. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2018**, *6*, 9383–9393.
- (49) Borges, G. A.; Silva, L. P.; Penido, J. A.; de Lemos, L. R.; Mageste, A. B.; Rodrigues, G. D. A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater. *Journal of Environmental Management* **2016**, *183*, 196–203.
- (50) Garcia, E. S.; Ruiz, C. A. S.; Tilaye, T.; Eppink, M. H. M.; Wijffels, R. H.; van den Berg, C. Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system. *Separation and Purification Technology* **2018**, *204*, 56–65.
- (51) Penido, J. A.; Mageste, A. B.; Martins, P. L.; Ferreira, G. M. D. Surfactant as selective modulator in the partitioning of dyes in aqueous two-phase systems: A strategy for separation. *Journal of Molecular Liquids* **2019**, *293*, 111501.
- (52) Muruchi, L.; Schaeffer, N.; Passos, H.; Mendonça, C. M. N.; Coutinho, J. A. P.; Jimenez, Y. P. Sustainable extraction and separation of rhenium and molybdenum from model copper mining effluents using a polymeric aqueous two-phase system. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2019**, *7*, 1778–1785.
- (53) Zvarova, T. I.; Shkinev, V. M.; Vorob'eva, G. A.; Spivakov, B. Y.; Zolotov, Y. A. Liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: application of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Microchimica Acta* **1984**, *84*, 449–458.

- (54) Tong, A.-J.; Dong, J. -J.; Li, L. -D. Aqueous two-phase extraction system of sodium perfluorooctanoate and dodecyltriethylammonium bromide mixture and its application to porphyrins and dyes. *Analytica Chimica Acta* **1999**, *390*, 125–131.
- (55) Rodrigues, G. D.; de Lemos, L. R.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. dos R. A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system. *Talanta*, **2010**, *80*, 1139–1144.
- (56) Li, C. -X.; Han, J.; Wang, Y.; Yan, Y. -S.; Xu, X. -H.; Pan, J. -M. Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic liquid-salt aqueous two-phase system. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *653*, 178–183.
- (57) Li, N.; Yang, X.; Nian, L.; Wang, Z.; Lei, L.; Wang, K.; Zhang, H.; Yu, A.; Zhang, Z. Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction couple to liquid chromatography. *Analytical Methods* **2015**, *7*, 2514–2522.
- (58) Cha, K. -M.; Lee, E. -S.; Kim, I. -W.; Cho, H. -K.; Ryu, J. -H.; Kim, S. -K. Canola oil is an excellent vehicle for eliminating pesticide residues in aqueous ginseng extract. *Journal of Ginseng Research* **2016**, *40*, 292–299.
- (59) Freire, M. G.; Cláudio, A. F. M.; Araújo, J. M. M.; Coutinho, J. A. P.; Marrucho, I. M.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 4966–4995.
- (60) Rodrigues, G. Desenvolvimento e aplicação de novos sistemas aquosos bifásicos para a determinação e separação de metais. **2012**.
- (61) Martins, J. P.; Carvalho, C. de P.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. dos R.; da Silva, M. C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A. Liquid–liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2008**, *53*, 238–241.
- (62) de Lemos, L. R.; Santos, I. J. B.; Rodrigues, G. D.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. Copper recovery from ore by liquid–liquid extraction using aqueous two-phase system. *Journal of Hazardous Materials* **2012**, *237-238*, 209–214.
- (63) da Silva, L. H. M.; Loh, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova* **2006**, *29*, 1345–1351.
- (64) Haraguchi, L. H.; Mohamed, R. S.; Loh, W.; Pessôa Filho, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibria* **2004**, *215*, 1–15.
- (65) Zhang, Y.; Cremer, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 658–663.
- (66) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S. Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at T=298.15K. *Fluid Phase Equilibria* **2011**, *304*, 110–120.
- (67) Shahbzinab, M. -K.; Rahimpour, F. Liquid-liquid equilibrium data for aqueous two-phase systems containing PPG725 and salts at various pH values. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2012**, *57*, 1867–1874.
- (68) Sé, R. A. G.; Aznar, M. Liquid–liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + potassium phosphate at four temperatures: experimental determination and thermodynamic modeling. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2002**, *47*, 1401–1405.
- (69) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S.; Hosseinzadeh, S. Phase diagrams for liquid–liquid equilibrium of ternary poly(ethylene glycol)+di-sodium tartrate aqueous system and vapor–liquid equilibrium of constituting binary aqueous systems at T=(298.15, 308.15, and 318.15)K. *Fluid Phase Equilibria* **2008**, *268*, 142–152.
- (70) Li, Y.; Zhang, M.; Liu, Q.; Su, H. Phase behaviour for aqueous two-phase systems containing the ionic liquid 1-butylpyridinium tetrafluoroborate/1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate and organic salts (sodium tartrate/ammonium citrate/trisodium citrate) at different temperatures. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2013**, *66*, 80–87.

- (71) Lv, H.; Guo, D.; Jiang, Z.; Li, Y.; Ren, B. Phase behavior of aqueous two-phase systems composed of 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and phosphate-based salts at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria* **2013**, *341*, 23–29.
- (72) Álvarez, M. S.; Esperança, J. M. S. S.; Deive, F. J.; Sanromán, M. Á.; Rodríguez, A. A biocompatible stepping stone for removal of emerging contaminants. *Separation and Purification Technology* **2015**, *153*, 91–98.
- (73) Albertsson, P.A. *Partition of cell and macromolecules*, 1986.
- (74) Benavides, J.; Rito-Palomares, M.; Asenjo, J. A. Aqueous two-phase systems. *Comprehensive Biotechnology* **2011**, *2*, 697–713.
- (75) Griffin, W.C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. *The Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **1949**, *1*, 311–326.
- (76) Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; Lobo, J. S. *Tecnologia Farmacêutica*. 2002.
- (77) Sadeghi, R., Jamehbozorg, B. The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of sodium phosphate salts and poly (propylene glycol). *Fluid Phase Equilibria*, **2009**, *280*, 68–75.
- (78) Wang, Y.; Li, Y.; Han, J.; Xia, J.; Tang, X.; Chen, T.; Ni, L. Cloudy behavior and equilibrium phase behavior of triblock L64+ salt + water two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, *409*, 439–446.
- (79) Ulloa, G.; Sánchez, C. C. M.; Sineiro, J.; Rodríguez, A.; Deive, F. J.; Núñez, M. J. Sodium salt effect on aqueous solutions containing Tween 20 and Triton X-102. *Journal of Chemical Thermodynamics* **2012**, *47*, 62–67.
- (80) Ananthapadmanabhan, K.; Goddard, E. A correlation between clouding and aqueous biphasic formation in polyethylene oxide/inorganic salt systems. *Journal of Colloid and Interface Science* **1986**, *113*, 294–296.
- (81) 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). *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 10069–10073
- (82) Grilo, A. L.; Aires-Barros, M. R.; Azevedo, A. M. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. *Separation and Purifications Reviews* **2016**, *45*, 68–80.
- (83) Rogers, R. D.; Bond, A. H.; Bauer, C. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems. *Separation Science Technology* **1993**, *28*, 1091–1126.
- (84) Walter, H.; Garza, R.; Coyle, R. P. Partition of DEAE-dextran in aqueous dextran-polyethylene glycol phases and its effect on the partition of cells in such systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1968**, *156*, 409–411.
- (85) Souza, R. L.; Ventura, S. P. M.; Soares, C. M. F.; Coutinho, J. A. P.; Lima, A. S. Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems. *Green Chemistry* **2015**, *17*, 3026–3034.
- (86) Silvério, S. C.; Gracia, J.; Teixeira, J. A.; Macedo, E. A. Polyethylene glycol 8000 + citrate salts aqueous two-phase systems: relative hydrophobicity of the equilibrium phases. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, *407*, 298–303
- (87) Duraiayya, R.; Arumugam, S.; Settu, S. Equilibrium phase behavior of poly(ethylene glycol) 4000 and biodegradable salts at various temperatures [(20, 30, and 40) °C]. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2012**, *57*, 1112–1117.
- (88) Freire, M. G.; Pereira, J. F. B.; Francisco, M.; Rodríguez, H.; Rebelo, L. P. N.; Rogers, R. D., Coutinho, J. A. P. Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 1831–1839.
- (89) Coleman, D.; Gathergood, N. Biodegradation studies of ionic liquids. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 600–637.
- (90) Seddon, K. R. Ionic liquids for clean technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1997**, *68*, 351–356.

- (91) Plechkova, N. V.; Seddon, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 123–150.
- (92) Lin, M.-C.; Gong, M.; Lu, B.; Wu, Y.; Wang, D.-Y.; Guan, M.; Angell, M.; Chen, C.; Yang, J.; Hwang, B.-J.; Dai, H. An ultrafast rechargeable aluminium-ion battery. *Nature* **2015**, *520*, 324–328.
- (93) Xia, X.; Wan, R.; Wang, P.; Huo, W.; Dong, H.; Du, Q. Toxicity of imidazoles ionic liquid [C₁₆mim]Cl to Hela cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *162*, 408–414.
- (94) Abolghasembeyk, T.; Shahriari, S.; Salehifar, M. Extraction of stevioside using aqueous two-phase systems formed by choline chloride and K₃PO₄. *Food and Bioproducts Processing* **2017**, *102*, 107–115.
- (95) Xu, K.; Wang, Y.; Huang, Y.; Li, N.; Wen, Q. A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *864*, 9–20.
- (96) Álvarez, M. S.; Patiño, F.; Deive, F. J.; Sanromán, M. A.; Rodríguez, A. Aqueous immiscibility of cholinium chloride ionic liquid and Triton surfactants. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2015**, *91*, 86–93.
- (97) Salabat, A.; Moghadam, S. T.; Far, M. R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems composed of Triton X-100 and sodium citrate or magnesium sulfate salts. *CALPHAD: computer coupling of phase diagrams thermochemistry* **2010**, *34*, 81–83.
- (98) Álvarez, M. S.; Moscoso, F.; Rodríguez, A.; Sanromán, M. A.; Deive, F. J. Hybrid sequential treatment of aromatic hydrocarbon-polluted effluents using non-ionic surfactants as solubilizers and extractants. *Bioresource Technology* **2014**, *162*, 259–265.
- (99) Xavier, L.; Deive, F. J.; Sanromán, M. A.; Rodríguez, A.; Freire, M. S.; González-Álvarez, J.; Gortáres-Moroyoqui, P.; Ruíz-Cruz, S.; Ulloa, R. G. Increasing the greenness of lignocellulosic biomass biorefining process by means of biocompatible separation strategies. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2017**, *5*, 3339–3345.
- (100) Kholany, M.; Trebulle, P.; Martins, M.; Ventura, S. P. M.; Nicaud, J.-M.; Coutinho, J. A. P. Extraction and purification of violacein from *Yarrowia lipolytica* cells using aqueous solutions of surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2020**, *95*, 1126–1134.
- (101) Tian, H.; Xu, C.; Cai, J.; Xu, J. The aqueous biphasic system based on cholinium ionic liquids and nonionic surfactant and its application for triazine-based herbicides extraction. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2018**, *125*, 41–49.
- (102) Escudero, N.; Morandeira, L.; Sanromán, M. A.; Deive, F. J.; Rodríguez, A. Salting out potential of cholinium dihydrogen citrate in aqueous solution of Triton surfactants. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2017**, *118*, 235–243.
- (103) Martins, J. P.; Coimbra, J. S. dos R.; de Oliveira, F. C.; Sanaiotti, G.; da Silva, C. A. S.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H. Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase system composed of poly(ethylene glycol) 400 and sulfate salts. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2010**, *55*, 1247–1251.
- (104) 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). *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 10069–10073.
- (105) Liu, L.; Liu, Y.; Du, L.; Zhao, Y.; Du, H. (Liquid+liquid) phase equilibrium of aqueous two-phase system containing (surfactante + sodium sulfate + water) at different temperatures. *Fluid Phase Equilibria* **2016**, *415*, 25–33.
- (106) Álvarez, M. S.; Rivas, M.; Deive, F. J.; Sanromán, M. A.; Rodríguez, A. Ionic liquids and non-ionic surfactants: a new marriage for aqueous segregation. *RSC Advances* **2014**, *4*, 32698–32700.
- (107) Chen, L.-J.; Lin, S.-Y.; Huang, C.-C. Effect of hydrophobic chain length of surfactants on enthalpy-entropy compensation of micellization. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 4350–4356.

- (108) Souza, R. L.; Lima, R. A.; Coutinho, J. A. P.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Separation and Purification Technology* **2015**, *155*, 118–126.
- (109) Huddleston, J.; Veide, A.; Köhler, K.; Flanagan, J.; Enfors, S.-O.; Lyddiatt, A. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. *Trends in Biotechnology* **1991**, *9*, 381–388.
- (110) Sadeghi, R.; Jahani, F. Salting-in and salting-out of water-soluble polymers in aqueous salt solutions. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116*, 5234–5241.
- (111) López Vélez, J. S.; Azzoni, A. R.; Pessoa Filho, P. de A. Precipitation of lysozyme with sodium succinate, sodium tartrate and sodium citrate: Solubility and osmotic second virial coefficient data. *The Journal of Chemical Thermodynamics* **2017**, *110*, 25–32.
- (112) Bates, R. G.; Pinching, G. D. Resolution of the dissociation constants of citric acid at 0 to 50°, and determination of certain related thermodynamic functions. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, *71*, 1274–1283.
- (113) Margalit, Y. *Concepts in wine chemistry*, 2004.
- (114) Álvarez, M. S.; Esperança, J. M. S. S.; Deive, F. J.; Sanromán, M. Á.; Rodríguez, A. A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. *Separation and Purification Technology* **2015**, *153*, 91–98.
- (115) Tubío, G.; Pellegrini, L.; Nerli, B. B.; Picó, G. A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycols) of different molecular weight and sodium citrate. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2006**, *51*, 209–212.
- (116) Rengifo, A. F. C.; Ferreria, G. M. D.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M. Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly(ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: effect of temperature, anion and molar mass. *Fluid Phase Equilibria* **2015**, *406*, 70–76.

CAPÍTULO 2: PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DO FARELO DO ARROZ NEGRO EM SABS FORMADOS POR SURFACTANTE NÃO IÔNICO E LÍQUIDO IÔNICO À BASE DO CÁTION COLINA

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 O uso dos corantes na história da humanidade: natural versus sintético

Desde os primórdios da civilização, o homem faz uso de corantes. Evidências da exploração desses materiais datam do período paleolítico (15000 a.C.), quando tintas obtidas a partir da mistura de areia colorida com gordura de origem animal eram utilizadas em pinturas nas paredes das cavernas.¹ Flores, frutos, sementes e raízes de árvores consistiam em matérias primas para a obtenção de corantes utilizados na modificação da cor dos alimentos, no tingimento de objetos de decoração, tecidos, couros, entre outros.²

Quando os portugueses lançaram-se ao mar em busca de novos caminhos para as Índias, buscavam sobretudo especiarias e corantes destinados à tinturaria. Ao desembarcarem nas terras brasileiras, os europeus passaram a ter uma nova fonte de matéria prima para a produção de corantes vermelhos, sendo toneladas de madeira provenientes de pau-brasil (*Paubrasilia echinata*) exportadas e processadas pelas tinturarias europeias.³

Até meados do século XIX, os corantes utilizados eram extraídos sobretudo de fontes naturais. Contudo, com o desenvolvimento industrial surgiu uma elevada demanda por uma variedade de cores e padronização nos tons dos pigmentos, o que chamou a atenção para os corantes sintéticos, os quais se caracterizam por apresentar cores brilhantes e maior estabilidade frente a variações de temperatura, pH, luz e oxigênio.⁴

Os corantes sintéticos, utilizados principalmente com o intuito de tornar os produtos visivelmente mais atraentes, ainda são empregados e exercem grande influência sobre a escolha e aceitação dos consumidores em relação a uma variedade de produtos em diversas áreas, dentre as quais se destacam as indústrias têxtil, farmacêutica, de cosméticos, de plásticos, de couros, fotográfica, automobilística, de papel e alimentícia.⁵ Neste contexto, evidencia-se a grande importância cultural e principalmente comercial dos corantes para a história da humanidade.

Na contramão destes pontos positivos, estudos revelam que os corantes sintéticos são responsáveis por gerar riscos toxicológicos à saúde humana, como alergias e predisposição a alguns tipos de câncer.⁶ Atribuído a estes riscos de saúde e segurança apresentados em vários estudos científicos e às restrições progressivas quanto a utilização e até mesmo a proibição de

alguns destes corantes sintéticos, os corantes derivados de fontes naturais despertaram novamente a atenção de pesquisas nos últimos anos.

Os três grupos de corantes naturais mais frequentemente estudados incluem (i) os compostos heterocíclicos com estrutura tetrapirrólica, constituída de quatro anéis pirrólicos, que compreendem as clorofilas,⁷ (ii) os compostos de estrutura tetraterpenoide, que consiste de um número variável de duplas ligações conjugadas distribuídas ao longo de uma cadeia formada por quarenta átomos de carbono, que compreendem os carotenoides, e (iii) os compostos heterocíclicos oxigenados, mais conhecidos por flavonoides, que compreendem a catequina e as antocianinas.⁸ A Figura 2.1 apresenta exemplos de corantes para cada um destes grupos de corantes naturais.

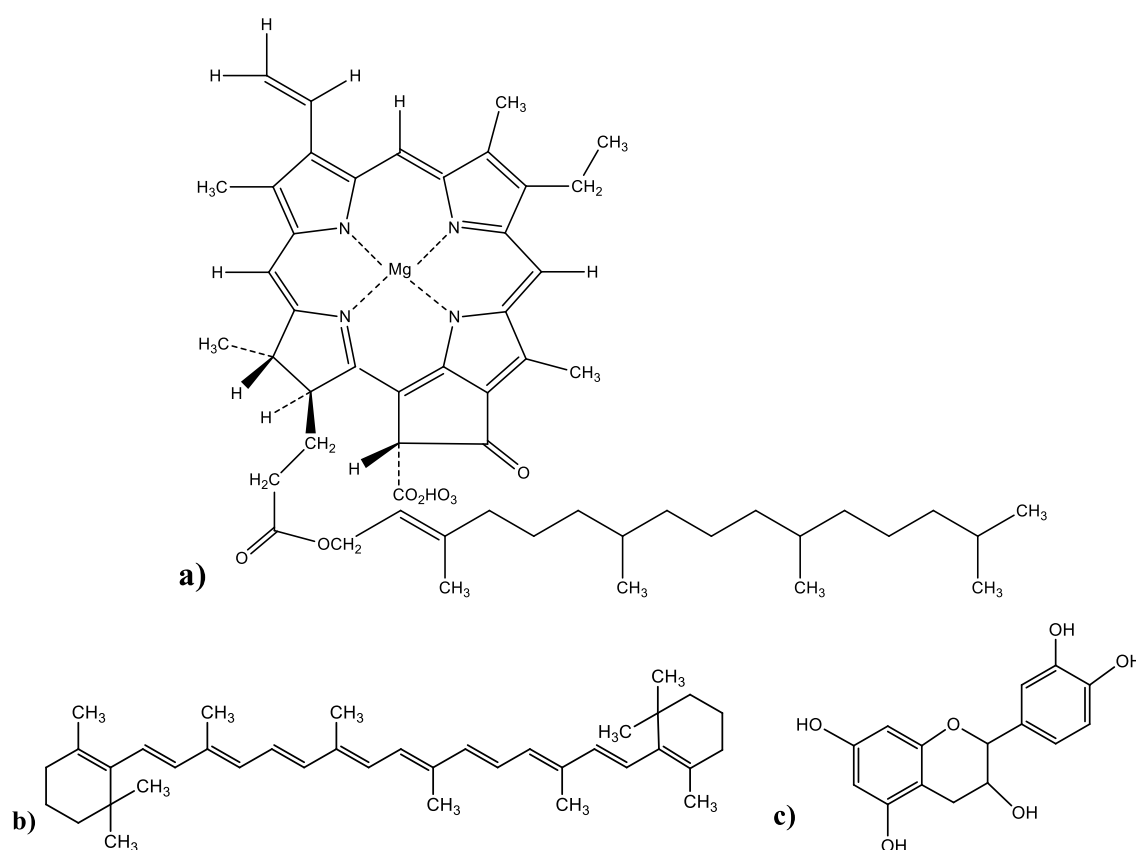


Figura 2.1. Estruturas moleculares de corantes pertencentes aos grupos de corantes naturais (a) Clorofilas (clorofila a), (b) Carotenoides (betacaroteno) e (c) Flavonoides (catequina).

Fonte: Própria autora.

As clorofilas representam os pigmentos naturais responsáveis por atribuir cor aos vegetais. Esse pigmento pode ser encontrado no interior dos cloroplastos e possui coloração esverdeada.⁷ Os carotenoides são outro grupo de pigmentos orgânicos que podem ser encontrados na natureza e são responsáveis pelas cores vermelha, laranja e amarela de frutas,

vegetais e flores. As antocianinas, depois da clorofila, representam o grupo de pigmentos mais abundante no reino vegetal. São largamente distribuídas entre as plantas e podem ser encontradas na maioria das frutas escuras. Além disso, apresentam propriedades funcionais benéficas para o organismo humano,⁸ despertando grande interesse de indústrias, principalmente alimentícias, que encontraram nas antocianinas um potencial substituinte para corantes sintéticos.

2.1.2 Antocianinas, um importante substituinte aos corantes sintéticos

As antocianinas são flavonoides hidrossolúveis amplamente encontrados na natureza, responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e vermelho presentes em flores, frutos, algumas folhas, caules, grãos e raízes.^{9,10} Além de sua propriedade de conferir cor, estudos sobre os efeitos benéficos das antocianinas à saúde humana revelam o potencial destas substâncias na redução do risco de doenças coronárias e suas ações antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena no organismo humano,^{8,11,12} fazendo com que esses compostos sejam objetos de estudo de pesquisadores em todo mundo. Entretanto, as novas perspectivas do uso de antocianinas também evidenciam a importância dos estudos analíticos destas substâncias frente a algumas dificuldades encontradas para sua aplicação, especialmente sua instabilidade e sensibilidade a fatores como variação de pH, variação de temperatura e presença de luz, oxigênio ou copigmentos.^{9,10} Nas subseções seguintes são abordados alguns aspectos sobre a estrutura molecular das antocianinas e sua relação com a estabilidade destes compostos frente a estes fatores.

2.1.3 Estrutura molecular das antocianinas

As antocianinas (do grego, *anthos*, flor; *kianos*, azul) representam um importante grupo da classe dos flavonoides e a estrutura molecular base dessas substâncias, denominadas antocianidinas, corresponde ao cátion flavilium (Figura 2.2). Essas moléculas são consideradas anfipáticas, devido à presença de uma porção hidrofóbica, correspondente aos anéis aromáticos, e uma porção hidrofílica, correspondente à presença dos grupos hidroxilas e/ou outros grupos oxigenados ligados às estruturas aromáticas. Em função do grande número de ligações duplas conjugadas presentes em sua estrutura elas absorvem luz na região visível do espectro entre 465 a 550 nm, apresentando um amplo espectro de cores que evidencia sua potencial aplicação como corantes naturais.^{9,10}

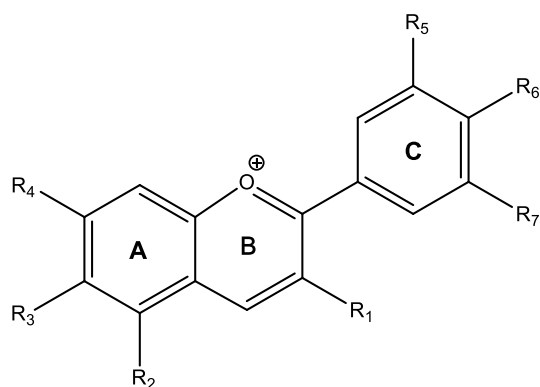


Figura 2.2. Estrutura molecular base das antocianidinas (cátion flavilium).

Fonte: Adaptado de Cavalcanti e colaboradores.¹⁰

As antocianidinas mais estudadas e comumente encontradas são a pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina e petunidina que se diferenciam pelas posições e quantidades de grupos hidroxílicos e metoxílicos que substituem R1 a R7 na estrutura molecular representada na figura 2.2.¹⁰ As estruturas das antocianidinas mais comuns são representadas na figura 2.3.

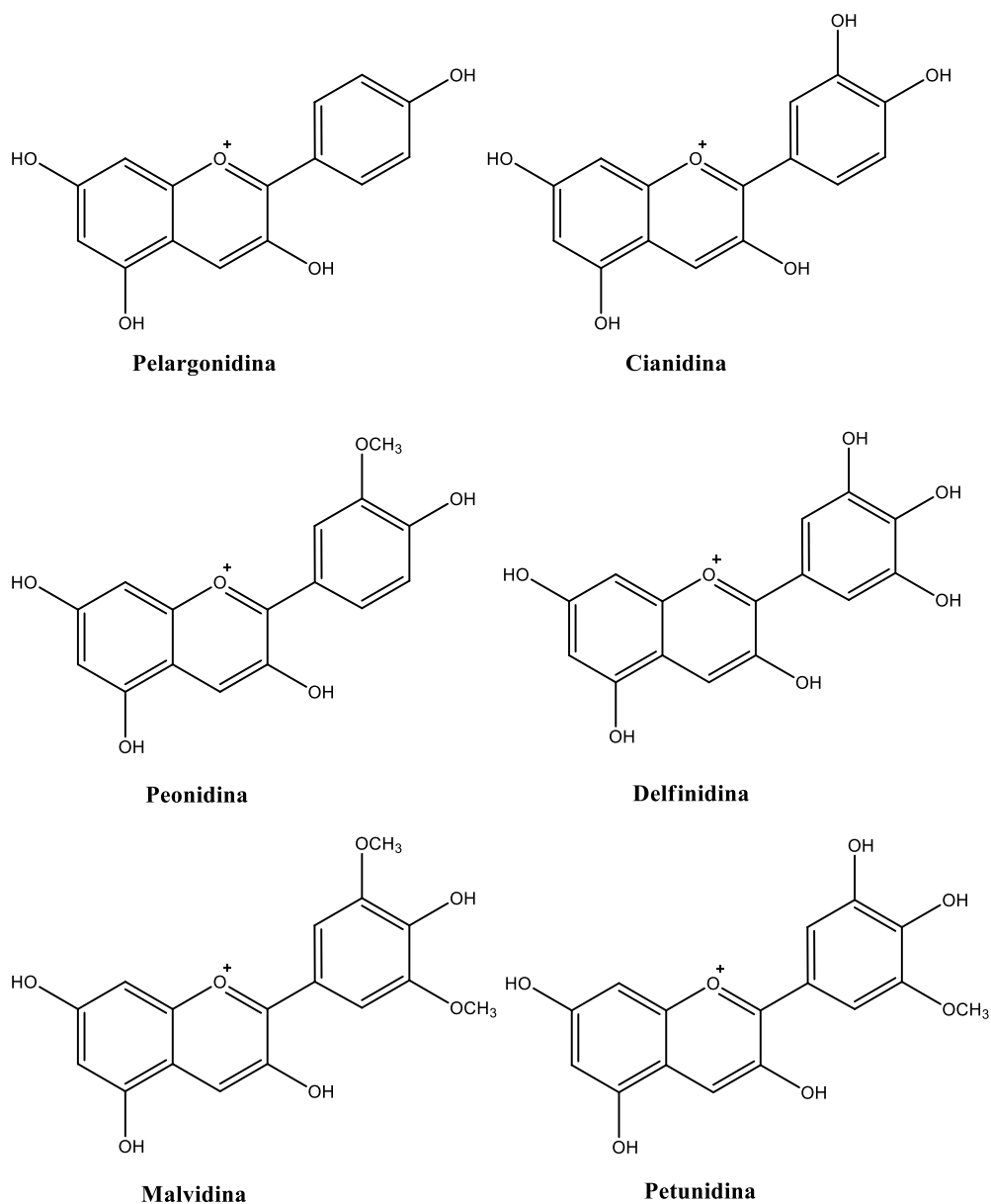


Figura 2.3. Principais antocianidinas encontradas na natureza.

Fonte: Adaptado de Patrício.¹³

As variações nas estruturas das antocianidinas são responsáveis pela existência de mais de 600 tipos de antocianinas tendo destaque as antocianidinas em sua forma glicosilada, as quais podem ser facilmente encontradas na natureza, principalmente em flores, frutas e legumes. A glicosilação das antocianidinas é observada com maior frequência no carbono ligado ao grupo R1 (figura 2.2),¹⁰ sendo as antocianinas apresentadas na tabela 2.1 as principais encontradas na natureza.

Tabela 2.1. Principais antocianinas encontradas na natureza.^a

| Antocianina | Grupo R ₅ | Grupo R ₇ | Grupo R ₁ | Cor |
|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| cianidina-3-glicosídeo | OH | H | Glicose | magenta ou carmesim |
| cianidina-3-galactosídeo | OH | H | Galactose | magenta ou carmesim |
| cianidina-3-rutinosídeo | OH | H | Rutinose | magenta ou carmesim |
| delfinidina-3-glicosídeo | OH | OH | Glicose | roxo, mauve ou azul |
| pelargonidina-3-glicosídeo | H | H | Glicose | laranja ou salmão |
| malvidina-3-glicosídeo | OCH ₃ | OCH ₃ | Glicose | Roxo |
| peonidina-3-glicosídeo | OCH ₃ | H | Glicose | magenta |

^a Grupos R₁, R₅ e R₇ são aqueles representados na figura 2.2.

Fonte: Adaptado de Cavalcanti e colaboradores.¹⁰

2.1.4 Estabilidade das antocianinas

As antocianinas isoladas são instáveis e degradam-se facilmente, o que implica na alteração de sua estrutura molecular, mediante algumas condições do meio, com consequente perda de sua coloração característica e de suas propriedades funcionais, podendo comprometer seu uso como corante. Sua estabilidade é dependente de fatores como pH, temperatura de armazenamento e presença de luz, oxigênio, enzimas, íons metálicos, entre outros.¹⁴ O grau de hidroxilação e metoxilação da antocianina também influencia na sua estabilidade, a qual geralmente aumenta com o aumento do número de metoxilas e diminui com o aumento do número de hidroxilas. Além disso, a copigmentação também pode influenciar na coloração das soluções de antocianinas.¹⁵ A seguir, serão apresentados alguns aspectos relevantes sobre as influências do pH, da temperatura e da copigmentação na estabilidade das antocianinas.

2.1.4.1 Influência do pH

As propriedades moleculares e, conseqüentemente, a coloração das antocianinas são altamente dependentes do pH do meio em que se encontram. Essa característica, inclusive, viabiliza a utilização desses compostos como indicadores naturais de pH.¹⁶ Nesse contexto, o pH é um dos mais importantes fatores que afetam a estabilidade dessas substâncias.

Em meio aquoso, as principais mudanças na coloração das antocianinas podem ser associadas à existência de quatro espécies químicas (cátion flavilium, base anidra quinoidal, pseudo-base carbinol e chalcona) que se relacionam entre si de acordo com os equilíbrios representados na figura 2.4.

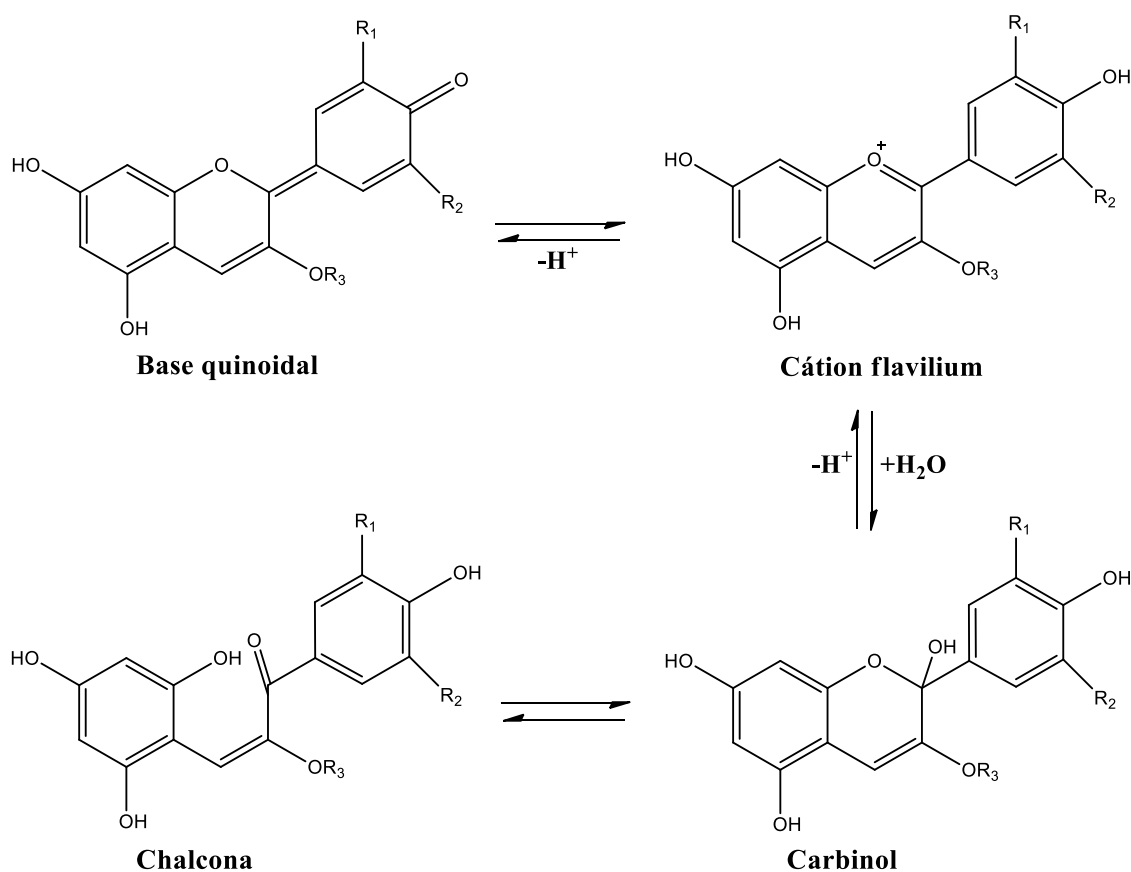


Figura 2.4. Formas químicas predominantes das antocianinas.

Fonte: Adaptado de Castañeda-Ovando e colaboradores.⁹

Na forma de cátion flavilium, a forma usual em que as antocianinas se encontram, elas são estáveis e apresentam coloração predominantemente vermelha em soluções bastante ácidas, com valores de pH menores que 2,0. A elevação do pH promove a desprotonação e, conseqüentemente, diminuição da concentração do cátion flavilium, levando à uma perda de intensidade da cor. Particularmente, em valores de pH entre 2,0 e 4,0 a espécie predominante torna-se a base quinoidal, de coloração azul/violeta. Em valores de pH entre 5,0 e 6,0 pode ser observada a formação da pseudo-base carbinol, que é incolor, e de seu tautômero, a chalcona, de cor levemente amarelada. Em valores de pH superiores a 7,0, algumas reações irreversíveis podem ocorrer em alguns grupos de antocianinas, dependendo dos grupos substituintes em sua estrutura base. Nesse caso, por exemplo, pode ocorrer a degradação da espécie chalcona para dar origem a seu respectivo ácido fenólico e aldeído (Figura 2.5).^{9,10}

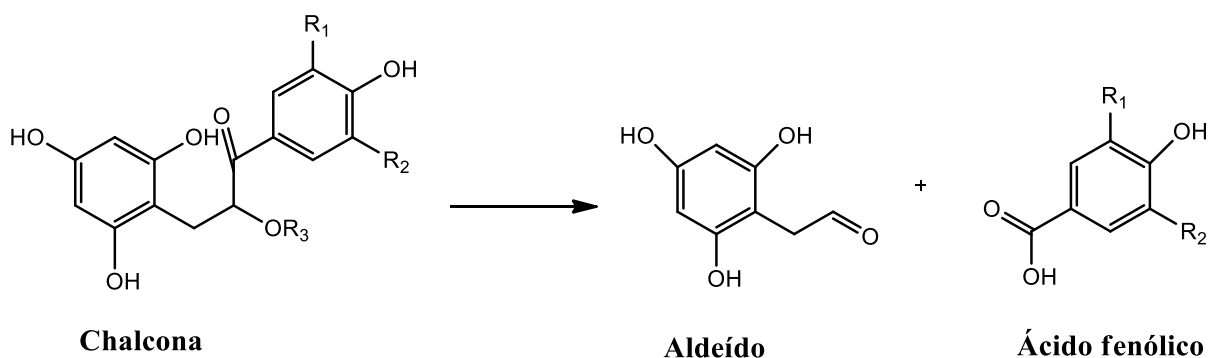


Figura 2.5. Reação de degradação da chalcona em pH > 7,0.

Fonte: Adaptado de Castañeda-Ovando e colaboradores.⁹

Em geral, estudos sobre a estabilidade das antocianinas e suas variações de coloração em função do pH concluíram que as alterações de cor nesses compostos são mais significativas em meios menos ácidos, associado à maior instabilidade das antocianinas nesses meios. Por exemplo, Kirca e colaboradores¹⁷, avaliando o efeito do pH sobre a estabilidade das antocianinas de cenouras pretas, observaram uma diminuição significativa na estabilidade das antocianinas em valores de pH acima de 5,0. Similarmente, Nascimento e colaboradores¹⁸, avaliando a estabilidade de antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*) frente à variações de pH, mostraram que a maior estabilidade das antocianinas foi na faixa de pH entre 2,5 e 3,5, com degradação mais acentuada em pH igual a 4,5.

2.1.4.2 Influência da temperatura

A temperatura é outro fator relevante a se avaliar na análise da estabilidade das antocianinas. Embora um aumento de temperatura possa favorecer a extração de antocianinas, especialmente em processos de extração com solvente, otimizando o processo de transferência de massa e reduzindo o tempo de extração, temperaturas muito elevadas podem levar à degradação desses compostos. Isso se deve em parte ao fato de que as reações de equilíbrio entre as estruturas antociânicas (Figura 2.4) são endotérmicas da esquerda para a direita e, conseqüentemente, um aumento da temperatura favorece a quebra do anel para a formação da chalcona.¹⁹

Estudos indicam que extratos de antocianinas armazenados a baixas temperaturas são mais estáveis que aqueles armazenados à temperatura ambiente. Por exemplo, Turker e colaboradores²⁰, investigando a estabilidade de antocianinas de cenoura preta fermentada em três temperaturas de armazenamento (4, 25 e 40 °C) durante 90 dias, revelaram que o conteúdo monomérico de antocianinas diminuiu 17,8, 49,2 e 93,3% (com perda de intensidade da cor de 7,8, 29,0 e 74,2%) nas amostras de controle armazenadas a 4, 25 e 40 °C, respectivamente. Em

outro estudo, desenvolvido por Fracasetti e colaboradores²¹, o armazenamento de antocianinas do pó de mirtilo selvagem (*Vaccinium angustifolium*) em diferentes temperaturas (25, 42, 60 e 80 °C) durante 49 dias também revelou uma redução no conteúdo de antocianinas do extrato que se mostrou mais evidente em temperaturas mais elevadas. Enquanto a 25 e 42 °C houve uma redução de 3% no conteúdo de antocianinas após 2 semanas, a 60 e 80 °C essas reduções foram de 60 e 85%, respectivamente, após 3 dias.

Além do efeito isolado da temperatura, o efeito combinado da temperatura com outras variáveis sobre a estabilidade de antocianinas também tem sido investigado. Por exemplo, Sui e colaboradores²² investigaram a estabilidade de duas antocianinas presentes no arroz negro (cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo) em solução aquosa em diferentes valores de pH (2,2 a 6,0) e temperatura (100 a 165 °C). Os autores observaram que a taxa de degradação das duas antocianinas na faixa de pH entre 2,2 e 5,0 não mudou significativamente, exceto em altas temperaturas (145 e 165 °C). Em comparação, o aumento do pH de 5,0 para 6,0 causou uma elevação significativa nas constantes da taxa de degradação, mesmo em uma temperatura mais baixa (135 °C). As constantes da taxa de degradação mais baixa e mais alta para a cianidina-3-glucosídeo, por exemplo, foram obtidas em pH 2,2 a 100 °C e em pH 6,0 a 165 °C, respectivamente. Apesar disso, a taxa de degradação aumentou com a elevação da temperatura em todas as condições de pH investigadas, concordando com a ideia de que a redução do conteúdo de antocianinas causada pelo aumento da temperatura foi maior do que a causada pelo aumento do pH.

2.1.4.3 Presença de luz e oxigênio

As antocianinas protegidas da luz mantêm-se mais estáveis quando comparadas às expostas à luz. Essa diferença foi observada, por exemplo, no estudo de Nuryanti e colaboradores²³ que, ao investigarem o efeito da luz na estabilidade de antocianinas provenientes de pétalas da rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), observaram que o extrato de antocianinas sob a ausência de luz se degradou completamente 3 semanas após a degradação completa do extrato na presença de luz, comprovando que a luz tem um efeito negativo sobre a estabilidade das antocianinas durante seu armazenamento. A radiação ultravioleta incidida sobre os extratos antocianínicos favorece a ocorrência de reações paralelas que dão origem a produtos de degradação oxidativa das antocianinas, de coloração marrom.

Janna e colaboradores,²⁴ avaliando o efeito da luz sobre a estabilidade de antocianinas extraídas de flores (*Tibouchina semidecantara* L.) em diferentes estágios de desenvolvimento, constataram que o botão de flor totalmente formado, mas não aberto, apresentou maior conteúdo de antocianinas totais quando comparado aos conteúdos de antocianinas de pétalas

frescas. Além disso, os extratos armazenados no escuro mantiveram a coloração roxa por 26 dias, enquanto a exposição à luz reduziu este tempo para 10 dias.

A presença de oxigênio também aumenta o impacto dos processos que contribuem com a degradação de antocianinas. Esta degradação ocorre através de um mecanismo de oxidação direta ou indireta dos constituintes do meio que reagem com as antocianinas. A presença de oxigênio, juntamente com a mudança do pH, foram os principais fatores que contribuíram para a deterioração da cor de antocianinas em sucos de framboesa.²⁵

2.1.4.4 Copigmentação

A estabilização e coloração das antocianinas é também fortemente alterada mediante o fenômeno de copigmentação. Este consiste na ligação entre a estrutura química das antocianinas e uma outra espécie, denominada copigmento, através de ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas inter ou intramoleculares. Interações intermoleculares, por exemplo, podem ocorrer por associação de duas ou mais moléculas de antocianina, envolvendo ou não a complexação com um íon metálico.²⁶ Também podem ocorrer por associação com outros compostos fenólicos, proteínas, açúcares, ácidos nucléicos, ácidos orgânicos, minerais, aminoácidos e outros flavonoides. Tais interações levam a uma proteção efetiva da estrutura da antocianina contra o ataque nucleofílico pela água e posterior formação da chalcona.²⁷

Por exemplo, Charurungsipong e colaboradores²⁸, avaliando o efeito do copigmento catequina na estabilidade de antocianinas do extrato de flor de ervilha borboleta (*Clitoria ternatea*), constaram que um aumento na proporção catequina:antocianina retardou significativamente a degradação do corante, especialmente em temperaturas elevadas (90 °C), tendo a copigmentação intensificado a cor do extrato de flor de ervilha borboleta. Em outro estudo, Castañeda-Ovando e colaboradores,²⁹ investigando o teor de metais presente no milho crioulo azul e seu efeito na estabilidade da cor das antocianinas através de estudos espectrofotométricos, concluíram que os principais metais encontrados no pericarpo do milho (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+}) são responsáveis pela complexação e estabilização da cor das antocianinas presentes naquele grão. Bimpilas e colaboradores,³⁰ ao examinarem o efeito do ácido rosmarínico sobre a estabilidade de extratos naturais ricos em ácidos hidroxicinâmicos, obtidos a partir de plantas aromáticas (*Origanum vulgare* e *Satureja thymbra*), avaliando seu potencial como cofatores para copigmentação de antocianinas presentes no vinho Merlot fresco, observaram um aumento na intensidade da cor do vinho em 15-50% após a copigmentação. No contexto desses estudos, diferentes copigmentos podem desempenhar papel fundamental na estabilização de antocianinas derivadas de diferentes fontes.

2.1.5 Extração, purificação, identificação e quantificação de antocianinas

Diversos métodos são reportados para extrair antocianinas a partir de diferentes fontes entre os quais podemos citar a extração com solventes, a extração supercrítica e a extração assistida por micro-ondas.³¹ Entre estes métodos, a extração com solventes destaca-se como o método mais utilizado para extrair compostos flavonólicos, tais como as antocianinas. Neste método, o material de partida é macerado, triturado ou liofilizado, e, em seguida, colocado em contato com um solvente, usualmente orgânico e que geralmente apresenta grupos polares em sua estrutura. Entre estes solventes destacam-se o uso de metanol, etanol e acetona, sendo preferível o uso do etanol, devido a sua menor toxicidade.³²

Como produto da extração com solventes, um extrato concentrado em antocianinas e outras substâncias é obtido, o qual pode ser purificado em diferentes níveis a depender da aplicação desejada. Por exemplo, o uso de antocianinas no setor industrial, principalmente alimentício e farmacêutico, requer a separação das substâncias co-extraídas na etapa de obtenção do corante. Para a purificação destes extratos, são utilizadas técnicas como a extração em fase sólida e a extração líquido-líquido tradicional com solventes orgânicos.³³ Na primeira, cartuchos geralmente constituídos de C₁₈ (octadecil silano), sephadex ou amberlite quimicamente ligados à sílica formam a fase sólida extratora. Então, o extrato rico em antocianinas pode ser eluído através do cartucho utilizando um solvente que interage favoravelmente com interferentes orgânicos indesejados, como açúcares e ácidos, permitindo que estes sejam transportados pela coluna enquanto as antocianinas são retidas na fase sólida. Estas posteriormente podem ser removidas da fase sólida usando um solvente como uma mistura metanol/etanol, o qual pode ser posteriormente evaporado. De forma semelhante, na extração líquido-líquido, a purificação das antocianinas ocorre por meio de sua separação dos interferentes indesejados em duas fases distintas, porém essa separação é realizada entre duas fases líquidas.³⁴ Enquanto as antocianinas são majoritariamente transferidas para uma das fases líquidas, os interferentes são majoritariamente transferidos para a outra fase.

Uma vez separadas e purificadas, as antocianinas podem ser identificadas por várias técnicas, sendo a espectroscopia UV-vis, a espectroscopia de massas e a espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) as mais utilizadas.³⁵ Na espectroscopia UV-vis a amostra contendo antocianina dissolvida em um solvente sofre incidência de radiação eletromagnética em uma faixa de comprimentos de onda específica e o fenômeno da absorção devido a transições eletrônicas ocorridas nas moléculas para cada comprimento de onda dentro da faixa selecionada resulta em um espectro de absorção molecular.³⁶ A partir desse espectro é possível realizar um estudo quantitativo e/ou qualitativo da espécie de antocianina presente na

amostra. Já na espectroscopia de massas, íons gerados pela fragmentação das moléculas de antocianina presentes na amostra são acelerados sob a ação de um campo elétrico, permitindo a detecção de diferentes fragmentos de acordo com sua massa, o que pode auxiliar na identificação da estrutura molecular da antocianina presente na amostra.³⁷ Na espectrometria de RMN, pulsos de radiofrequência são aplicados sobre a amostra que está imersa em um campo magnético intenso, permitindo a absorção de diferentes frequências por átomos específicos presentes na estrutura molecular da antocianina de acordo com o ambiente químico ao redor dos átomos. Espectros de RMN de ¹³C, associados com a análise de espectros de RMN de ¹H, podem possibilitar a determinação das fórmulas molecular e estrutural das antocianinas em análise.³⁸

Métodos mais robustos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também têm sido utilizados em estudo envolvendo antocianinas. A CLAE com fase reversa, por exemplo, emprega uma coluna fechada (recheada de um material especialmente preparado e que pode interagir diferentemente com as várias espécies presentes em uma amostra) e uma fase móvel (eluída a altas pressões e que compete com o material imobilizado na coluna pelas moléculas das diferentes espécies presentes na amostra). O fato de que diferentes espécies interagem de forma distinta com ambos (material da coluna e fase móvel) permite que essas diferentes espécies sejam separadas e na CLAE, em especial, essa separação pode ser para uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. No caso de amostras ricas em antocianinas, as condições adequadas permitem inclusive a separação de espécies de antocianinas com estruturas moleculares semelhantes. Além de separar, esta técnica permite identificar e quantificar pigmentos antociânicos sem requerer purificação excessiva dos extratos, apesar da limitação relacionada com a dificuldade da obtenção e o elevado custo de padrões comerciais.³⁹

Com base no exposto, é evidente que a identificação de antocianinas individuais é um desafio e exige métodos mais avançados e de elevado custo como espectroscopia de massas, RMN e CLAE. Nesse sentido, a caracterização de antocianinas totais tem sido aceita e técnicas como UV-Vis são ferramentas complementares muito úteis para esse tipo de caracterização. A espectroscopia no UV-vis é uma das principais técnicas utilizadas para quantificação de antocianinas totais devido à sua simplicidade e baixo custo e um método que faz uso desta técnica para esta finalidade consiste do método do pH diferencial, descrito na subseção a seguir.

2.1.5.1 Quantificação pelo método do pH diferencial

O conteúdo total de antocianinas em um extrato bruto a partir do método do pH diferencial pode ser determinado a partir da absorvidade total da solução no comprimento de

onda de máxima absorção. Isso é possível, pois todas as antocianinas apresentam uma banda de absorção típica na região do UV-Vis entre 465 a 550 nm, a qual é bem resolvida em relação às bandas de absorção da maioria dos compostos fenólicos.³⁵

Inicialmente introduzido por Sondheimer e Kertsz em 1948, o método do pH diferencial passou por algumas adaptações ao longo dos anos, visando sua simplificação. Giusti e Wrolstad⁴⁰ publicaram alguns trabalhos sobre a utilização da espectroscopia UV-Vis para caracterização e quantificação de antocianinas, a partir do método do pH diferencial, o qual foi utilizado nesse trabalho. Este método consiste na medida da absorbância, em $\lambda_{\text{máx}}$, de amostras tamponadas em pH 1,0 com solução tampão de cloreto de potássio (absorbância referente ao cátion flavílium) e em pH 4,5 com solução tampão de acetato de sódio (absorbância referente ao carbinol). Esse método também considera que alguns materiais coloidais podem estar suspensos na amostra, causando dispersão de luz. Esta pode ser corrigida pela leitura da absorbância da amostra em um comprimento de onda onde não ocorre absorbância da amostra, por exemplo em 700 nm. Com base nos resultados a partir da análise de vários tipos de amostras de antocianinas por esse método, convencionou-se utilizar o $\lambda_{\text{máx}}$ em 520 nm para determinação da concentração de antocianinas, pois uma vez que a banda de absorção no visível é ampla, variar de algumas unidades o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ não altera significativamente o valor final de concentração.

Segundo Giusti e Wrolstad,⁴⁰ o método do pH diferencial é indicado para determinação de antocianinas totais, pois permite uma rápida determinação da concentração das antocianinas totais presentes em determinada amostra com uma boa exatidão, sendo um método simples e rápido e que não exige curvas de calibração para sua determinação.

2.1.6 Sistemas aquosos bifásicos como técnica na purificação de antocianinas

Apesar de serem eficientes, os métodos usualmente empregados na purificação/extração de antocianinas (extração com solventes, extração em fase sólida e extração líquido-líquido) fazem uso de solventes orgânicos tóxicos, os quais vão de encontro ao apelo recente pelo desenvolvimento de métodos mais amigáveis ambientalmente. Nesse contexto, os sistemas aquosos bifásicos (SABs) surgem como uma alternativa atraente à extração e/ou purificação de antocianinas devido principalmente às suas propriedades estratégicas, como por exemplo, o fato de que um dado soluto tende a se concentrar preferencialmente em uma das fases do sistema e às suas características que permitem enquadrá-los dentro de alguns dos Princípios da Química Verde.

Alguns trabalhos descritos na literatura já verificaram a possibilidade de utilização de SABs como técnica de purificação e extração de antocianinas, sendo tais trabalhos focados em estudos de partição do corante entre as fases de diferentes SABs, especialmente aqueles formados pela combinação de álcool e eletrólito ou polímero e eletrólito. SABs formados pela combinação de etanol e eletrólito foram utilizados em estudos de partição de antocianinas da amora,⁴¹ batata doce roxa,⁴² goji berry,⁴³ suco de uva⁴⁴ e semente da planta *Garcinia indica*,⁴⁵ também conhecida como *kokum*. De maneira geral, esses sistemas apresentaram potencial para a extração/purificação de antocianinas, pois enquanto as antocianinas foram majoritariamente transferidas para a fase superior do sistema (enriquecida em etanol), a maioria dos açúcares concentraram-se na fase inferior (enriquecida em eletrólito).

Siqueira⁴⁶ investigou a partição de antocianinas de açaí em SABs formados por etanol ou PEG de diferentes massas molares (massa molar média variando na faixa 4000 – 10000 g/mol) e sais de sulfato (sulfato de amônio, sulfato de magnésio e sulfato de sódio), visando investigar a melhor condição para extração do corante. O sistema formado por etanol e sulfato de amônio foi mais promissor para a extração de antocianinas do açaí do que os sistemas formados por PEG e sais de sulfato, uma vez que no primeiro as antocianinas foram particionadas para a fase superior e os açúcares para a fase inferior do sistema. Os sistemas formados por PEG e sal, por sua vez, apresentaram extrações de 100% de antocianinas para a fase superior, rica em PEG.

Patrício¹³ também avaliou o uso de SABs formados por PEG de diferentes massas molares (massa molar média variando na faixa 1500 – 35000 g/mol) ou PPO 400 g/mol e sais de sulfato (sulfato de amônio, sulfato de lítio, sulfato de magnésio e sulfato de sódio) na partição de antocianinas proveniente de uma amostra comercial disponibilizada pela empresa Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda. Nesse caso, o comportamento de partição do corante natural foi verificado em função do comprimento da linha de amarração, natureza do eletrólito, hidrofobicidade e massa molar do polímero. Em geral, o aumento do CLA conduziu a maiores valores de coeficiente de partição, que variaram de 1,1 a 89,2, indicando que as moléculas do corante foram concentradas preferencialmente na fase rica em polímero.

Segundo a literatura consultada, trabalhos avaliando a aplicação de SABs para extrair e/ou purificar antocianinas ainda são escassos, havendo um grande campo de pesquisa a ser explorado que envolve: (i) avaliar o comportamento de partição de antocianinas em SABs formados por diferentes combinações; (ii) investigar a partição de antocianinas a partir de diferentes fontes em SABs; (iii) avaliar alternativas de recuperação do corante a partir das fases do sistema, entre outros. Por exemplo, o estudo de partição de antocianinas provenientes de resíduos da produção do arroz negro em SABs ainda não foi investigado, não havendo também

estudos avaliando o uso de SABs formados por surfactantes não iônicos e líquidos iônicos para esta finalidade.

2.1.7 Antocianinas no arroz negro

O arroz é um dos alimentos mais consumidos no mundo por estar presente na alimentação básica de mais de 50% da população mundial. No Brasil, o arroz é normalmente consumido como arroz branco sem casca, farelo e germe.⁴⁷ Contudo, com o surgimento de novos nichos de mercado, novos cultivos de arroz têm emergido por apresentarem características sensoriais distintas daquelas já bem difundidas do arroz branco. O arroz aromático e o pigmentado, por exemplo, são mais conhecidos e utilizados nas culinárias asiática, japonesa e italiana. Enquanto o arroz aromático possui teores de compostos voláteis aromáticos elevados, o pigmentado (que possui o pericarpo colorido) apresenta compostos fenólicos em maiores quantidades.⁴⁸

O arroz negro (*Oriza sativa L.*) é uma espécie de arroz pigmentado rico em nutrientes, contendo alto teor de fibras e proteínas. Além disso, possui compostos fenólicos em abundância e um grão de cor escura que é atribuído ao elevado teor de antocianinas (Figura 2.6). Nos últimos anos, o cultivo do arroz negro em países como a China, Japão e Estados Unidos cresceu consideravelmente e o aumento do interesse culinário por essa espécie de cereal está diretamente associado à fonte nutricional rica em antocianinas e seus benefícios para a saúde humana.⁴⁹



Figura 2.6. Grãos de arroz negro (*Oriza sativa L.*).

Fonte: própria autora.

Estudos desenvolvidos por Hiemori e colaboradores⁵⁰ sobre a composição e a estabilidade térmica de antocianinas do arroz negro constataram que 91,13% do total de antocianinas correspondem a cianidina-3-glicosídeo e 4,74% correspondem a peonidina-3-glicosídeo. Outros constituintes apareceram em baixas quantidades.

Um aspecto relevante associado ao beneficiamento do arroz negro é que durante esse processo são gerados alguns subprodutos como o arroz negro quebrado, o qual é basicamente reaproveitado para a produção de farinha e ração animal. Outros resíduos como a casca e o farelo do arroz, obtidos na etapa de polimento dos grãos, não apresentam valor comercial. No entanto, ambos, mas especialmente o farelo do arroz negro, são ricos em compostos fenólicos, sobretudo antocianinas, uma vez que estas se concentram majoritariamente nas camadas mais externas do grão.⁵¹ Neste contexto, o farelo do arroz negro pode ser utilizado como uma fonte estratégica para obtenção de antocianinas, transformando-se em um produto com alto valor agregado. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos na literatura avaliando o uso deste resíduo como fonte de antocianinas, fazendo-se necessário o estudo de métodos de extração/purificação que sejam simples, de baixo custo, ambientalmente amigáveis e eficazes que possam tornar o uso dessa fonte de antocianinas atraente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos gerais

Na segunda parte desse trabalho, o objetivo geral foi avaliar o potencial de sistemas aquosos bifásicos formados por surfactantes não iônicos e líquido iônico à base do cátion colina na extração/purificação de antocianinas do farelo do arroz negro.

2.2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos da segunda parte desse trabalho:

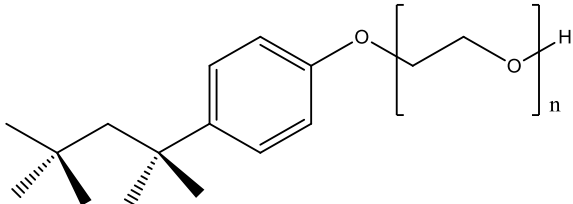
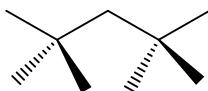
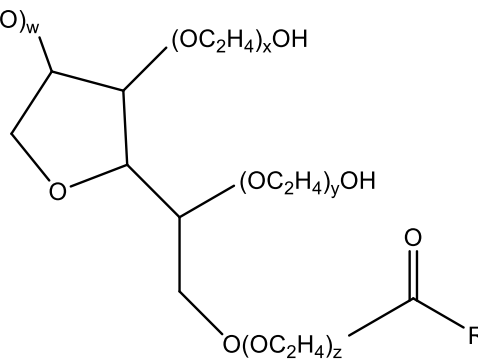
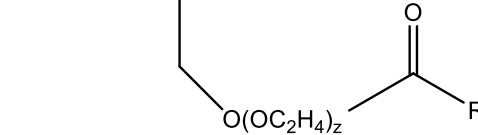
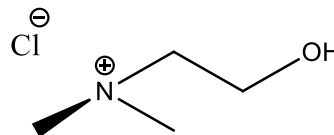
- Obter um extrato rico em antocianinas a partir do farelo do arroz negro utilizando um método de extração por solvente;
- Quantificar as antocianinas totais no extrato obtido usando o método do pH diferencial;
- Obter os coeficientes de distribuição das antocianinas provenientes do extrato obtido em diferentes SABs formados por surfactante não iônico, cloreto de colina e água à 25,0 °C;
- Avaliar o efeito da mudança do surfactante formador do SAB e da composição global do SAB sobre a distribuição das antocianinas entre as fases do sistema.

2.3 MATERIAS E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

Os reagentes utilizados, com suas respectivas purezas e estruturas químicas, estão listados na tabela 2.2. Água deionizada ($1.00 \mu\text{S cm}^{-1}$) foi utilizada em todos os experimentos.

Tabela 2.2. Estruturas químicas e pureza dos reagentes utilizados.

| Reagente ^a | Fórmula estrutural | Pureza |
|--|--|------------------|
| Triton X-100 / $n = 9,5$ ^b (TX-100) |  | 100% |
| Triton X-165 / $n = 16$ ^b (TX-165) |  | 70% ^c |
| Tween 20 $R = C_{11}H_{23}$ $(w + x + y + z) = 20$ |  | 100% |
| Tween 80 $R = C_{17}H_{33}$ $(w + x + y + z) = 20$ |  | 100% |
| Cloreto de colina (CC) |  | 98% |

*Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich. ^bO índice n representa o número de grupos de óxidos de etileno na cadeia hidrofílica do surfactante. ^cSurfactante fornecido na forma de solução aquosa.

2.3.2 Extração da antocianina a partir do farelo do arroz negro

Antocianinas foram extraídas a partir do farelo do arroz negro fornecido pela empresa Ruzene® (Pindamonhangaba, Brazil), em acordo com metodologia descrita na literatura,⁵² com pequenas modificações. Inicialmente, uma solução extratora foi preparada pela mistura de etanol e solução aquosa de HCl 1,5 mol/L na proporção 85:15 % v/v. Então, uma massa de 15,0000 g do farelo do arroz negro foi pesada em um erlenmeyer de 250 mL, utilizando uma balança analítica (Shimadzu ATX224, com incerteza de 0.0001), e em seguida 170 mL da

solução extratora foram adicionadas ao sistema. A mistura obtida foi mantida sob agitação por 18 h a 25,0 °C e 150 rpm em uma incubadora shaker com controle de temperatura (Tecnal TE-424). Após esse tempo, a suspensão foi transferida para tubos falcon de 50 mL e centrifugada (Excelsa 3 280 - FANEM) a 3000 rpm durante 5 minutos por quatro vezes consecutivas, sendo o sobrenadante recolhido e vertido em novos tubos Falcon após cada etapa de centrifugação. Após essas etapas, o sobrenadante (extrato etanólico de antocianinas) foi recolhido e transferido para um frasco vedado com papel alumínio e devidamente armazenado na geladeira. A figura 2.7 apresenta um fluxograma com as etapas realizadas.

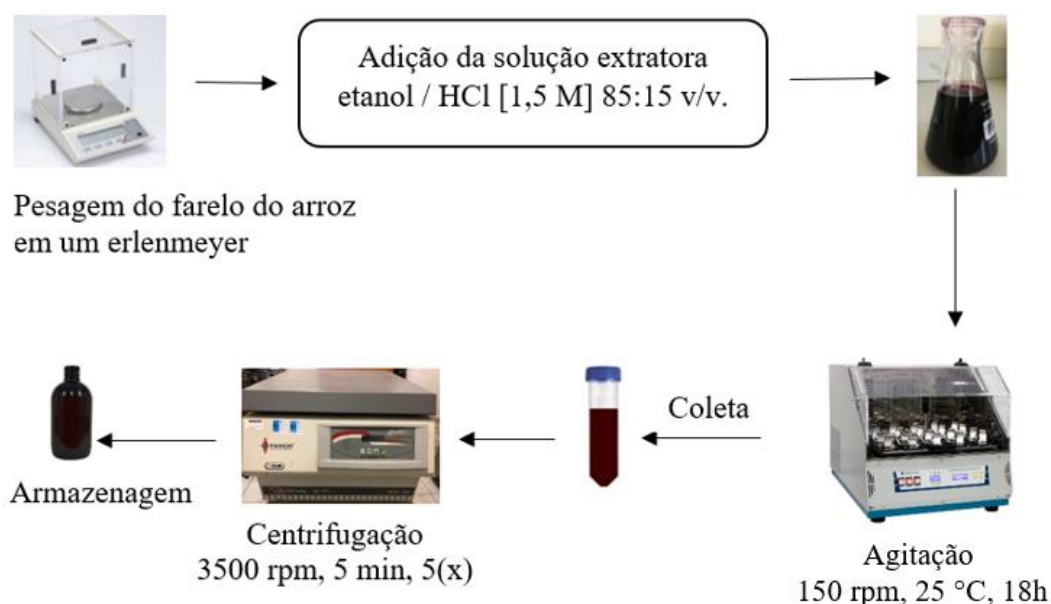


Figura 2.7. Fluxogramas com as etapas realizadas para extração com solvente das antocianinas a partir do farelo do arroz.

Fonte: Própria autora.

2.3.3 Determinação da concentração de antocianinas no extrato

A quantificação de antocianinas totais presentes no extrato etanólico obtido foi realizada pelo método do pH diferencial.⁴⁰ Soluções tampão de KCl 0,025 mol/L em pH 1,0 e ácido acético/acetato de sódio 0,40 mol/L em pH 4,5 foram preparadas e utilizadas no preparo das soluções de antocianina para posterior análise em espectrofotômetro UV-vis. Soluções de antocianina foram preparadas, em triplicata, a partir da diluição de 100 µL da solução do extrato em 10,0 mL de solução tampão (pH 1,0 ou 4,5). Leituras de absorvância das amostras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular de duplo feixe (Shimadzu UV-1800), usando a solução tampão correspondente como branco. Absorvâncias foram medidas em $\lambda = 520$ nm. A correção de dispersão de luz, devido à presença de material disperso, foi feita a

partir das leituras das absorvâncias em 700 nm. A concentração de antocianinas totais no extrato foi determinada pela equação 2.1:

$$C = \frac{A \cdot MM \cdot f \cdot 1000}{\epsilon} \quad (2.1)$$

em que C é a concentração de antocianinas totais no extrato, em mg/L, MM é a massa molar da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol), f é fator de diluição (f = 100), ϵ é a absorvidade molar da antocianina de referência (26.900 M⁻¹cm⁻¹) e A é dado por:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5} \quad (2.2)$$

em que A₅₂₀ e A₇₀₀ são as absorvâncias dos extratos diluídos em 520 e 700 nm, respectivamente, nos valores de pH indicados. A determinação da concentração de antocianinas no extrato foi realizada logo após sua obtenção e também após 2 meses e meio de armazenamento.

2.3.4 Partição das antocianinas nos SABs

Para os estudos de partição de antocianinas, SABs contendo o corante foram preparados a partir da mistura de solução aquosa de líquido iônico, solução de antocianina em surfactante e água, em proporção previamente definida para gerar as composições globais desejadas para cada sistema. Os sistemas escolhidos para este estudo são apresentados na Tabela 2.3. Optamos por SABs formados pelos surfactantes não iônicos TX-100, TX-165, Tween 20 e Tween 80 e o líquido iônico cloreto de colina ao invés dos SABs estudados na primeira parte deste trabalho, tendo em vista os seguintes aspectos: testes iniciais de partição de antocianinas em sistema formado por TX-305 + dihidroxicitrato de colina demonstraram que a presença de antocianina no sistema evitou a formação de duas fases para algumas composições do sistema; a região bifásica de sistemas formados por TX-305 é pequena comparada aos surfactantes escolhidos, o que nos levaria a realizar a partição das antocianinas em sistemas de concentrações globais mais elevadas dos componentes, conseqüentemente gastando uma maior quantidade de reagentes; esse aspecto relaciona-se a outro fator relevante que é a viabilidade econômica de se trabalhar com os líquidos iônicos bitartarato e dihidroxicitrato de colina e surfactante TX-305, que apresentam custos mais elevados quando comparados a TX-100 e cloreto de colina, por exemplo.

Tabela 2.3. Composições globais e CLA, em % m/m, dos sistemas aquosos bifásicos usados nos estudos de partição.

| Sistema | Composição global^a | | CLA | Referência |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|------------|------------------------------------|
| | TX-100 | CC | - | |
| | 16,43 | 31,00 | 36,37 | |
| TX-100 + Cloreto de colina (CC) | 20,75 | 31,76 | 46,54 | |
| | 29,02 | 29,37 | 66,42 | |
| | 40,70 | 24,62 | 94,58 | Silva et al., 2019 ⁵³ |
| | 43,9 | 26,42 | 101,6 | |
| | TX-165 | CC | - | |
| TX-165 + Cloreto de colina (CC) | 38,60 | 28,46 | 91,11 | |
| | 43,43 | 27,97 | 101,3 | |
| | | Tween 20 | CC | - |
| Tween 20 + Cloreto de colina (CC) | 39,16 | 34,06 | 94,70 | |
| | 29,71 | 34,42 | 70,80 | Álvarez et al., 2015 ⁵⁴ |
| | | Tween 80 | CC | |
| Tween 80 + Cloreto de colina (CC) | 42,91 | 32,35 | 102,0 | |
| | 36,35 | 28,76 | 83,00 | |

^a As composições globais se referem ao ponto médio de cada linha de amarração investigada.

A solução de antocianinas em surfactante foi preparada como segue: inicialmente, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, pipetou-se 10,0 mL do extrato etanólico de antocianinas e transferiu-se o volume medido para um béquer envolto com papel alumínio, o qual foi armazenado por dois dias à temperatura ambiente para evaporação do solvente. Após esse tempo, o resíduo no béquer foi solubilizado em aproximadamente 8 g de solução aquosa de surfactante com o auxílio de um bastão de vidro. Para todos os SABs preparados, uma massa de aproximadamente 0,65 g de solução de antocianina em surfactante foi utilizada para preparo do SAB e o restante da quantidade do surfactante necessária para alcançar a composição global do sistema foi adicionada como uma solução do surfactante sem antocianina, mas com a mesma concentração em surfactante da solução de surfactante contendo antocianina. A concentração de antocianinas no SAB foi de 0,12 mg/g. Os sistemas obtidos foram agitados com o vórtex (Tecnal AP56) e posteriormente deixados em repouso por 24 h em um banho termostático (Marconi MA- 184) a 25,0 °C. Após esse tempo, alíquotas das fases superior e inferior foram separadamente coletadas com o auxílio de seringas e diluídas para análise por espectrofotometria no UV-Vis. Para cada SAB avaliado, experimentos foram realizados em duplicata. Os experimentos foram realizados na ausência de luz para evitar possível fotodecomposição das antocianinas.

2.3.5 Quantificação das antocianinas no SAB e cálculo do coeficiente de distribuição

Curvas de calibração para a quantificação das antocianinas nas fases dos SABs foram preparadas conforme descrito a seguir. Um volume de 700 µL do extrato etanólico foi pipetado para um béquer envolto com papel alumínio. O béquer contendo o extrato foi armazenado à temperatura ambiente, por dois dias, para evaporação do solvente. Ao resíduo sólido obtido adicionaram-se 35,0000 g de solvente, o qual consistiu na fase do SAB diluída. Para obtenção deste solvente, preparou-se um SAB da mesma forma como descrito na seção 2.3.4 e recolheu-se suas fases, as quais foram diluídas da mesma quantidade das fases diluídas analisadas no espectrômetro UV-vis. Quando a concentração de surfactante na fase do SAB foi próxima a zero, o solvente para preparo da curva foi uma solução de líquido iônico de concentração igual à concentração de líquido iônico presente na respectiva fase diluída. Análises foram conduzidas nos comprimentos de onda máximo de 514 e 525 nm para as leituras em fase rica em cloreto de colina e rica em surfactante, respectivamente.

O coeficiente de distribuição das antocianinas (K_D) foi calculado de acordo com a equação 2.3, a partir da razão entre as concentrações do soluto na fase rica em surfactante e na fase rica em cloreto de colina, determinadas a partir das respectivas curvas de calibração de cada sistema:

$$K_D = \frac{[AN]_{FRS}}{[AN]_{FRCC}} \quad (2.3)$$

em que $[AN]_{FRS}$ e $[AN]_{FRCC}$ são as concentrações de antocianina nas fases ricas em surfactante e em líquido iônico, respectivamente. Os resultados foram expressos como os valores médios das duas determinações realizadas.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.4.1 Concentração de antocianinas totais no extrato de antocianinas

A partir do método do pH diferencial, a concentração de antocianinas totais no extrato etanólico obtido, logo após sua obtenção, foi igual a 611 ± 8 mg/L. Após 2 meses e meio, em que uma nova quantificação de antocianinas no extrato foi realizada, a concentração de antocianinas totais permaneceu constante (612 mg/L), indicando que as antocianinas foram estáveis durante esse período, no qual os experimentos foram conduzidos. O extrato obtido e quantificado com relação à concentração de antocianinas totais foi usado como fonte de antocianinas para os experimentos de partição do corante.

2.4.2 Partição das antocianinas do arroz negro nos SABs

A figura 2.8 ilustra a distribuição das antocianinas do arroz negro entre as duas fases dos SABs formados por Triton X-100 + cloreto de colina + água e Tween 20 + cloreto de colina + água, a 25,0 °C.

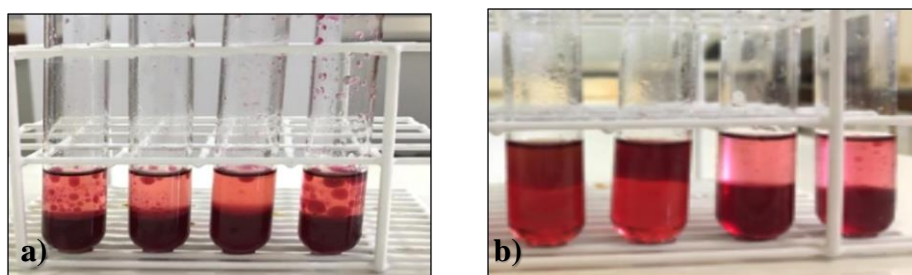


Figura 2.8. Distribuição das antocianinas nos SABs: (a) Sistemas TX-100 + cloreto de colina + água em diferentes concentrações dos componentes formadores do sistema (concentração global aumenta da esquerda para a direita); (b) Sistemas de Tween 20 + cloreto de colina + água em diferentes concentrações dos componentes formadores do sistema (sistemas em duplicata, com diminuição da concentração global da esquerda para a direita).

Em todos os sistemas investigados, as antocianinas se concentraram preferencialmente na fase rica em surfactante. No caso dos sistemas formados por Triton X + cloreto de colina + água, essa foi a fase inferior do SAB, enquanto para os sistemas formados por Tween + cloreto de colina + água, essa fase foi ora a fase inferior, ora a fase superior, dependendo da linha de amarração do SAB. Interessantemente, na ausência da antocianina, a fase rica em surfactante dos SABs formados por Tween e cloreto de colina avaliados é invariavelmente a fase superior do sistema,⁵⁴ entretanto a presença de componentes provenientes do extrato de antocianina

promoveu a inversão de fases do SAB para uma das condições avaliadas, levando ao comportamento observado na figura 2.8 b. Esse comportamento sugere que a presença dos componentes do extrato alterou as propriedades termodinâmicas dos SABs estudados. Entretanto, as fases do SAB continuaram suficientemente distintas para permitir uma transferência preferencial das antocianinas para uma das fases do sistema.

A fim de determinar o coeficiente de distribuição das antocianinas nos diferentes SABs avaliados, fez-se a quantificação das antocianinas nas fases, sendo inicialmente realizado uma avaliação dos espectros UV-vis das diferentes fases do SAB contendo as antocianinas. A figura 2.9 apresenta os espectros UV-vis das fases superior e inferior diluídas de 10 e 40 vezes, respectivamente, do SAB formado por Triton X-165 + cloreto de colina + água (CLA = 91,11 % m/m) a 25,0 °C, após o experimento de partição das antocianinas.

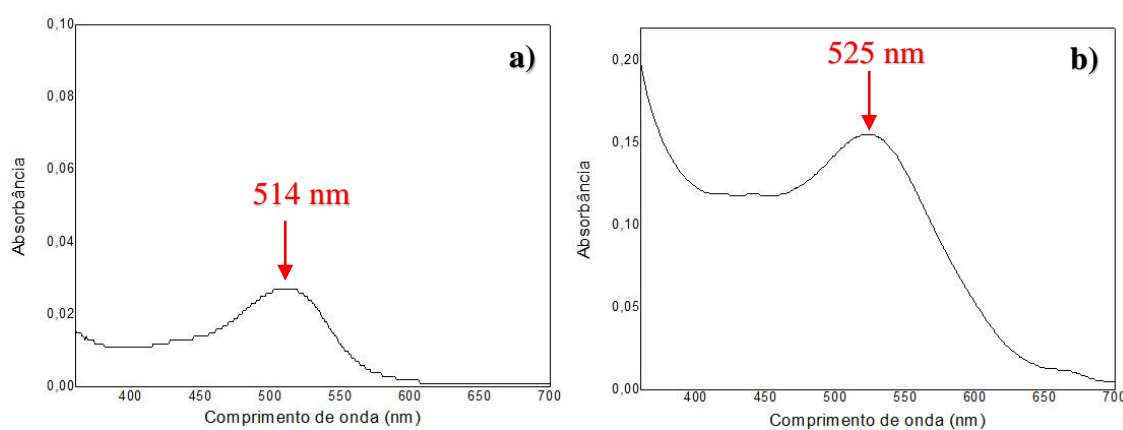


Figura 2.9. Espectros de absorbância das fases diluídas para o sistema Triton X-165 + cloreto de colina à 25 °C: (a) fase rica em cloreto de colina diluída de 10 vezes e (b) fase rica em surfactante diluída de 40 vezes.

Como pode ser observado, ambos os espectros apresentam uma banda larga em torno de 520 nm, que está em acordo com o espectro de soluções contendo antocianinas.⁵² Entretanto, os espectros nas FRS e FRCC são distintos entre si, com o máximo da banda no espectro da fase rica em surfactante deslocado para um comprimento de onda maior em comparação ao máximo da banda no espectro da fase rica em cloreto de colina. Esse comportamento pode ser atribuído à uma diferença de pH entre as fases do SAB⁵⁵ e à solubilização das antocianinas no interior do núcleo hidrofóbico das micelas do surfactante, que alterou o ambiente químico ao redor das moléculas de antocianinas e, conseqüentemente, a diferença de energia entre seus níveis eletrônicos.

Para determinar as concentrações de antocianinas nas fases do SAB, foram obtidas curvas de calibração em fases rica em surfactante e rica em cloreto de colina diluídas, para os diferentes sistemas investigados e em condições termodinâmicas distintas. A tabela 2.4

apresenta as equações da reta e os coeficientes de determinação, obtidos da regressão linear dos dados de absorvância versus concentração de antocianina, para as diferentes composições do solvente em que a curva de calibração foi preparada.

Tabela 2.4. Equações da reta e coeficientes de determinação (R^2) para as regressões lineares realizadas com os dados de absorvância versus concentração de antocianina, para diferentes composições do solvente em que a curva de calibração foi preparada.

| Fase | Sistema | Composição do solvente | Curva de calibração | R^2 |
|-------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------|
| FRCC | TX-100 + CC (CLA 1) * | Solução de CC 1,55 % m/m | Abs = 13,77[AN] – 0,0026 | 0,9998 |
| | TX-165 + CC (CLA 1) * | Solução de CC 5,3 % m/m | Abs = 12,448[AN] – 0,0008 | 0,9996 |
| | Tween 20 + CC (CLA 2) | Fase diluída de 10 vezes | Abs = 24,892[AN] – 0,0009 | 0,9995 |
| | Tween 80 + CC (CLA 2) | | Abs = 23,238[AN] – 0,0017 | 0,9996 |
| FRS | TX-100 + CC (CLA 1) | | Abs = 11,814[AN] – 0,0009 | 0,9998 |
| | TX-100 + CC (CLA 2) | Fase diluída de 40 vezes | Abs = 12,153[AN] – 0,0013 | 0,9991 |
| | TX-100 + CC (CLA 5) | | Abs = 11,448[AN] – 0,0029 | 0,9984 |
| | TX-165 + CC (CLA 1) | | Abs = 11,178[AN] – 6E-05 | 0,9997 |
| | Tween 20 + CC (CLA 2) | Fase diluída de 15 vezes | Abs = 11,469[AN] – 0,0006 | 0,9989 |
| | Tween 80 + CC (CLA 2) | Fase diluída de 5 vezes | Abs = 13,076[AN] – 0,001 | 1,0000 |

* O solvente utilizado no preparo da curva de calibração foi uma solução de CC de concentração igual à concentração do líquido iônico nas FRCC diluídas de 25 vezes para o sistema de TX-100 e de 10 vezes para o sistema de TX-165. Esse procedimento foi adotado desde que a concentração do surfactante nas respectivas fases foi muito próxima a zero.

No geral, o modelo de regressão linear se ajustou bem às curvas de calibração, com valores de coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,9984. Além disso, pode ser observado que os parâmetros de ajuste das curvas de calibração obtidas em solvente formado por FRS diluída foram bastante próximas entre si, independentemente do surfactante utilizado e da composição da fase diluída. Esses parâmetros foram semelhantes àqueles obtidos para as

curvas de calibração preparadas usando como solvente soluções de cloreto de colina em diferentes concentrações (correspondentes à composição de FRCC para SABs formados por TX-100 + cloreto de colina + água e TX-165 + cloreto de colina + água, para os quais as concentrações de surfactante naquela fase são próximas a zero), mas foram distintos daqueles obtidos para as curvas de calibração preparadas em FRCC diluída a partir dos SABs formados por Tween.

As curvas da tabela 2.4 foram utilizadas no cálculo das concentrações de antocianina nas respectivas fases dos SABs estudados e o coeficiente de distribuição (K_D) das antocianinas em cada sistema foi determinado a partir da equação 2.3. Para os sistemas constituídos por TX-100, a curva de calibração utilizada para determinação da [AN] em todas as FRCC foi aquela obtida na composição da respectiva fase diluída do CLA 2, $Abs = 12,153[AN] - 0,0013$. Os valores de K_D obtidos para os sistemas estudados são apresentados na tabela 2.5.

Tabela 2.5. Coeficiente de distribuição das antocianinas.

| SAB | CLA / % m/m | K_D |
|------------------------------|-------------|----------------|
| TX-100 + cloreto de colina | 36,37 | $9,6 \pm 0,1$ |
| | 46,54 | 12 ± 1 |
| | 66,42 | 11 ± 0 |
| | 94,58 | 10 ± 1 |
| | 101,6 | $6,5 \pm 0,1$ |
| TX-165 + cloreto de colina | 91,11 | $8,1 \pm 0,1$ |
| | 101,4 | $4,5 \pm 0,3$ |
| Tween 20 + cloreto de colina | 94,70 | $1,1 \pm 0,0$ |
| | 70,80 | 24 ± 0 |
| Tween 80 + cloreto de colina | 102,0 | $1,9 \pm 0,01$ |
| | 83,00 | 31 ± 1 |

Para todos os SABs investigados, os valores de K_D foram superiores à unidade, indicando que as espécies de antocianina extraídas do arroz negro foram preferencialmente concentradas na FRS. Essa preferência é atribuída principalmente à solubilização das moléculas de antocianina nas micelas de surfactante presentes em elevada quantidade naquela fase. Devido ao caráter anfipático das moléculas de antocianina, a hipótese mais provável é que as moléculas de antocianina tenham sido solubilizadas na região entre o núcleo hidrofóbico e a coroa hidrofílica das micelas, maximizando tanto a interação da região hidrofóbica das

moléculas de antocianina com o núcleo da micela quanto a interação da região hidrofílica das moléculas de antocianina com a coroa da micela.

Estudos de partição de antocianinas encontrados na literatura também revelam a partição preferencial das antocianinas para uma das fases do SAB. Patrício¹³ observou que antocianina de fonte comercial se concentra preferencialmente para a fase rica em polímero de SABs formados por polietileno glicol (PEG) e eletrólito, sendo os valores de coeficiente de partição para antocianinas nesses sistemas superiores a 1, variando entre 1,1 e 89,2. Resultados similares foram encontrados por Jampini e Raghavarao,⁵⁶ que mostraram que as antocianinas do jambolão se concentram majoritariamente na fase rica em PEG de SABs formados por PEG e sal de sulfato (sulfato de amônio, magnésio ou sódio). Em trabalho posterior,⁵⁷ os mesmos autores observaram que as antocianinas do repolho roxo (*Brassica oleracea L.*) também foram concentradas na mesma fase daqueles sistemas. Coeficientes de partição da antocianina iguais a 10,54, 32,04, 9,16 e 6,16 foram encontrados para sistemas formados por PEG e sulfato de magnésio, com massas molares de PEG iguais a 1000, 6000, 8000 e 20000 g/mol, respectivamente.

2.4.3 Efeito da mudança de parâmetros do SAB sobre K_D

Com base nos dados apresentados na tabela 2.5 podemos estabelecer alguns efeitos da mudança de algumas das propriedades do SAB sobre o comportamento de distribuição das antocianinas entre as fases do sistema. A figura 2.10 apresenta o efeito da composição do SAB (expresso em termos do parâmetro CLA) e da natureza do surfactante sobre a distribuição das antocianinas nos sistemas Triton X (TX-100 ou TX-165) + cloreto de colina + água e Tween (20 ou 80) + cloreto de colina + água, à 25 °C.

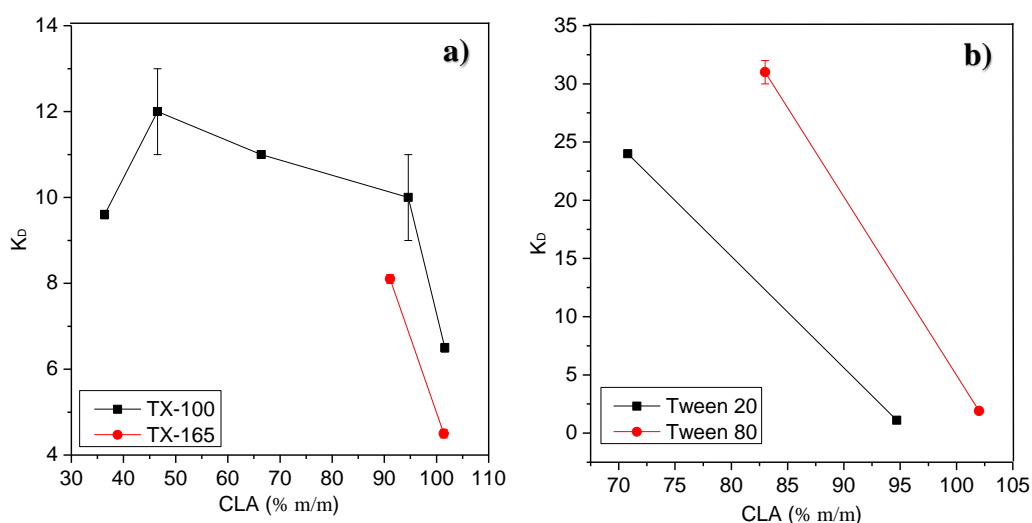


Figura 2.10. Efeito do CLA sobre o coeficiente de distribuição das antocianinas do arroz negro em SAB: (a) Triton X (TX-100 ou TX-165) + cloreto de colina + água, à 25,0 °C; (b) Tween (20 ou 80) + cloreto de colina + água, à 25,0 °C. A inversão de fases foi observada apenas para o primeiro CLA desses sistemas.

É possível observar que para o sistema formado por TX-100, o aumento do CLA alterou pouco o comportamento de distribuição das antocianinas no SAB. Inicialmente foi observado um aumento de K_D quando o CLA aumentou de 36,37 para 46,54 % m/m e então, o aumento no valor do CLA promoveu uma diminuição nos valores de K_D . Por outro lado, nos sistemas formados por TX-165 (2.10a) e Tween (20 ou 80) (2.10b), o aumento do CLA levou à diminuição dos valores de K_D . Esse é um resultado interessante, pois um aumento nos valores de K_D poderia ser esperado com o aumento do CLA, uma vez que o aumento do CLA leva ao aumento da concentração de surfactante, e conseqüentemente de micelas, na FRS, podendo solubilizar uma maior quantidade do corante. Entretanto, o aumento do CLA também promove uma redução elevada no conteúdo de água na respectiva fase, sugerindo que as moléculas de água também devem ter um papel importante na estabilização de uma fração das antocianinas presentes na FRS. Esses resultados são distintos daqueles encontrados na literatura envolvendo o estudo de partição de antocianinas em outros SABs no qual o aumento do CLA promove o aumento da transferência do corante para a fase em que ele se transfere preferencialmente.^{13,58}

Além do efeito do CLA sobre o comportamento de distribuição das antocianinas no SAB, podemos avaliar o efeito da mudança do surfactante sobre este comportamento ao comparar os valores de K_D para os diferentes sistemas em um valor de CLA próximo. Para sistemas formados por surfactantes da família Triton X, podemos observar que a substituição do surfactante TX-100 por TX-165 leva a uma diminuição dos valores de K_D ao compararmos os valores de CLA de 94,58 e 101,6 % m/m dos sistemas de TX-100 com os valores de CLA de 91,11 e 101,4 % m/m dos sistemas de TX-165, respectivamente (Tabela 2.5 e figura 2.10a), indicando um maior potencial dos sistemas de TX-100 (mais hidrofóbico) para extrair as antocianinas para a FRS do SAB em comparação aos sistemas de TX-165 (menos hidrofóbico). Para os sistemas formados por Tween, apesar de os valores de CLA em que os estudos de partição foram conduzidos não serem muito próximos, a tendência na figura 2.10b indica que os valores de K_D são maiores no SAB formado por Tween 80, o qual apresenta uma maior hidrofobicidade que o surfactante Tween 20. Esse comportamento é similar ao observado nos sistemas de Triton X, indicando que de forma geral o aumento da hidrofobicidade do surfactante favorece a transferência das antocianinas para a FRS.

2.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi conduzida uma investigação sobre o potencial de SABs formados por surfactantes não iônicos (TX-100, TX-165, Tween 20 ou Tween 80) e cloreto de colina para extrair/purificar antocianinas do farelo do arroz negro. Para todos os SABs investigados as espécies de antocianina extraídas do farelo do arroz negro foram preferencialmente transferidas para a FRS do SAB. Valores de K_D mais elevados para sistemas formados por TX-100 e Tween 80 indicaram que uma maior hidrofobicidade do surfactante favorece a partição preferencial do corante para a FRS, como resultado da solubilização das moléculas de antocianinas nas micelas de surfactante. A diminuição do coeficiente de distribuição das antocianinas com o aumento do CLA sugeriu o envolvimento das moléculas de água na estabilização das antocianinas presentes na FRS. Como uma investigação inicial do comportamento de partição das antocianinas do farelo do arroz negro nos sistemas avaliados, este trabalho demonstrou o potencial de SABs formados por surfactantes não iônicos e cloreto de colina para serem aplicados em processos de extração/purificação daqueles compostos.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Delamare, F.; Guineau, B. *Colors7: The Story of Dyes and Pigments*, 2000.
- (2) Schiozer, A. L.; Barata, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. *Revista Fitos* **2013**, *3*, 6–24.
- (3) Pinto, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química dos produtos naturais brasileira. *Química Nova* **1995**, *18*, 608–615.
- (4) Ngamwonglumlert, L.; Devahastin, S.; Chiewchan, N. Natural colorants: pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57*, 3243–3259.
- (5) Bender, M. Colors for textiles: ancient and modern. *Journal Chemical Education* **1947**, *24*, 2–10.
- (6) Bafana, A.; Devi, S. S.; Chakrabarti, T. Azo dyes: past, present and the future. *Environmental Reviews* **2011**, *19*, 350–371.
- (7) Ma, L.; Dolphin, D. The metabolites of dietary chlorophylls. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 195–202.
- (8) Delgado-Vargas, F.; Jiménez, AR.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2000**, *40*, 173–289.
- (9) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. d. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 859–871.
- (10) 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* **2011**, *44*, 499–509.
- (11) Sun, J.; Chu, Y.-F.; Wu, X.; Liu, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 7449–7454.
- (12) Pascual-Teresa, S. d.; Moreno, D. A.; García-Viguera, C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*, 1679–1703.
- (13) Patrício, P. da R. Extração e purificação de antocianinas utilizando sistemas aquosos bifásicos. **2012**.
- (14) Sipahli, S.; Mohanlall, V.; Mellem, J. J. Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. sabdariffa*. *Food Science Technology* **2017**, *37*, 209–215.
- (15) Pedro, A. C.; Granato, D.; Rosso, N. D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry* **2015**, *191*, 12–20.
- (16) Terzi, D. B. L.; Rossi, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução? *Química Nova* **2002**, *25*, 684–688.
- (17) Kirca, A.; Özkan, M.; Cemerog˘lu, B. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chemistry* **2006**, *97*, 598–605.
- (18) Nascimento, S. S. da C. Antocianinas de jambolão (*Syzygium cumini*): comparação de diferentes métodos de extração e avaliação da estabilidade frente a pH, tempo e temperatura. **2017**.
- (19) Markakis, P. *Stability of anthocyanins in foods*. 1982.
- (20) Turker, N.; Aksay, S.; Ekiz, H. I. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carotavar. L.*) beverage: shalgam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3807–3813.
- (21) Fracassetti, D.; Del Bo', C.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Klimis-Zacas, D.; Ciappellano, S. Effect of time and storage temperature on anthocyanin decay and antioxidant activity in wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2999–3005.

- (22) Sui, X.; Dong, X.; Zhou, W. Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry* **2014**, *163*, 163–170.
- (23) Nuryanti, S.; Matsjeh, S.; Anwar, C.; Raharjo, T. J. Isolation anthocyanin from roselle petals (*Hibiscus sabdariffa* L) and the effect of light on the stability. *Indonesian Journal of Chemistry* **2012**, *12*, 167–171.
- (24) Janna, O. A.; Khairul, A. K.; Maziah, M. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecantara* L. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1640–1646.
- (25) Daravingas, G.; Cain, R. F. Thermal degradation of black raspberry anthocyanin pigments in model system. *Journal of Food Science* **1968**, *33*, 138–142.
- (26) Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 170–176.
- (27) Gris, E. F.; Ferreira, E. A.; Falcão, L. D.; Bordignon-Luiz, M. T. Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 1289–1296.
- (28) Charurungsipong, P.; Tangduangdee, C.; Amornraksa, S.; Asavasanti, S.; Lin, J. Improvement of anthocyanin stability in butterfly pea flower extract by co-pigmentation with catechin. *E3S Web of Conferences* **2020**, *141*, 03008.
- (29) Castañeda-Ovando, A.; Galán-Vidal, C. A.; Pacheco-Hernández, M. de L.; Rodríguez, J. A.; Páez-Hernández, M. E. Metal content evaluation and its effects on the stability of anthocyanins. *CyTA – Journal of Food* **2009**, *7*, 225–232.
- (30) Bimpilas, A.; Panagopoulou, M.; Tsimogiannis, D.; Oreopoulou, V. Anthocyanin copigmentation and color of wine: the effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry* **2016**, *197*, 39–46.
- (31) Liazid, A.; Guerrero, R. F.; Cantos, E.; Palma, M.; Barroso, C. G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry* **2011**, *124*, 1238–1243.
- (32) Vanini, L. S.; Hirata, T. A. M; Kwiatkowski, A.; Clemente, E. Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). *Brazilian Journal of Food Technology* **2009**, *12*, 213–219.
- (32) Kerio, L. C.; Wachira, F. N.; Wanyoko, J. K.; Rotich, M. K. Characterization of anthocyanins in kenyan teas: extraction and identification. *Food Chemistry* **2012**, *131*, 31–38.
- (33) Rodriguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **2001**, *00*, F1.1.1–F1.1.11.
- (34) Ghiseli, 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* **1998**, *46*, 361–367.
- (35) Jaramillo, K.; Dawid, C.; Hofmann, T.; Fujimoto, Y.; Osorio, C. Identification of antioxidative flavonols and anthocyanins in *Sicana odorifera* fruit peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 975–983.
- (36) Fedenko, V. S.; Shemet, S. A.; Landi, M. UV–vis spectroscopy and colorimetric models for detecting anthocyanin-metal complexes in plants: an overview of in vitro and in vivo techniques. *Journal of Plant Physiology* **2017**, *212*, 13–28.
- (37) Tian, Q.; Aziz, R. M.; Stoner, G. D.; Schwartz, T. J. Anthocyanin determination in black raspberry (*Rubus occidentalis*) and biological specimens using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Food Science* **2005**, *70*, C43–C47.
- (38) Chalbot, M.-C. G.; Kavouras, I. G. Nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the functional content of organic aerosols: a review. *Environmental Pollution* **2014**, *191*, 232–249.

- (39) Valls, J.; Millán, S.; Martí, M. P.; Borràs, E.; Arola, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 7143–7172.
- (40) Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical* **2001**, *00*, F1.2.1–F1.2.13.
- (41) 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* **2011**, *129*, 443–453.
- (42) Liu, X.; Mu, T.; Sun, H.; Zhang, M.; Chen, J. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 3042–3041.
- (43) Sang, J.; Dang, K.; Ma, Q.; Li, B.; Huang, Y.; Li, C. Partition behaviors of different polar anthocyanins in aqueous two-phase systems and extraction of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. and *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Analytical Methods* **2018**, *11*, 980–991.
- (44) Wu, Y.; Wang, Y.; Zhang, W.; Han, J.; Liu, Y.; Hu, Y.; Ni, L. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology* **2014**, *124*, 170–178.
- (45) Nainegali, B. S.; Iyyaswami, R.; Belur, P. D. Simultaneous extraction of four different bioactive compounds from *Garcinia indica* and their enrichment using aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing* **2019**, *114*, 185–195.
- (46) Siqueira, A. C. de A. Partição de antocianinas do açaí por meio de sistemas aquosos bifásicos. **2018**.
- (47) Walter, M.; Marchezan, E.; de Avila, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural* **2008**, *38*, 1184–1192.
- (48) Rathna Priya, T. S.; Eliazar Nelson, A. R. L.; Ravichandran, K.; Antony, U. Nutritional and functional properties of coloured rice varieties of South India: a review. *Journal of Ethnic Foods* **2019**, *6*, 1–11.
- (49) Sompong, R.; Siebenhandl-Ehn, S.; Linsberger-Martin, G.; Berghofer, E. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* **2011**, *124*, 132–140.
- (50) Hiemori, M.; Koh, E.; Mitchell, A. E. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. japonica var. SBR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 1908–1914.
- (51) Fernandes, T. S. Processo verde para aproveitamento de subprodutos e resíduos do beneficiamento do arroz negro: uma alternativa para extração de antocianinas. **2019**.
- (52) Francis, F. J. *Analysis of anthocyanins*, in: Markakis, P. (Ed.) *Anthocyanins As Food Colors*, 1982.
- (53) Silva, S. J. B. e; Ferreira, G. M. D.; de Lemos, L. R.; Rodrigues, G. D.; Mageste, A. B. Liquid-Liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of nonionic surfactante (Triton X-100, Triton X-165, or Triton X-305) and choline chloride. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2019**, *64*, 1632–1639.
- (54) Álvarez, M. S.; Esperança, J. M. S. S.; Deive, F. J.; Sanromán, M. Á.; Rodríguez, A. A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. *Separation and Purification Technology* **2015**, *153*, 91–98.
- (55) Silva, F. A. e; Carmo, R. M. C.; Fernandes, A. P. M.; Kholany, M.; Coutinho, J. A. P.; Ventura, S. P. Using ionic liquids to tune the performance of aqueous biphasic systems based on pluronic L-35 for the purification of naringin and rutin. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **2017**, *5*, 6409–6419.
- (56) Jampini, C.; Naik, A.; Raghavarao, K. S. M. S. Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption. *Separation and Purification Technology* **2014**, *125*, 170–178.

- (57) Jampini, C.; Raghavarao, K. S. M. S. Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology* **2015**, *151*, 57–65.
- (58) 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_4)₂SO₄, ZnSO₄, and K₂HPO₄): experimental and correlation. *Fluid Phase Equilibria* **2011**, *305*, 19–24.
- (59) 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* **2009**, *1216*, 7623–7629.

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução deste trabalho permitiu estabelecer na literatura novas combinações de substâncias capazes de formar sistemas aquosos bifásicos, particularmente combinações entre surfactantes não iônicos e líquidos iônicos à base do cátion colina. Desta forma, este trabalho contribui para a consolidação da área de estudos envolvendo SABs formados por estas substâncias. Tais sistemas despertam grande atenção pela natureza biocompatível de seus componentes e sua reduzida toxicidade, o que aumenta o impacto de sua utilização em processos de purificação/extração de solutos e em metodologias de remediação ambiental.

A aplicação de SABs daquela natureza no estudo de partição de antocianinas do farelo do arroz negro permitiu apresentar os sistemas investigados como uma alternativa simples e ambientalmente amigável no desenvolvimento de etapas de extração/purificação daquelas substâncias, o que permitiria agregar valor a um resíduo proveniente do beneficiamento do arroz negro. Sob este aspecto, os resultados obtidos neste estudo significam um passo inicial importante para o início de novos estudos avaliando a estabilidade das antocianinas nas fases dos SABs, realizando análises cromatográficas do extrato e das fases dos SABs contendo as antocianinas, avaliando o efeito de outros sais de colina na partição das antocianinas nos SABs e sobretudo, apresentando uma proposta para viabilizar a recuperação das antocianinas a partir das fases dos SABs estudados. Esses são aspectos fundamentais a serem abordados a fim de avaliar a viabilidade de utilização daqueles sistemas no desenvolvimento de metodologias de extração/purificação de antocianinas.



PPGQUIM/UFOP

Lohayne Lígya Barbosa Silva

2021