

Universidade Federal do Rio Grande

**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ANTOCIANINAS A PARTIR DO JAMBOLÃO
(*Eugenia jambolana*) E DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea*) ATRAVÉS
DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB) NÃO CONVENCIONAL**

Gabrielle Guimarães Izaguirres

2018



**PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ANTOCIANINAS A PARTIR DO JAMBOLÃO
(*Eugenia jambolana*) E DE REPOLHO ROXO (*Brassica oleracea*) ATRAVÉS
DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB) NÃO CONVENCIONAL**

Gabrielle Guimarães Izaguirres

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
do Rio Grande como parte dos
requisitos necessários à graduação
em Engenharia Agroindustrial
Agroquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Francine
Antelo

Santo Antônio da Patrulha

Dezembro de 2018

RESUMO

O primeiro contato do consumidor com um produto, geralmente, é com a apresentação visual, onde se destacam a cor e a aparência. A coloração é a primeira qualidade sensorial pelo qual os alimentos são julgados e, portanto, amplamente utilizada na indústria alimentícia para atender as expectativas dos consumidores. Principalmente, devido à toxicidade de corantes sintéticos e à proibição do uso de alguns deles, há um crescente interesse por corantes obtidos a partir de fontes naturais. Com isso, as antocianinas ganharam destaque nos últimos anos, como um potencial corante natural de uso alimentício, especialmente, devido às suas propriedades antioxidantes, potencialmente benéficas à saúde. Para viabilizar seu uso na indústria, o sistema aquoso bifásico (SAB) é uma alternativa de purificação econômica, formado por duas fases imiscíveis que permite a remoção de contaminantes em um meio atóxico. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos fatores do meio para a extração de antocianinas a partir de SAB não convencional formado por etanol e fosfato de sódio. As variáveis respostas obtidas com o planejamento experimental e que permitiram determinar a região que promoveu a maior partição do composto de interesse foram: coeficiente de partição (K), recuperação absoluta (R1) e recuperação relativa (R2). Os melhores resultados para o extrato de jambolão foram verificados no SAB composto por 26% de álcool e 25% de sal, com valores de $K = 221$, $R1 = 68,9\%$ e $R2 = 99,6\%$. Para o extrato de repolho roxo foram obtidos os valores de $K = 35,6$, $R1 = 66\%$ e $R2 = 97,7\%$ no SAB composto por 28% de álcool e 27% de sal. Dado o êxito na partição das antocianinas de ambos os extratos, o SAB não convencional mostrou-se como uma alternativa viável e econômica para a obtenção destes corantes naturais.

Palavras-chave: Corante natural; Flavonóides; Fruto; Hortalíça; Fracionamento líquido-líquido; Etanol; Fosfato de sódio.

ABSTRACT

The first consumer contact with a product is usually with the visual presentation, where the color and the appearance stand out. Coloring is the first sensory quality by which foods are judged and therefore widely used in the food industry to meet consumers' expectations. Mainly because of the toxicity of synthetic dyes and the ban on the use of some of them, there is a growing interest in dyes obtained from natural sources. With this, anthocyanins have gained prominence in recent years, as a potential natural food coloring dye, especially due to its antioxidant properties, potentially beneficial to health. To make it feasible to use in the industry, the biphasic aqueous system (SAB) is an economical purification alternative, formed by two immiscible phases that allows the removal of contaminants in a non-toxic medium. In this context, the objective of this work was to verify the influence of the environmental factors for the extraction of anthocyanins from non-conventional SAB formed by ethanol and sodium phosphate. The response variables obtained with the experimental design were: partition coefficient (K), absolute recovery (R1) and relative recovery (R2). The best results for the jambolan extract were verified in SAB composed of 26% alcohol and 25% salt, with values of $K = 221$, $R1 = 68.9\%$ and $R2 = 99.6\%$. The values of $K = 35.6$, $R1 = 66\%$ and $R2 = 97.7\%$ were obtained in the SAB composed of 28% alcohol and 27% salt. Given the success in the partitioning of the anthocyanins from both extracts, the unconventional SAB proved to be a viable and economical alternative to obtain these natural dyes.

Keywords: Natural dye; Flavonoids; Fruit; Vegetables; Liquid-liquid fractionation; Ethanol; Sodium phosphate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 PAPEL DA COR NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	8
3.2 CORANTES ALIMENTÍCIOS	9
3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS CORANTES	10
3.3.1 CORANTES ARTIFICIAIS	11
3.3.2 CORANTES NATURAIS.....	12
3.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PERTINENTE AOS CORANTES	13
3.5 ANTOCIANINAS	14
3.5.1 FONTE DE ANTOCIANINAS.....	15
3.5.1.1 JAMBOLÃO	16
3.5.1.2 REPOLHO ROXO	17
3.6 SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB).....	19
3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	24
4.1 COLETA DO MATERIAL	24
4.2 EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS	24
4.3 PREPARO DO SAB PARA PURIFICAÇÃO PARCIAL.....	25
4.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	25
4.5 CONCENTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS	28
4.6 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO.....	28

4.7 RECUPERAÇÃO ABSOLUTA E RECUPERAÇÃO RELATIVA DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 JAMBOLÃO.....	30
5.1.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^4 + 4 PONTOS CENTRAIS.....	30
5.1.2 DCCR 2^3 + 6 PONTOS AXIAIS + 4 PONTOS CENTRAIS.....	36
5.2 REPOLHO ROXO	46
5.2.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^4 + 4 PONTOS CENTRAIS.....	46
5.2.2 DCCR 2^4 + 8 PONTOS AXIAIS + 4 PONTOS CENTRAIS.....	50
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO.....	61
6. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A alimentação, além de necessária à saúde, é uma fonte de prazer. A idéia de consumo dos produtos dá-se, primeiramente, pelo sentido da visão. Alimentos coloridos, vistosos, são mais atraentes para o consumidor, e a cor deve-se, sobretudo, a presença de corantes. A cor é associada a muitos aspectos de nossa vida, influenciando nossas decisões, sobretudo as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos são todas afetadas pela cor (SOUZA, 2012).

Segundo dados corroborados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2017), há um crescente interesse por corantes obtidos a partir de fontes naturais, principalmente devido à toxicidade de corantes sintéticos e à proibição do uso de alguns deles. É comum relatos de casos de alergias a corantes artificiais, especialmente entre crianças e idosos. Além de ser um importante atributo nas decisões de escolha, os corantes também são utilizados para restituir a aparência do produto pós-processamento, agregando valor nutricional.

Nesse contexto, as antocianinas ganharam destaque nos últimos anos, especialmente devido às suas propriedades antioxidantes, potencialmente benéficas à saúde. A demanda por consumo de frutas e hortaliças tem aumentado sistematicamente nos últimos anos, especialmente aquelas com elevado teor de compostos bioativos. Nesse cenário, o Brasil tem grande vantagem diante de alguns países, por causa da variedade disponível, como jambolão e o repolho roxo, por exemplo, fontes ricas em antocianinas. De acordo com a EMBRAPA (2017), o uso destes como matéria-prima para a obtenção de um insumo agroindustrial pode também contribuir para a preservação e valorização da biodiversidade brasileira.

As antocianinas são pigmentos vegetais, responsáveis por uma grande variedade de cores observadas em flores, frutos, algumas folhas, caules e

raízes de plantas, que podem variar do vermelho vivo ao violeta/azul. Quimicamente, esses pigmentos são compostos fenólicos, solúveis em água, pertencentes ao grupo dos flavonóides, pigmentos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal. (CASTANEDA, 2009).

Contudo, como um potencial corante natural de uso alimentício, se faz necessário purificar o extrato, assim como determinar as condições para esse processamento. Uma alternativa econômica que pode propiciar uma purificação parcial desse tipo de substância é o sistema aquoso bifásico (SAB) não convencional, sistema versátil, simples e eficiente, formado quando duas soluções aquosas incompatíveis são misturadas, acima da concentração crítica, havendo a formação de um sistema de duas fases líquidas distintas. Um exemplo é o SAB formado por etanol e fosfato de sódio.

Nesse cenário, o planejamento experimental mostra-se uma ferramenta adequada para explorar as melhores condições para purificação parcial das antocianinas do jambolão e do repolho roxo em SAB, visto que minimiza tempo e custos variando simultaneamente todas as variáveis que possam influenciar o processo, dentro de um intervalo determinado. Dessa forma, propiciar um cenário ótimo para purificar parcialmente as antocianinas do jambolão e do repolho roxo em um sistema simples e econômico, que permita a obtenção de alta partição e recuperações absoluta e relativa, irá colaborar com o incentivo do uso do extrato na indústria alimentícia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar parcialmente as antocianinas de jambolão e repolho roxo através de sistema aquoso bifásico (SAB) não convencional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência da concentração de etanol, fosfato de sódio, tempo e temperatura na partição, recuperação absoluta e recuperação relativa das antocianinas de jambolão e repolho roxo através de planejamento fatorial completo.
- Realizar o Delineamento Composto Central Rotacional para indicar, dentro do cenário proposto, as melhores condições para a purificação parcial de antocianinas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PAPEL DA COR NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A coloração é a primeira qualidade sensorial pelo qual os alimentos são julgados e, portanto, amplamente utilizada na indústria alimentícia para atender as expectativas dos consumidores, que usualmente associam cor ao sabor, olfato ou qualidade do produto. Por essa razão, o setor alimentício preocupa-se tanto com a aplicação de cores (através do uso de corantes) e obtenção de alimentos que agradem o consumidor, pois além de necessária para sobrevivência, a alimentação também é fonte de prazer e satisfação. (KAPOR, 2001; CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002).

O primeiro contato do consumidor com um produto, geralmente, é com a apresentação visual, onde se destacam a cor e a aparência. Todo produto possui uma aparência e uma cor esperadas que são associadas às reações subjetivas de aceitação, indiferença ou rejeição. Dessa forma, poderá ocorrer extrema relutância caso exista diferença de tonalidade ou intensidade de cor em um produto conhecido por essa característica sensorial (FERREIRA et al., 2000).

Na indústria alimentícia, a cor está se tornando cada vez mais importante em termos de como a comida é exibida e comercializada, e assim é um parâmetro indicativo usado no controle de qualidade. É também adicionado aos alimentos para estimular o apetite.

Portanto, a cor é um dos atributos mais impactantes na avaliação do consumidor sobre um produto, pois se espera que este tenha uma coloração característica. Os consumidores costumam associar a cor dos produtos a outras características, como sabor e nível de doçura, por exemplo, daí a necessidade de apresentar uma cor correspondente para os produtos em desenvolvimento, pois esta será fundamental para sua aceitação (COBUCCI, 2010).

3.2 CORANTES ALIMENTÍCIOS

Segundo o Item 1.2 da Portaria nº 540 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS/MS), de 27 de outubro de 1997, aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação, sem o propósito de nutrir (BRASIL, 1997; CUNHA, 2008).

Os corantes são classificados como aditivos alimentares que correspondem a qualquer substância presente por adição intencional, ou não, a um alimento, com finalidades tecnológicas de fornecimento de características organolépticas como cor, aroma e textura (BARUFFALDI, 1998).

Alguns corantes artificiais permitidos no Brasil são o amarelo crepúsculo, azul brilhante, vermelho bordeaux, vermelho eritrosina, azul indigotina, ponceau 4R, vermelho 40 e amarelo tartrazina. Estes corantes têm o seu uso limitado pela legislação porque o consumo em excesso pode ser prejudicial a saúde (BRASIL, 2018).

Do ponto de vista nutricional, o uso de corantes alimentícios não é necessário. A sua função é apenas de colorir ou restituir a cor dos alimentos fazendo com que os produtos industrializados tenham uma aparência próxima a dos produtos naturais, sendo portanto, mais agradável aos olhos do consumidor. Seu uso, na maioria das vezes estético, é primordialmente justificado por motivos comerciais. São extremamente comuns, já que a cor e a

aparência têm um papel importantíssimo na aceitação dos produtos pelo consumidor (COSENTINO, 2005; CUNHA, 2008).

Portanto, a tendência mundial é de reduzir o uso dos corantes artificiais devido aos possíveis prejuízos a saúde. Outro fator que incentivou o consumo de produtos naturais é a consolidação da sensibilização ecológica da população. A utilização destes corantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos vem sendo uma exigência dos consumidores (MORITZ, 2005).

Segundo a Resolução nº 44/CNNPA da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1977), as classificações de corantes permitidos para uso em alimentos são basicamente:

- a) Corante natural: pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal;
- b) Corante caramelo: obtido a partir de açúcares pelo aquecimento e temperatura superior ao seu ponto de fusão e posterior tratamento indicado pela tecnologia;
- c) Corante artificial: substância obtida por processo de síntese com composição química definida.

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS CORANTES

Segundo o item 2 da Resolução nº 44/CNNPA da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1977), os corantes são classificados como:

- a) Corante orgânico natural - aquele obtido a partir de vegetal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado;
- b) Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado;
 - b.1) Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais;

- b.2) Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural;
- c) Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento;
- d) Caramelo - o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão;
- e) Caramelo (processo amônia) - é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia.

3.3.1 CORANTES ARTIFICIAIS

Com a descoberta dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX, o interesse das indústrias pelo uso dos corantes artificiais aumentou. Desde então, os corantes sintéticos têm sido cada vez mais usados devido ao fornecimento amplo de uma gama de cores, proporcionando praticamente todas as tonalidades do espectro visível de cor, além da alta estabilidade a fatores como luz, oxigênio, pH e calor, alto poder tintorial e custo de produção relativamente baixo (PRADO, GODOY, 2003).

Visto que os aditivos alimentares não são totalmente inofensivos à saúde, os corantes artificiais são constantemente alvo de investigações, quanto a sua relação com reações adversas que possam surgir nos consumidores. A relação de corantes artificiais de uso permitido varia em larga escala de acordo com a legislação de cada país (VELOSO, 2012).

Apesar da maioria dos aditivos ser ingerida em pequenas quantidades e seus efeitos adversos variarem de letargia a crises de asma grave, o diagnóstico preciso de reação alérgica a aditivos só pode ser feito através de procedimentos de provocação apropriados (PEREIRA, MOURA, CONSTANT; 2008).

Os estudos sobre os efeitos nocivos causados pelos corantes artificiais à saúde são insuficientes e bastante contraditórios. Os corantes podem causar desde simples urticárias, passando por asma e reações imunológicas, chegando até ao câncer em animais de laboratórios. (PRADO, GODOY, 2003).

Portanto, devido à diversidade de substâncias com poder corante, a lista dos corantes permitidos em cada país varia substancialmente. Em virtude do aumento no número de compostos com poder corante e de seu uso estendido aos alimentos e bebidas, tornou-se necessário o controle de suas aplicações e surgiu uma maior preocupação com possíveis efeitos à saúde humana (PRADO, GODOY, 2003).

3.3.2 CORANTES NATURAIS

Entre as principais fontes para obtenção de corantes naturais estão as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias) (MENDONÇA, 2011).

Os corantes naturais podem ser divididos em três grupos principais: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais, o heme e asbilinas encontradas em animais; os compostos de estrutura isoprenóide, representados pelos carotenóides, encontrados em animais e principalmente em vegetais, e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio como os flavonóides, que são encontrados exclusivamente em vegetais. Além desses existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalaínas que são compostos nitrogenados e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Embora os corantes naturais apresentem desvantagens (baixa estabilidade e alto custo) frente aos corantes artificiais, os primeiros têm sido utilizados há anos sem evidências de danos à saúde. Portanto, apesar desses pontos, a substituição por corantes naturais tem sido gradativa na indústria alimentícia,

pois conferem ao produto aspecto natural, o que aumenta a aceitação pelo consumidor (GOMES, 2012).

3.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PERTINENTE AOS CORANTES

As cores são adicionadas aos alimentos por pelo menos três motivos: para restituir a aparência original do produto após as etapas de processo de produção, estocagem e embalagem; para tornar o alimento visualmente mais atraente e para conferir e/ou reforçar as cores já presentes nos alimentos (VELOSO, 2012).

A legislação brasileira prevê a existência e utilização de corantes, através do Ministério da Saúde e sua Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), enquanto a legislação dos EUA, por exemplo, é normatizada pela *Food and Drug Administration* (FDA) (COSENTINO, 2005).

No Brasil, a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, aprova o regulamento técnico de aditivos alimentares, que consta a definição, classificação e emprego destes e foi a primeira legislação a ser harmonizada entre os países do MERCOSUL, na área de aditivos alimentares (BRASIL, 1997).

O emprego dos corantes também está regulamentado pelo Decreto nº55.871 de 26 de março de 1965, que em seu artigo 13, determina que “será tolerada a comercialização de mistura ou solução de, no máximo, três corantes” e que deverá constar da rotulagem da mistura ou da solução posta à venda sua composição qualitativa e quantitativa (BRASIL, 1965).

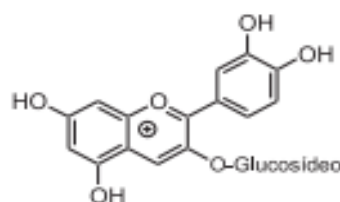
Existem órgãos públicos que estabelecem quais corantes sintéticos são permitidos para uso após avaliação toxicológica. Porém, cada país adota sua própria regulamentação, o que dificulta a extinção total da produção de certos corantes (FRICK, 2003).

3.5 ANTOCIANINAS

As antocianinas são pigmentos encontrados apenas em vegetais, predominando em muitas frutas e flores. Quimicamente, esses pigmentos são compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonóides. Após a clorofila, é o mais importante grupo de pigmentos de origem vegetal. Compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal. São capazes de absorver fortemente a luz na região do espectro visível, conferindo uma infinidade de cores entre o laranja, o vermelho, o púrpura e o azul, dependendo do pH do meio em que se encontram (LOPES et al., 2007; GOMES, 2012).

Possuem uma estrutura básica policíclica constituída de quinze carbonos, (LÓPEZ et al., 2000) e cada molécula é constituída por uma antocianidina (aglicona), um ou mais grupo de açúcares e usualmente um grupo de ácidos orgânicos (HARBORNE, 1988). Há uma grande variedade de antocianinas na natureza, e a principal diferença é o número de grupos hidroxilados, a natureza e o número de açúcares que estão ligados a sua estrutura, os carboxilatos alifáticos ou aromáticos que estão ligados ao açúcar da molécula e a posição destas ligações. Há relatos de que existem mais de 500 antocianinas diferentes (ANDERSEN e JORDHEIM, 2006). A Figura 1 é um exemplo de estrutura de antocianina presente na maioria dos vegetais, a cianidina 3-glucosídeo.

Figura 1. Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo



Fonte: Março e Poppi, 2008.

A coloração das antocianinas é diretamente influenciada quando há a substituição dos grupos hidroxila e metoxila em sua molécula. Se houver um incremento no número do grupo de hidroxilas, a coloração tende a se tornar mais azulada e, do contrário, um incremento no número de grupos de

metoxilas, aumenta a tonalidade vermelha, como é o caso do jambolão e do repolho roxo (LÓPEZ et al., 2000).

Assim como outros compostos extraídos de fontes naturais, as antocianinas detêm um efeito antioxidante que é, notavelmente, seu principal emprego biológico. Estudos mostram seu alto potencial, quando comparado com os antioxidantes clássicos como butilatohidroxianisol, butilatohidroxi tolueno e alfa tocoferol (vitamina E). Essa atividade é dada pela sua estrutura de três anéis, que possuem ligações duplas conjugadas e também distribuídas ao longo da estrutura, o que possibilita o sequestro de radicais livres, que são os causadores dos danos celulares e de doenças degenerativas (FABRICIO et al., 2010). Suas propriedades farmacológicas também são destacadas por Falcão et al. (2003) onde citam diversos trabalhos que demonstram que esses pigmentos apresentam atividade anticarcinogênica (HAGIWARA et al., 2001; KAPADIA et al., 1997) e antiviral (KAPADIA et al., 1997) e essas propriedades são associadas aos alimentos que as contém.

Somando-se a essas propriedades sua alta solubilidade em água e sua baixa toxicidade, as antocianinas despontam com elevado potencial para utilização em diferentes aplicações industriais (BURIN et al., 2011).

Contudo, a principal desvantagem da sua utilização como corante está relacionada à degradação sofrida durante a extração do vegetal, processamento e estocagem de alimentos. A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, iniciando com surgimento de coloração amarelada, seguida pela perda da cor e formação de produtos insolúveis (LOPES et al., 2007; GOMES, 2012).

3.5.1 FONTE DE ANTOCIANINAS

Apesar de existirem aproximadamente 400 tipos de antocianinas, poucas delas apresentam-se como fonte comercial desse pigmento, apenas a uva e o repolho roxo têm sido empregados comercialmente (CONSTANT, 2002). Dentre as frutas que contêm antocianinas, estão incluídas as amoras, as

framboesas vermelhas e pretas, as cerejas, as groselhas, uvas vermelhas, as romãs, as groselhas maduras, as maçãs de casca vermelha, jabuticaba, jambolão, pétalas de flores vermelhas, entre outras (WENZEL, 2001).

. O potencial para aproveitamento comercial dessas pode exceder o consumo *in natura*, possibilitando o uso como fonte de pigmento natural à indústria alimentícia, soma-se ainda o potencial como fonte de compostos bioativos, característica de frutas nativas.

Nesse contexto, a indústria alimentícia encontra nas antocianinas um importante substituinte aos corantes artificiais, atendendo um público cada vez mais disposto a consumir alimentos naturais e saudáveis.

3.5.1.1 JAMBOLÃO

O jambolão, *Eugenia jambolana*, é uma planta da família das Myrtaceae. Tem origem na Ásia tropical, especificamente na Índia. Seus nomes são sinônimos *Syzygium cumini* e *Eugenia cumini* (AYYANAR, 2012). São considerados fontes importantes de compostos fenólicos em dietas alimentares, dos quais se conhecem mais de 4000 estruturas com atividades biológicas (EVERETTE et al., 2010).

Dentre os compostos já identificados, podemos citar a presença dos flavonóides, como a quercitina e a rutina, e antocianinas, corantes naturais, como a delfinidina-3-glicosídeo, a cianidina-3-glicosídeo, a petunidina-3-glicosídeo e a malvidina-3-glicosídeo (LIMA et al., 2007; VEIGAS et al., 2007; REYNERTSON et al., 2008).

É cultivado em quase todo Brasil, em regiões de clima quente e úmido. Sendo encontrado na região norte, nordeste e nas áreas quentes da região sudeste (SOUSA, 2010). Trata-se de uma árvore de grande porte, podendo chegar até dez metros de altura e muito bem adaptada às condições brasileiras, mas pode ser cultivada em vários países, pois cresce em diferentes tipos de solo (AQIL, 2012).

Na época de safra, que ocorre de janeiro a maio, as árvores de jambolão ficam repletas de frutos. Quando atingem seu estágio maduro, se desprendem e se acumulam no chão. Pelo seu bom sombreamento, existem inúmeras árvores espalhadas nas ruas, praças, centros urbanos e nessas épocas em função da quantidade de frutos por árvore, se tornam inconveniente devido principalmente à sujeira produzida. Embora exista uma abundância desses frutos, no Brasil, é consumido geralmente *in natura* (VIZZOTTO; FETTER, 2009).

O fruto do jambolão apresenta em torno de 88 % de água, 10,7 % de carboidratos totais, 5,9 % de acidez (ácido cítrico), 1 % de açúcar redutores, 0,3 % de cinzas, 0,7 % de proteína, 0,3 % de lipídeos, 0,3 % de fibra alimentar, pH de 3,9 e °Brix 9,0. O principal mineral encontrado é o fósforo e dentre as vitaminas, destaque para a vitamina C. O fruto contém ácido elágico, que apresenta propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas (LUZIA; JORGE, 2009), é rico em antocianinas, glicosídeos, ácido elágico, isoquercetina, kaemferol e miretina. As sementes contêm alcalóide, jambosina e glicosídeo jambolina ou antimelina, o que impede a conversão diastásica de amido em açúcar e o extrato de semente reduz a pressão arterial (AYYANAR, 2012).

Com isso, a literatura relata um interesse crescente na inclusão de jambolão na dieta humana como fruta fresca e também como alimentos preparados, como sucos, geleias, compotas, iogurtes, vinhos e sobremesas instantâneas (SWAMI et al., 2012).

3.5.1.2 REPOLHO ROXO

O repolho é originário da Costa Norte Mediterrânea, Ásia Menor e Costa Ocidental Europeia. Em sua forma selvagem, o repolho era utilizado pelos egípcios, sendo que o seu uso generalizou-se com as invasões arianas entre 2000 e 2500 aC. Acredita-se que o repolho tenha sido introduzido na Europa pelos celtas no século IX. Na América, foi trazido pelos conquistadores europeus por volta do século XV. A planta de repolho é herbácea, formada por inúmeras folhas arredondadas e cerosas que se imbricam, dando origem a

uma cabeça compacta, que constitui a parte comestível da planta (FILGUEIRA, 2008; TIVELLI & PURQUERIO, 2005).

O repolho (*Brassica oleraceae*) é uma hortaliça de cabeça, formada por folhas espessas, cerosas, conchoidais e imbricadas numa sobreposição de folhas. Destaca-se como fonte de vitamina C, mas também fornece vitaminas B1, B2, E e K, além de sais minerais, sobretudo cálcio e fósforo. As variedades mais apropriadas ao processamento mínimo são as que têm alta compacidade da cabeça (cabeças mais firmes), por oferecer maior resistência ao corte e, conseqüentemente, resultar num produto de melhor qualidade. Estudos demonstram que o repolho é uma das principais hortaliças escolhidas quando se deseja a agregação de valor, sendo assim até mais valorizado que na sua forma *in natura* (SILVA, 2007).

Das fontes naturais de corantes já pesquisadas, o repolho roxo detém elevada concentração de antocianinas e, segundo Idaka (1987), foram identificadas mais de 15 antocianinas existentes neste vegetal, elas são baseadas em quatro antocianinas complexas, 3-5-diglicosídeo e 3-diglicosídeo acilado na posição 3 com ácidos ferúlicos, p-cumárico e ácidos sinápicos e como o jambolão também possui cianidina-3-glicosídeo. De acordo com Chigurupati et al. (2002) o fato de ocorrer uma extensiva acilação nos pigmentos do repolho roxo proporciona qualidades superiores na estabilidade e na coloração. Além disso, apresenta vantagem comercial por ser um vegetal de fácil acesso e de baixo custo.

3.6 SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

O sistema aquoso bifásico (SAB) é um método de fracionamento líquido-líquido baseado na imiscibilidade de duas soluções aquosas como os sistemas convencionais: polímero/ sal (polietileno glicol (PEG) e fosfato de sódio) (YAU et al., 2015); polímero/ polímero (PEG/Dextrana) (ROSA et al., 2010; SHOW et al., 2013); líquido iônico/ sal; e como os sistemas não convencionais: álcool de baixa massa molecular/ sal (álcool etílico e sulfato de amônio) (ALBERTSSON, 1987; RUIZ–RUIZ et al., 2012).

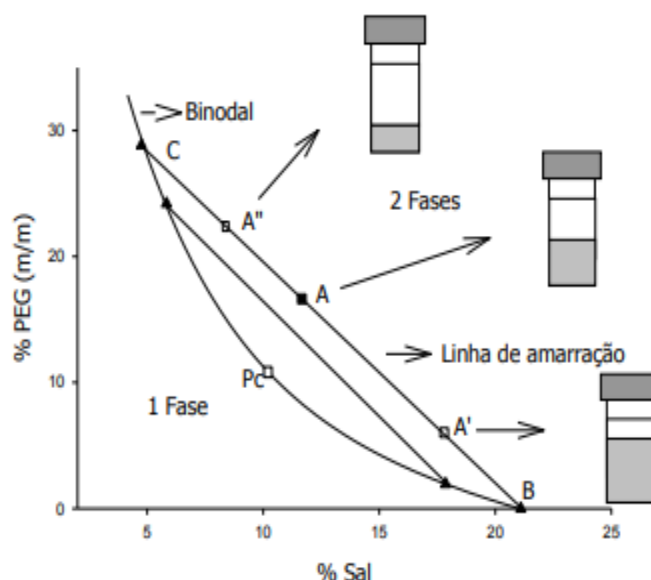
Nas últimas décadas, os SABs têm sido amplamente utilizados na separação, partição, concentração e/ou purificação de proteínas, enzimas, antibióticos, contaminantes, entre outras moléculas de interesse (ALBERTSSON, 1987; LIMA et al., 2002; WANG et al., 2010; CARDOSO et al., 2014) e tem sido considerado um sistema versátil, de alta eficiência, de alto rendimento, seletividade, de baixo custo e simplicidade tecnológica (CLÁUDIO et al., 2010; MALPIEDI et al., 2009).

Os componentes dos SABs quando misturados com água, só irão formar fases quando a composição dos constituintes se encontrar acima de determinadas concentrações limites. Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fases, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema em temperatura e pressão definidas (OLIVEIRA, 2006).

O diagrama de fases pode ser dividido em duas regiões por uma linha convexa chamada binodal ou curva de equilíbrio. Sistemas cuja composição esteja abaixo da binodal formam uma fase somente, enquanto que sistemas cuja composição se situa acima da binodal formam duas fases homogêneas, como é mostrado em um sistema convencional PEG/Sal na Figura 2.

Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença (COSTA, 2010).

Figura 2. Diagrama de fases para sistema aquoso bifásico



Fonte: Carvalho *et al.*, 2007

Esse tipo de sistema é uma técnica atóxica por possuir alto teor de água e SABs formados por álcoois e sais tem substituído aqueles formados por polímeros-polímeros e polímeros-sais devido à sua alta capacidade de extração, baixo custo e condições brandas de processo (WU *et al.*, 2011, WU *et al.*, 2014).

O uso de um álcool de cadeia curta, um sistema não convencional, permite um custo menor e uma fácil recuperação do solvente por evaporação (YAU *et al.*, 2015), além de promover uma rápida separação das fases de topo e base, criar um sistema de baixa viscosidade, alta polaridade e baixa toxicidade para o ambiente (OOI *et al.*, 2009).

Os SABs ditos "não-convencionais" vêm sendo usados com êxito para promover purificação de produtos naturais. HUA *et al.* (2013), por exemplo, extraiu e purificou antocianinas da fruta de *Vaccinium uliginosum* Linn em SAB formado por etanol e sulfato de amônia.

A purificação preliminar de antocianinas pode ser influenciada por fatores como: o tipo e concentração de sal, a concentração de álcool, quantidade de extrato, tempo de extração, pH e temperatura do sistema. Para otimizar o

emprego dos SAB na partição de biocompostos é necessário o estudo do comportamento destes sistemas buscando variar essas condições (WU et al., 2014).

De acordo com Mageste et al. (2009), a distribuição de biomoléculas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K . Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e da biomolécula determinam o valor de K . Os fatores associados à biomolécula são o tamanho e a composição, presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar e concentração do álcool, pH, temperatura e concentração de sal (CHAIWUT et al., 2010).

Os principais efeitos que podem ocorrer no SAB: o volume de exclusão e salting out. O efeito de volume de exclusão é ocasionado pelo aumento da massa molar ou concentração do álcool, que ocupa os espaços intersticiais da fase de topo ocasionando a diminuição da solubilidade e aumento da viscosidade das biomoléculas na fase de fundo, respectivamente (RAWDKUEN et al., 2010). O efeito salting out é devido ao aumento da concentração do sal, resultando na diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase de fundo e consequentemente o aumento da sua partição para a fase de topo (BABU et al., 2008).

A escolha da concentração de sal influencia significativamente na eficiência da separação e purificação parcial das antocianinas. Isso se deve ao fato de que diferentes concentrações de sal levam a diferenças na divisão das fases de topo e fundo, consequentemente mudando a forma como as moléculas de antocianina particionam. A recuperação da antocianina na fase de topo em relação a fase de fundo, no geral, aumenta com a elevação da concentração de etanol no sistema, tal fato evidencia a tendência da antocianina se concentrar na fase de topo (ALMEIDA, 2016).

Para Saravanan et al. (2008) o pH pode afetar o coeficiente de partição, seja alterando a carga do soluto ou outras espécies presentes no sistema. Também relatam que existe uma grande relação entre o pH e o ponto

isoelétrico (pI) da biomolécula, isso porque quando o pH do sistema é mais elevado que seu pI, a biomolécula é carregada negativamente, e portanto, o coeficiente de partição aumenta com o aumento do pH.

O efeito da temperatura no SAB varia de acordo com o tipo dos componentes. Sistemas PEG e dextrana quando submetidos a temperaturas elevadas necessitam de uma maior concentração dos polímeros para que haja a separação das fases, por este motivo neste tipo de sistema normalmente é submetido a temperaturas inferiores a ambiente. Já para sistema PEG e sal o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração do PEG na fase de topo e conseqüentemente ocorre a redução da concentração do polímero na fase de fundo (PESSOA JUNIOR, 2005). De acordo com Coimbra et al. (2003), sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente à região do ponto crítico.

3.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Quando se busca a otimização de um processo é necessário à aplicação de técnicas de planejamento experimental, já que busca encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como suas interações, sendo possível determinar qual será o procedimento mais eficiente. Ou seja, através de um planejamento experimental, os experimentos são realizados randomicamente e as variáveis analisadas todas de uma vez, permitindo que os efeitos da interação também possam ser avaliados (SANTOS et al., 2011).

Nesse contexto, planejamentos fatoriais completos são planejamentos multivariados que baseiam-se na variação de fatores simultaneamente a um limitado número de níveis (normalmente dois) para cada variável. Esses tipos de planejamentos são especialmente importantes no início de um estudo experimental, pois permite realizar triagem de variáveis evidenciando as mais significativas e quantificando suas interações.

Isso é feito com uma grande economia de experimentos e de, conseqüentemente, tempo, esforços e custos, ao contrário da otimização univariada que não possibilita ter uma ideia inicial do número de experimentos que serão realizados (BRUNS, SCARMINIO, NETO, 2006; BREITKREITZ, SOUZA, POPPI, 2014;).

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é uma metodologia que permite verificar a curvatura de um plano, buscando averiguar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Se a função matemática de primeira ordem não foi capaz de ajustar a superfície de resposta é necessário a adição de mais 2^k ensaios nas condições axiais ou estrela. No DCCR o α é a distância do centro do delineamento até os pontos axiais. O parâmetro α garante a rotabilidade do DCCR e é dependente do número de pontos existentes na porção fatorial do delineamento. O cálculo de α é dado pela equação: $\alpha = (2^k)^{1/4}$.

Com $2k$ pontos axiais, esses pontos ficam organizados em $(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, 0, \pm\alpha, \dots, 0)$, ..., $(0, 0, 0, \dots, \pm\alpha)$. Podendo α ter os seguintes valores $\pm 1,4142$, $\pm 1,6818$, ± 2 , $\pm 2,3784$, $\pm 2,8284$, com os valores respectivos de k : 2, 3, 4, 5 e 6 (REDDY et al., 1998).

A metodologia de superfície de resposta tem duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ampliados. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 COLETA DO MATERIAL

Os jambolões foram coletados na época de safra, que ocorre de janeiro a maio, na cidade de Santo Antônio da Patrulha, RS, Brasil. As frutas foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas em freezer à temperatura média de -11°C no Laboratório de Cinética e Termodinâmica dos Processos Degradativos (LCTPD/ FURG-SAP).

O repolho roxo foi adquirido no comércio local e acondicionado em refrigerador a 5°C (por no máximo 14 dias) no Laboratório de Cinética e Termodinâmica dos Processos Degradativos (LCTPD/FURG-SAP).

4.2 EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

A extração das antocianinas do jambolão foi realizada segundo Drunkler (2004), utilizando como solvente etanol 70% na proporção 1:2 (m/v), relação massa de jambolão com casca por volume de solvente extrator. A mistura dos jambolões sem caroço juntamente com o solvente foram homogeneizados por cerca de 1 minuto em mixer (Potência de 200 W) e deixados por 24 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz. Após 24 horas, a mistura foi filtrada a vácuo com papel filtro de diâmetro 11 cm e gramatura de 80 gr.

A extração das antocianinas do repolho roxo foi realizada utilizando como solvente etanol 99,5% na proporção 1:2 (m/v), relação massa de repolho roxo por volume de solvente extrator. O repolho roxo juntamente com o solvente foram deixados por 24 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz. Após 24 horas, foi feita a filtração com peneira granulométrica em aço inox 3 cm x 2 cm abertura 0,85mm.

A correção para pH 2 foi feita com HCl 1 M, para ambos os extratos, de forma a assegurar a estabilidade das antocianinas como descreve Tsao (2010).

4.3 PREPARO DO SAB PARA PURIFICAÇÃO PARCIAL

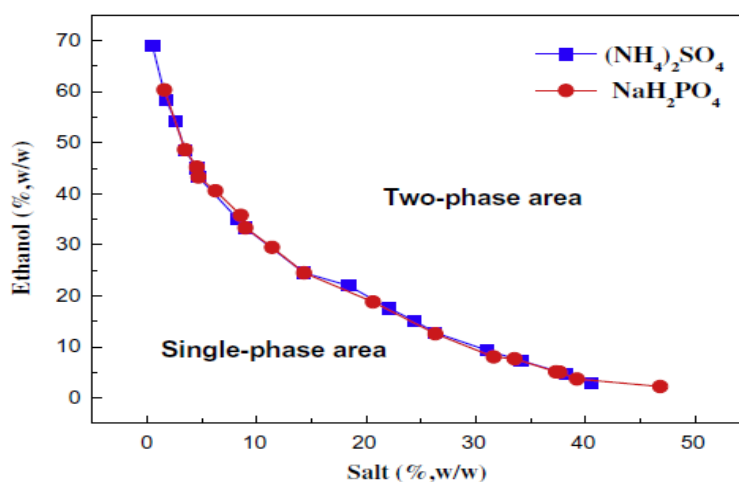
O sistema aquoso bifásico (SAB) foi montado segundo Antelo *et al.* (2015), utilizando-se tubos de centrífuga graduados alocados em um béquer na balança de precisão, onde foram adicionados os percentuais em massa de etanol, sal (fosfato de sódio) e água, até um total de 9 g. Por último foi adicionada 1 g da amostra do extrato líquido do jambolão ou do repolho roxo, contabilizando uma massa total de 10 g.

Os tubos foram homogeneizados por agitação em vórtex até a dissolução do sal e formação das duas fases. Então foram deixados em banho-maria em temperatura e tempo pré-determinados, pelo planejamento experimental, até a partição. As fases do fundo e do topo foram separadas com o auxílio de um cateter venoso periférico convencional, de aproximadamente 10 cm, e os volumes medidos em proveta de 25 mL. Uma alíquota de cada fase, em triplicata, devidamente diluída, foi submetida à leitura espectrofotométrica, a 525 nm, comprimento de onda definido através da espectrofotometria de varredura para as antocianinas do jambolão e do repolho roxo.

4.4 PURIFICAÇÃO PARCIAL UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os efeitos da concentração do etanol, do sal (fosfato de sódio), do tempo de repouso e da temperatura do sistema foram avaliados sobre o coeficiente de partição, o rendimento e as recuperações absoluta e relativa das antocianinas.

Os níveis inferior e superior das variáveis de entrada foram definidos de acordo com os dados da literatura. As concentrações percentuais de etanol e do sal foram determinadas de acordo com o diagrama de fases estabelecidos por Wu *et al.* (2014), Figura 3, assegurando a formação de um sistema bifásico.

Figura 3. Diagrama de fase etanol + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ 

Fonte: Wu *et al.*, 2014.

A avaliação dos efeitos das variáveis de entrada: concentração de etanol, concentração de fosfato de sódio, tempo e temperatura sob as respostas: partição (K), recuperação absoluta, recuperação relativa e rendimento, tanto para o extrato de jambolão quanto para o de repolho roxo, foi feita utilizando-se planejamento fatorial completo 2^4 , com 4 pontos centrais.

A Tabelas 1 mostra as variáveis codificadas para cada nível, inferior, superior e ponto central, para o extrato de jambolão e de repolho roxo.

Tabela 1 – Variáveis codificadas para o jambolão e repolho roxo

	-1	0	+1
Etanol (%)	25	27	29
Fosfato (%)	24	26	28
Tempo (min)	30	45	60
Temperatura (°C)	30	45	60

Fonte: próprio autor

Após a realização do planejamento fatorial completo e a análise de efeitos significativos, foi feito o Delineamento Composto Central Rotacional

(DCCR), para os extratos do jambolão e do repolho roxo, com os seus respectivos pontos axiais.

Para o extrato do jambolão o DCCR foi composto por 2^3 ensaios, 6 pontos axiais e 4 pontos centrais, cujos níveis codificados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – DCCR para o Jambolão

	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Etanol (%)	24,6	26	28	30	31,4
Fosfato (%)	23,6	25	27	29	30,4
Temperatura (°C)	11,6	15	20	25	28,4

Fonte: Próprio autor

Para o extrato do repolho roxo o DCCR foi composto por 2^4 ensaios, 8 pontos axiais e 4 pontos centrais, e seus níveis codificados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – DCCR para o repolho roxo

	-2	-1	0	+1	+2
Etanol (%)	27	28	29	30	31
Fosfato (%)	26	27	28	29	30
Tempo (min)	7,5	15	22,5	30	37,5
Temperatura (°C)	15	20	25	30	35

Fonte: Próprio autor

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se 95% de confiança, com o auxílio do *software* Statistica®.

4.5 CONCENTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

A concentração das antocianinas nas fases de topo e de fundo foi determinada por método espectrofotométrico, segundo Fuleki e Francis (1968), de acordo com a Equação 1.

$$C_A = \left(\frac{\text{Absorvância} \cdot PM \cdot fd}{\varepsilon} \right) \cdot 1000 \quad (1)$$

Em que: C_A é a concentração de antocianinas totais expressas em mg de antocianinas/ 100g de amostra, Absorvância é a absorvância do extrato determinada em 525 nm, PM é a massa molar da cianidina-3-glicosídeo, 449,2 g/gmol, fd é o fator de diluição e ε é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo, 26900 L/gmol*cm.

4.6 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO

O coeficiente de partição (K), das antocianinas do jambolão e do repolho roxo, foi determinado segundo Wu *et al.* (2014), de acordo com a Equação 2.

$$K = C_T / C_F \quad (2)$$

Em que: C_T e C_F representam as concentrações de antocianina, na fase de topo e de fundo, respectivamente.

4.7 RECUPERAÇÃO ABSOLUTA E RECUPERAÇÃO RELATIVA DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO

A recuperação absoluta (R1) e recuperação relativa (R2) das antocianinas do jambolão e do repolho roxo em SAB foram calculadas segundo Wu *et al.* (2014), de acordo com as Equações 3 e 4.

$$R1 = C_T V_T / C_A \quad (3)$$

$$R2 = C_T V_T / (C_T V_T + C_F V_F) \quad (4)$$

Em que: C_T e C_F representam as concentrações de antocianina, na fase de topo e de fundo, respectivamente, V_T e V_F são os volumes da fase de topo e de fundo, nessa ordem, C_A é a concentração total de antocianinas, do jambolão e do repolho roxo e K é o coeficiente de partição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 JAMBOLÃO

5.1.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^4 + 4$ PONTOS CENTRAIS

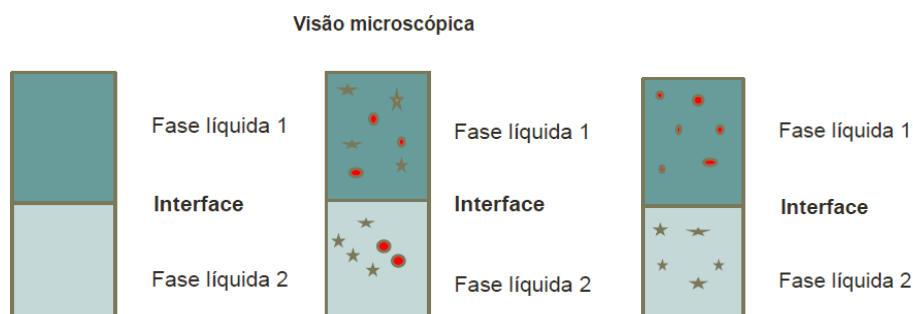
Na Tabela 5 são apresentados os resultados do coeficiente de partição (K), da recuperação absoluta (R1) e da recuperação relativa (R2) obtidos para o extrato de jambolão, de acordo com a matriz do planejamento experimental.

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental para o extrato de jambolão

Ensaio	Etanol (%)	Fosfato de sódio (%)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	K	R1 (%)	R2 (%)
1	25	24	30	30	63	72,2	98,5
2	29	24	30	30	160	100	99,5
3	25	28	30	30	87,5	98,2	99,0
4	29	28	30	30	70,3	100	99,0
5	25	24	60	30	71,0	75,5	98,7
6	29	24	60	30	51,3	85,2	98,4
7	25	28	60	30	86,5	90,2	98,9
8	29	28	60	30	175	98,7	99,5
9	25	24	30	60	24,3	55,6	96,4
10	29	24	30	60	129	81,3	99,4
11	25	28	30	60	75,5	86,5	98,8
12	29	28	30	60	55,5	66,1	98,5
13	25	24	60	60	17,5	53,6	94,9
14	29	24	60	60	107	59,2	99,2
15	25	28	60	60	68,5	68,5	98,6
16	29	28	60	60	117	64,7	99,3
17	27	26	45	45	26,2	72,8	96,8
18	27	26	45	45	24,4	67,8	96,4
19	27	26	45	45	31,5	68,6	97,2
20	27	26	45	45	25,4	69,1	96,5

A Figura 4 ilustra a partição das antocianinas que migram para a fase líquida 1 enquanto os contaminantes migram para a fase líquida 2, com tempo e temperatura pré-determinados pelo planejamento experimental. De acordo com Wu et al. (2011) e Wu et al. (2014), as antocianinas particionam para a fase rica em etanol (fase líquida 1) porque possuem afinidade com solventes polares, portanto, o aumento da concentração de etanol na fase de topo faz com que ocorra um aumento da concentração de antocianinas na mesma.

Figura 4. Partição do extrato. Antocianinas (●) e contaminantes (★).



Fonte: próprio autor

Segundo Almeida (2016), a escolha da concentração de sal influencia significativamente na eficiência da separação e purificação parcial das antocianinas. Isso se deve ao fato de que diferentes concentrações de sal levam a diferenças na divisão das fases de topo e base, mudando a forma como as moléculas de antocianina particionam.

Como mostrado na Tabela 5, o coeficiente de partição e a recuperação absoluta e relativa das antocianinas, no geral, aumentaram com a elevação das concentrações de etanol e de fosfato de sódio no sistema. Isso evidencia a tendência da antocianina se concentrar na fase de topo.

Esse fenômeno pode ser observado na Tabela 5 para o experimento com resultado mais promissor (ensaio 8). Mantendo-se 28% de fosfato de sódio, R1 e R2 aumentaram 9,4% e 0,6%, respectivamente, à medida que a

concentração de etanol aumentou de 25% (ensaio 7) a 29% (ensaio 8), enquanto que para a partição teve um aumento de 102,3%, se comparado com o ensaio 7, com o maior valor obtido de 175. O oposto se observou quando houve um acréscimo na temperatura, de 30 para 60°C, como por exemplo, do ensaio 8 para o ensaio 9, tendo um decréscimo de 620%.

Dentre os sistemas formados com as variações da concentração de fosfato de sódio, de etanol, tempo e temperatura, o SAB que apresentou melhores recuperações e coeficiente de partição (K) da antocianina de jambolão foi o sistema composto por 29% de etanol e 28% de fosfato de sódio, tempo de 60 minutos e temperatura de 30°C, apresentando $K = 175$, $R1 = 98,7\%$ e $R2 = 99,5\%$.

Os valores encontrados para o coeficiente de partição foram próximos aos reportados por WU et al. (2014), que obteve sob condições ideais, mais de 90% na partição das antocianinas de suco de uva em sistemas contendo etanol e sulfato de amônio.

Os resultados obtidos para K foram melhores que os obtidos por Siqueira et al. (2016), na partição de antocianinas da polpa de açaí (*Euterpe oleracea M.*) em SAB etanol/sulfato de amônio, onde os autores obtiveram um coeficiente de partição de 2,30 e por Patrício (2012), que obteve para as antocianinas doadas pela Chr. Hansen Ind. Com. Ltd. (São Paulo, Brasil), em um SAB convencional formado pela mistura de uma solução polimérica (PEO1500, PEO 10000, PEO 35000 ou PPO400) e uma solução salina (Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , $MgSO_4$ ou $(NH_4)_2SO_4$), valor de coeficiente de partição de 89,2.

Nas Tabelas 6 e 7 abaixo, são mostrados os efeitos das variáveis de entrada, com 95% de confiança para cada resposta obtida anteriormente.

Tabela 6 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre as variáveis de resposta coeficiente de partição (K)

	K		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)*	+ 46	0,000087	1,585021
Fosfato de sódio (Linear)*	+ 14	0,003004	1,585021
Tempo (Linear)	+ 3,6	0,108587	1,585021
Temperatura (Linear)*	- 21	0,000892	1,585021
Etanol x Fosfato de sódio*	- 21	0,000871	1,585021
Etanol x Tempo*	+ 5,3	0,044523	1,585021
Etanol x Temperatura*	+ 9,3	0,009986	1,585021
Fosfato de sódio x Tempo*	+ 36	0,000187	1,585021
Fosfato de sódio x Temperatura	- 4,4	0,068768	1,585021
Tempo x Temperatura	+ 2,8	0,171355	1,585021

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

Tabela 7 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre as variáveis de resposta recuperação absoluta (R1) e recuperação relativa (R2)

	R1			R2		
	Efeito	p	Desvio padrão	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)*	+ 6,9	0,00848	1,107832	+ 1,1	0,008225	0,17969
Fosfato de sódio (Linear)*	+ 11	0,00202	1,107832	+ 0,83	0,019415	0,17969
Tempo (Linear)*	- 8,0	0,00540	1,107832	- 0,20	0,346873	0,17969
Temperatura (Linear)*	- 23	0,000242	1,107832	-0,80	0,021090	0,17969
Etanol x Fosfato de sódio*	- 10	0,00261	1,107832	- 0,88	0,016549	0,17969
Etanol x Tempo	- 1,9	0,191	1,107832	+ 0,20	0,346873	0,17969
Etanol x Temperatura*	- 5,1	0,0194	1,107832	+ 0,80	0,021090	0,17969
Fosfato de sódio x Tempo	+ 0,86	0,493	1,107832	+ 0,45	0,087383	0,17969
Fosfato de sódio x Temperatura	- 2,3	0,133753	1,107832	+ 0,50	0,068851	0,179699
Tempo x Temperatura	- 2,8	0,083119	1,107832	- 0,075	0,704481	0,179699

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

A partir da análise dos efeitos, tem-se que a concentração de etanol, concentração de fosfato e temperatura foram significativas a 95% de confiança para todas as variáveis de saída, enquanto o tempo foi significativo apenas para a recuperação absoluta.

Analisando o coeficiente de partição, as variáveis concentração de fosfato de sódio (linear), concentração de etanol (linear) e as interações concentração de etanol x tempo, concentração de etanol x temperatura e concentração de fosfato de sódio x tempo tiveram um efeito positivo, ou seja, à medida que se aumentou estes fatores houve um aumento na resposta. Por outro lado, a concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio e temperatura (linear) tiveram efeito negativo, diminuindo a resposta à medida que aumentava seu nível.

Na recuperação absoluta as variáveis de entrada concentração de etanol (linear) e concentração de fosfato de sódio (linear) tiveram um efeito positivo, portanto, à medida que se aumentou estes fatores houve um aumento na recuperação absoluta. Já o tempo (linear), temperatura (linear) e as interações concentração de etanol x temperatura e concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio tiveram um efeito negativo, ou seja, quando houve um aumento nos seus níveis houve um decréscimo na resposta.

Para a recuperação relativa, as variáveis de entrada concentração de fosfato de sódio (linear), concentração de etanol (linear) e as interações concentração de etanol x temperatura tiveram um efeito positivo, ocorrendo assim um acréscimo da resposta à medida que se aumentou estes fatores, enquanto que a temperatura (linear) e a interação concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio tiveram um efeito negativo, com isso aumentando seus níveis houve um decréscimo na resposta.

Em função da análise dos efeitos onde a concentração de etanol e de fosfato de sódio tiveram efeito positivo sobre as respostas coeficiente de partição, recuperação absoluta e recuperação relativa e a temperatura efeito negativo, se ampliou a faixa de concentração de etanol e de fosfato de sódio e se reduziu a faixa de temperatura experimental.

5.1.2 DCCR 2³ + 6 PONTOS AXIAIS + 4 PONTOS CENTRAIS

Na Tabela 8 são apresentados os resultados do coeficiente de partição, da recuperação absoluta e da recuperação relativa obtidos a partir dos extratos do jambolão, de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Tabela 8 – DCCR para o jambolão

Ensaio	Etanol (%)	Fosfato de sódio (%)	Temperatura (°C)	K	R1 (%)	R2 (%)
1	26	25	15	221	68,6	99,6
2	30	25	15	192	65,6	99,6
3	26	29	15	190	59,0	99,5
4	30	29	15	215	72,1	99,6
5	26	25	25	12	26,8	91,5
6	30	25	25	3,2	27,3	79,6
7	26	29	25	4,58	34,2	82,7
8	30	29	25	3,26	30,1	79,9
9	24,6	27	20	3,7	22,1	79,1
10	31,4	27	20	8,29	43,2	92,6
11	28	23,6	20	2,5	30,7	75,3
12	28	30,4	20	7,11	43,6	89,6
13	28	27	11,6	64	21,9	98,8
14	28	27	28,4	50	17,1	98,5
15	28	27	20	2,56	33,9	74,7
16	28	27	20	2,63	34,6	75,6
17	28	27	20	3,34	35,2	79,7
18	28	27	20	2,74	35,2	76,4

De acordo com as mudanças que a análise de efeitos direcionou, os resultados agora foram melhores para o coeficiente de partição a baixas temperaturas, contudo houve uma redução das recuperações absoluta e

relativa. A combinação de 26 % de etanol e 25% de fosfato de sódio a 15°C, a mais promissora, com $K = 221$, $R1 = 68,9\%$ e $R2 = 99,6\%$. A combinação de 30% de etanol e 29% de fosfato de sódio na mesma temperatura também foi promissora, com $K = 215$, $R1 = 72,1\%$ e $R2 = 99,6\%$.

Na sequência, são mostrados os efeitos significativos com 95% de confiança para cada resposta obtida anteriormente, na Tabela 8.

Tabela 9 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta coeficiente de partição

	K		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear) *	- 0,939	0,016526	0,192819
Etanol (Quadrático) *	+ 37,6	0,000000	0,200559
Fosfato de sódio (Linear) *	- 1,12	0,010254	0,192819
Fosfato de sódio (Quadrático) *	+ 36,8	0,000000	0,200559
Temperatura (Linear) *	- 120	0,000000	0,192819
Temperatura (Quadrática) *	+ 73,7	0,000000	0,200559
Etanol x Fosfato de sódio *	+ 15,4	0,000010	0,251818
Etanol x Temperatura *	- 1,53	0,008951	0,251818
Fosfato de sódio x Temperatura	+ 0,160	0,570332	0,251818

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

Para a resposta coeficiente de partição, observou-se que os efeitos da concentração do etanol (linear e quadrático), do fosfato de sódio (linear e quadrático), da temperatura (linear e quadrática) e as interações das concentrações de etanol x fosfato e da concentração de etanol x temperatura, foram significativos a 95% de confiança.

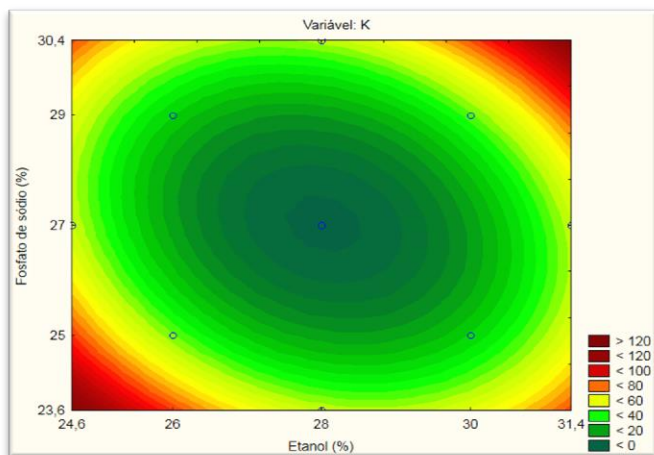
A partir desse resultado, efetuou-se a análise de variância (ANOVA) obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,57$, o que indica que apenas 57% da variabilidade na resposta da partição pode ser explicada por um

modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 1,52$ foi inferior ao $F_{\text{Tabelado}} (3,23)$. Segundo Barros Neto et al. (1995), para considerar a possibilidade de que uma variável seja preditiva, o valor do F calculado deve ser de 3 a 5 vezes maior que o F tabelado. Nesse caso houve uma baixa relação, sinalizando assim um modelo inválido para fins preditivos.

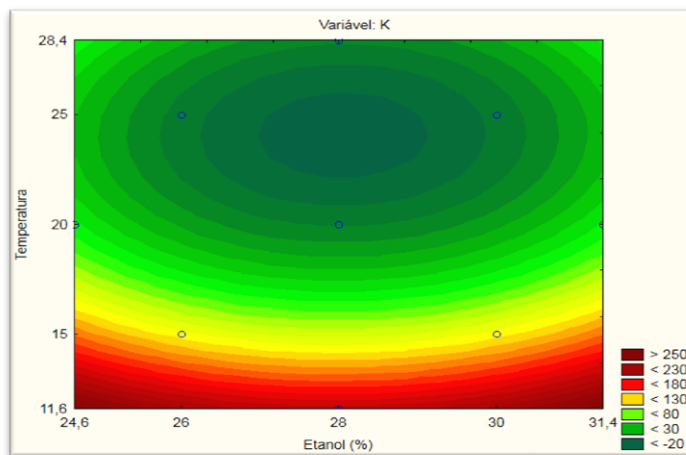
Visando estabelecer as condições mais favoráveis para alcançar os máximos níveis de partição das antocianinas, dentro do cenário estudado, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, cujas curvas de contorno para a resposta coeficiente de partição é mostrada na Figura 5.

Figura 5 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta coeficiente de partição: a) concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio; b) concentração de etanol x temperatura; c) concentração de fosfato de sódio x temperatura.

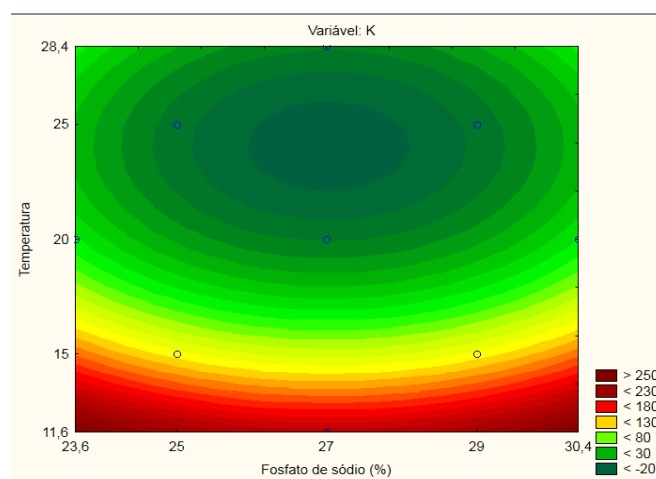
a)



b)



c)



Através da Figura 5 observou-se que dentro do cenário estudado, à medida que se diminui a temperatura, independente do aumento da concentração do fosfato de sódio ou do etanol, houve um aumento do coeficiente de partição.

Na Tabela 10 são apresentados os efeitos com 95% de confiança ($p < 0.05$), para a recuperação absoluta.

Tabela 10 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta recuperação absoluta (R1)

	R1		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear) *	+ 6,15	0,000352	0,334859
Etanol (Quadrático) *	+ 6,58	0,000324	0,348302
Fosfato de sódio (Linear) *	+ 4,22	0,001079	0,334859
Fosfato de sódio (Quadrático) *	+ 9,77	0,000100	0,348302
Temperatura (Linear) *	- 22,7	0,000007	0,334859
Temperatura (Quadrática) *	- 2,74	0,004280	0,348302
Etanol x Fosfato de sódio *	+ 2,88	0,007160	0,437321
Etanol x Temperatura *	- 3,42	0,004335	0,437321
Fosfato de sódio x Temperatura*	+ 3,32	0,004722	0,437321

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

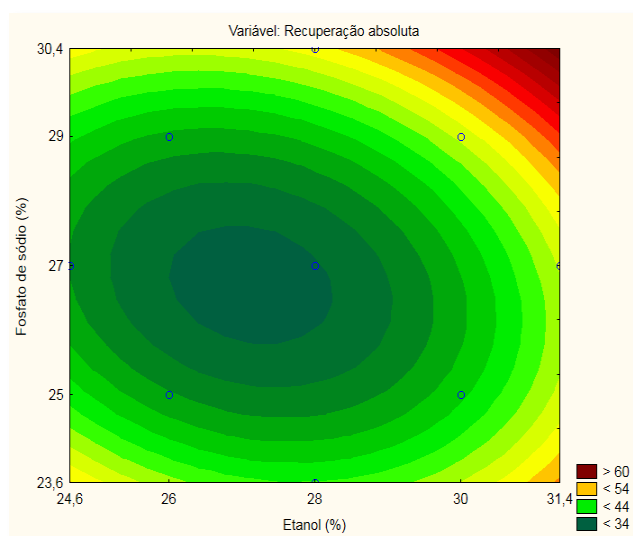
Para essa variável de saída, observou-se que os efeitos da concentração do etanol (linear e quadrático), da concentração do fosfato de sódio (linear e quadrático), da temperatura (linear e quadrática) e as interações das concentrações do etanol x concentração do fosfato de sódio, concentração do etanol x temperatura e concentração do fosfato de sódio x temperatura foram significativas a 95% de confiança.

A partir desse resultado, efetuou-se a análise de variância (ANOVA) obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,53$, o que indica que apenas 53% da variabilidade na resposta da recuperação absoluta pode ser explicada através de um modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 0,99$ foi inferior ao $F_{\text{Tabelado}} (3,39)$ para o mesmo, fornecendo uma baixa relação. Dessa forma, assim como para o coeficiente de partição, um modelo é inválido para fins preditivos.

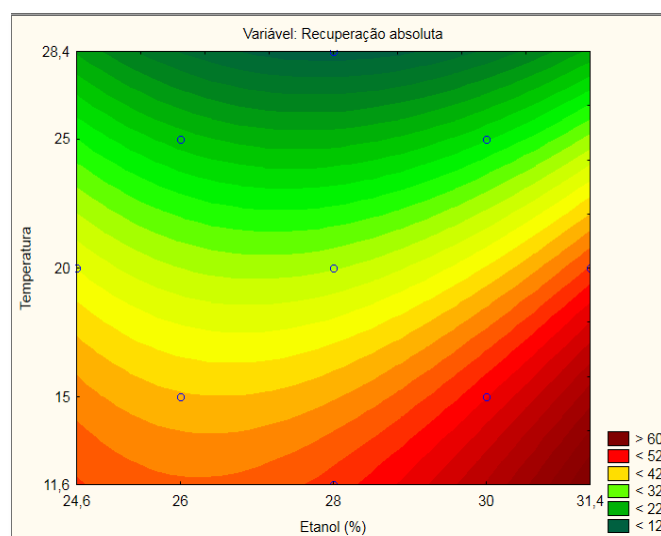
Para alcançar os máximos níveis de recuperação absoluta das antocianinas, dentro do cenário estudado, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, cujas curvas de contorno são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta recuperação absoluta: a) concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio; b) concentração de etanol x temperatura; c) concentração de fosfato de sódio x temperatura

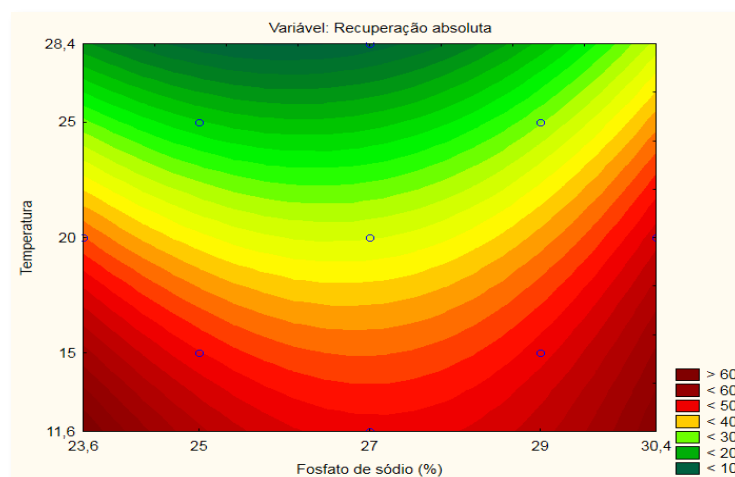
a)



b)



c)



A análise das curvas evidenciou que à medida que se diminui a temperatura e aumentou a concentração de fosfato de sódio e etanol, houve também um

aumento na recuperação absoluta. Os efeitos com 95% de confiança, para a variável de saída recuperação relativa são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta recuperação relativa (R2)

	R2		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)	+ 1,18	0,389642	1,180444
Etanol (Quadrático) *	+ 7,31	0,009476	1,227834
Fosfato de sódio (Linear)	+ 2,26	0,151350	1,180444
Fosfato de sódio (Quadrático) *	+ 4,90	0,028163	1,227834
Temperatura (Linear) *	- 9,54	0,003955	1,180444
Temperatura (Quadrática) *	+ 16,4	0,000910	1,227834
Etanol x Fosfato de sódio	+ 2,30	0,232534	1,541644
Etanol x Temperatura	- 3,70	0,095871	1,541644
Fosfato de sódio x Temperatura	- 2,10	0,266397	1,541644

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

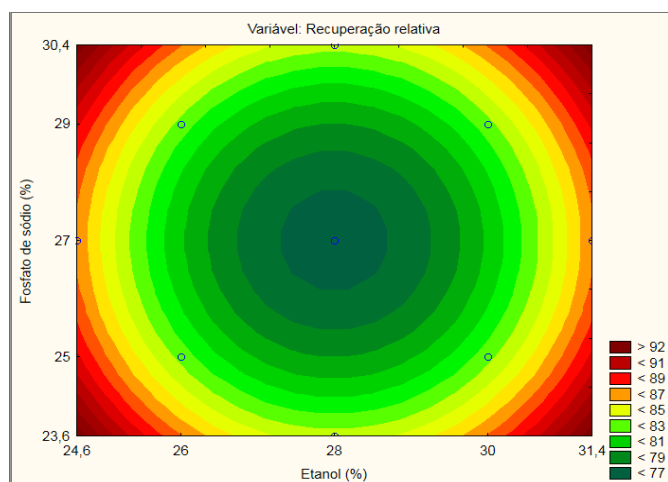
Para a resposta recuperação relativa, observou-se que os efeitos da temperatura (linear e quadrática), da concentração de etanol (quadrático) e da concentração de fosfato (quadrático) foram significativos a 95% de confiança.

A partir da análise de variância (ANOVA) obteve-se um coeficiente de determinação $R^2=0,70$, indicando que 70% da variabilidade na resposta da recuperação relativa pode ser explicada por um modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 7,56$ foi superior ao $F_{\text{Tabelado}} (3,18)$, mas não maior que 3 vezes, provendo uma baixa associação entre as variáveis de entrada e as variáveis de saída e indicando assim um modelo nulo para fins preditivos.

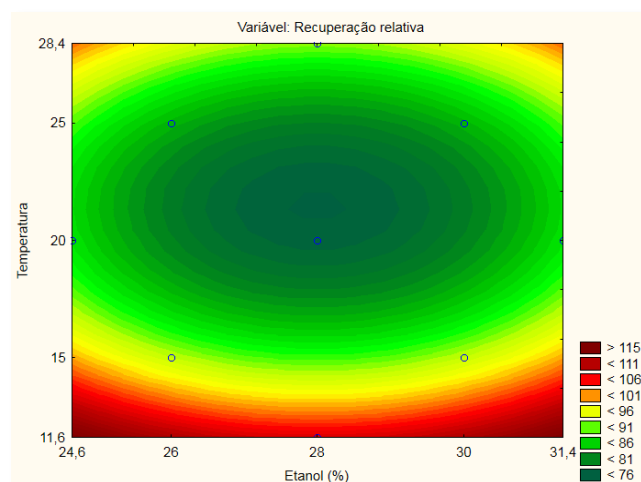
Para atingir os máximos níveis de recuperação relativa das antocianinas, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, cujas curvas de contorno são exibidas na Figura 7.

Figura 7 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta recuperação relativa: a) concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio; b) concentração de etanol x temperatura; c) concentração de fosfato de sódio x temperatura.

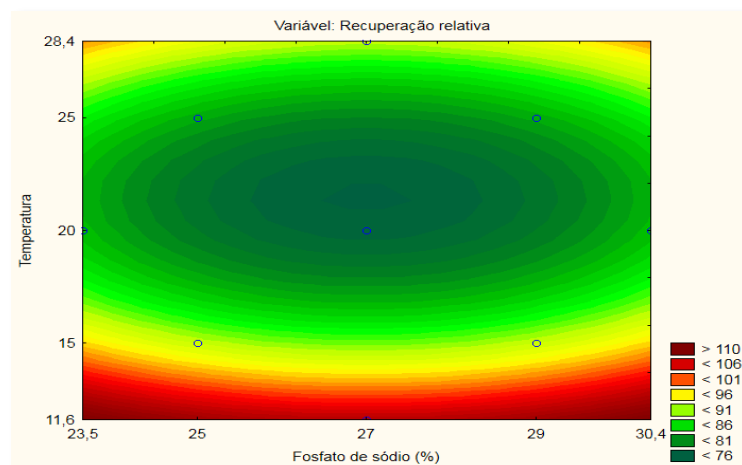
a)



b)



c)



De acordo com a Figura 7, observou-se que diminuindo a temperatura para toda faixa de concentração de etanol e de concentração de fosfato de sódio estudada, houve um aumento na recuperação relativa.

A escolha do pH é muito importante uma vez que a estrutura química das antocianinas varia com o valor do pH da solução (HUA et al., 2013). Se o pH na solução for alto ($\text{pH} > 7,0$), o meio estará básico causando a degradação da antocianina dependendo de seu grupo substituinte. O particionamento das antocianinas entre as fases do SAB esta diretamente relacionada com a quantidade de hidrogênios ionizados. Quanto mais carregada a molécula estiver, devido ionização do grupo hidroxila, maior sua afinidade com a fase rica em fosfato de sódio (mais hidrofílico), enquanto que as espécies sem carga migram em maior quantidade para a fase rica em etanol por ser mais hidrofóbica, como sugerido por Reis et al. (2015).

Os compostos fenólicos sem carga geralmente têm pK_a da ordem de 3-4, de modo que a elevação para além desses níveis provoca a ionização do grupo hidroxila influenciando nas características de solubilidade da biomolécula entre as fases permitindo maior interação da antocianina com a fase de fundo (REIS et al., 2015; CLAUDIO et al., 2012).

Todos estes processos que ocorrem com a biomolécula modificam sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição.

Para o extrato de jambolão, o maior coeficiente de partição foi obtido para o sistema composto por 26% de concentração de etanol e 25% de concentração de fosfato de sódio a 15°C com $K = 221$, $R_1 = 68,6\%$ e $R_2 = 99,6\%$.

Almeida (2016) obteve valores inferiores para o coeficiente de partição em sistemas formados por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e etanol, onde o sistema que apresentou melhor coeficiente de partição da antocianina (K) foi o sistema composto por 30% etanol e 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, apresentando $K_1 = 11,8$.

Como mostrado na Tabela 8, a recuperação absoluta da antocianina (R_1), no geral, aumenta com a elevação da concentração de etanol no sistema, como por exemplo, do ensaio 3 para o ensaio 4, com 29% de fosfato de sódio e com o aumento de 26 a 30% de etanol houve um acréscimo de 22%, tal fato evidencia a tendência da antocianina se concentrar na fase de topo. Da mesma forma, registraram-se maiores valores de R_1 em concentrações mais altas de

fosfato de sódio, como por exemplo, ensaio 6 e 7, com aumento de 25 para 29% de sal, houve um acréscimo de 25%.

Além destes fatores citados anteriormente, a temperatura e a adição de novos sais têm sido alternativas que podem corroborar com a partição das biomoléculas. A adição de sais pode aumentar a diferença de hidrofobicidade entre as fases devido à diminuição da quantidade de água à superfície. Isso pode resultar na exposição das partes hidrofóbicas na superfície da biomolécula, que irá promover interações hidrofóbicas com o etanol, portanto, aumentar o coeficiente de partição (ROSA et al., 2010). O efeito da temperatura no SAB varia de acordo com o tipo dos componentes e tem relação direta com o tipo de biomolécula que será empregada.

5.2 REPOLHO ROXO

5.2.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^4 + 4$ PONTOS CENTRAIS

Na Tabela 12 são apresentados os resultados do coeficiente de partição, da recuperação absoluta e da recuperação relativa obtidos dos experimentos com repolho roxo, de acordo com a matriz do planejamento experimental.

Tabela 12 – Matriz do planejamento experimental para o repolho roxo

Ensaio	Etanol (%)	Fosf. de Sódio (%)	Tempo (min)	Tempera- tura (°C)	K	R1 (%)	R2 (%)
1	25	24	30	30	380	75,8	99,8
2	29	24	30	30	352	78,8	99,8
3	25	28	30	30	396	78,9	99,8
4	29	28	30	30	182	78,3	99,8
5	25	24	60	30	127	74,7	99,3
6	29	24	60	30	178	76,7	99,5
7	25	28	60	30	417	81,5	99,8
8	29	28	60	30	123	77,8	99,4
9	25	24	30	60	110	66,9	99,2
10	29	24	30	60	374	79,1	99,8
11	25	28	30	60	414	77,5	99,8
12	29	28	30	60	182	76,8	99,6
13	25	24	60	60	93,2	67,0	98,9
14	29	24	60	60	163	67,6	99,5
15	25	28	60	60	187	67,0	99,4
16	29	28	60	60	333	67,7	99,7
17	27	26	45	45	404	80,3	99,8
18	27	26	45	45	406	82,3	99,8
19	27	26	45	45	404	80,3	99,8
20	27	26	45	45	402	79,9	99,8

Como mostrado na Tabela 12, à medida que se diminuiu a concentração de etanol e se aumentou a concentração de fosfato de sódio no sistema,

aumentou o coeficiente de partição. Hua (2013), diferentemente, aumentou a concentração de sal e de álcool, e a partição das antocianinas de *Vaccinium uliginosum* Linn foi em função do aumento da concentração global do sistema. Este comportamento pode ser explicado pelo aumento da solubilidade do soluto em menores concentrações salinas devido ao aumento da solvatação, de modo que menor quantidade de pigmento estará disponível para interagir com a fase rica em álcool (fase superior). Com isso a maior solvatação resulta em menor concentração de antocianina na fase superior e, portanto, menor coeficiente de partição em SAB com menores concentrações de sal.

As recuperações absolutas e relativas da antocianina, de forma geral, aumentaram com a elevação da concentração de álcool e sal. Tal fato evidencia a tendência da antocianina se concentrar na fase de topo. Nota-se que a partição de antocianina foi influenciada pela composição global do sistema, uma vez que os sistemas avaliados apresentaram valores de coeficiente de partição diferentes. Isso indica que a variação nas concentrações de etanol e fosfato de sódio influenciou na migração do pigmento para uma das fases.

Resultado semelhante foi encontrado por Jampani et al. (2015), que estudaram a partição de antocianina de *Brassica oleracea* L. em SAB compostos por polietileno glicol e sulfato de magnésio e obtiveram valores de coeficiente de partição maiores do que 6 ($6 < K < 62,5$), indicando que o pigmento apresentou maior afinidade pela fase superior, rica em polietileno glicol.

A diferente distribuição da antocianina entre as duas fases aquosas do sistema resultou do balanço de interações entre o pigmento e os componentes das fases, de topo e de fundo. Uma vez que ocorreu maior migração do pigmento para fase de topo, compreende-se que as interações entre o álcool são mais favoráveis do que as interações do pigmento com o sal.

Dentre os sistemas formados com a variação da concentração de fosfato de sódio, de etanol, tempo e temperatura, o SAB que apresentou melhores recuperações e coeficiente de partição para as antocianinas do repolho roxo foi o sistema composto por 25% de etanol e 28% de fosfato de sódio a 60 minutos

e para temperatura de 30°C, apresentando $K = 417$, $R1 = 81,5\%$ e $R2 = 99,78\%$.

Segundo Kato, Tonhi e Clemente (2012) quanto menor o pH, maior será a concentração destes pigmentos. Assim, encontrou a melhor ação da solução extratora para as antocianinas com concentração de etanol de 60% acidificado a pH 2,0.

Pode-se observar a partir da Tabela 9, que a recuperação absoluta diminuiu com um aumento na temperatura de 30°C a 60°C.

Nas Tabelas 13 e 14, são mostrados os efeitos significativos com 95% de confiança para cada resposta obtida experimentalmente: coeficiente de partição, recuperação absoluta e recuperação relativa.

Tabela 13 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre as variáveis de resposta coeficiente de partição (K)

	K		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)*	- 29,8	0,000045	0,816497
Fosfato de sódio (Linear)*	+ 56,9	0,000007	0,816497
Tempo (Linear)*	- 96,0	0,000001	0,816497
Temperatura (Linear)*	- 37,4	0,000023	0,816497
Etanol x Fosfato de sódio*	- 119	0,000001	0,816497
Etanol x Tempo*	+ 22,9	0,000099	0,816497
Etanol x Temperatura*	+ 91,8	0,000002	0,816497
Fosfato de sódio x Tempo*	+ 67,5	0,000004	0,816497
Fosfato de sódio x Temperatura *	+ 36,9	0,000024	0,816497
Tempo x Temperatura *	+ 20,1	0,000146	0,816497

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança.

Tabela 14 - Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre as variáveis de resposta recuperação absoluta (R1) e recuperação relativa (R2)

	R1			R2		
	Efeito	p	Desvio padrão	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)	+ 1,70	0,052076	0,544030	+ 0,121*	0,000076	0,003934
Fosfato de sódio (Linear)	+ 2,38*	0,022210	0,544030	+ 0,169*	0,000028	0,003934
Tempo (Linear)	- 4,02*	0,005137	0,544030	- 0,211*	0,000014	0,003934
Temperatura (Linear)	- 6,60*	0,001206	0,544030	- 0,131*	0,000059	0,003934
Etanol x Fosfato de sódio	- 2,77*	0,014639	0,544030	- 0,252*	0,000008	0,003934
Etanol x Tempo	- 1,76*	0,047995	0,544030	+ 0,070*	0,000386	0,003934
Etanol x Temperatura	+ 1,54	0,066184	0,544030	+ 0,207*	0,000015	0,003934
Fosfato de sódio x Tempo	- 0,355	0,560319	0,544030	+ 0,125*	0,000068	0,003934
Fosfato de sódio x Temperatura	- 0,288	0,633045	0,544030	+ 0,142*	0,000047	0,003934
Tempo x Temperatura	- 3,75*	0,006275	0,544030	+ 0,0150*	0,031702	0,003934

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 95% de confiança .

Após a realização da análise dos efeitos significativos, tem-se que a concentração de etanol, concentração de fosfato de sódio, tempo e temperatura foram significativas com 95% de confiança.

Analisando o coeficiente de partição as variáveis de entrada concentração de fosfato de sódio (linear) e as interações concentração de fosfato de sódio x tempo, concentração de fosfato de sódio x temperatura, concentração de etanol x temperatura, concentração de etanol x tempo, tempo

x temperatura tiveram um efeito positivo, ou seja, à medida que se aumentou estes fatores houve um aumento na resposta. Por outro lado, tempo (linear), temperatura (linear), concentração de etanol (linear) e a interação concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio tiveram efeito negativo, diminuindo a resposta à medida que aumentou seus níveis inferior para o superior.

Na recuperação absoluta, as variáveis de entrada concentração de etanol (linear) e concentração de fosfato de sódio (linear) tiveram um efeito positivo, portanto, à medida que se aumentou estes fatores houve um aumento na recuperação absoluta. Já a temperatura (linear), tempo (linear) e as interações concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio, tempo x temperatura, concentração de etanol x tempo tiveram um efeito negativo, ou seja, quando houve um aumento em seus níveis houve também um decréscimo na resposta.

Na recuperação relativa as variáveis de entrada concentração de etanol (linear), concentração de fosfato de sódio (linear) e as interações concentração de etanol x temperatura, concentração de fosfato de sódio x temperatura, concentração de fosfato de sódio x tempo, concentração de etanol x tempo e tempo x temperatura tiveram um efeito positivo, ocorrendo assim um acréscimo da resposta à medida que se aumentou estes fatores. Para a temperatura (linear), tempo (linear) a interação concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio tiveram um efeito negativo, com isso aumentando seus níveis houve um decréscimo na resposta.

Em função da análise dos efeitos se ampliou a faixa de concentração de etanol e de fosfato de sódio (efeito positivo) e se reduziu a faixa de tempo e temperatura experimentais (efeito negativo).

5.2.2 DCCR 2^4 + 8 PONTOS AXIAIS + 4 PONTOS CENTRAIS

Na Tabela 15 são apresentados os resultados de partição, recuperação absoluta e recuperação relativa, obtidos dos experimentos com repolho roxo, de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Tabela 15 – DCCR para o repolho roxo

Ensaio	Etanol (%)	Fosfato de sódio (%)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	K	R1 (%)	R2 (%)
1	28	27	15	20	20,7	82,3	96,3
2	30	27	15	20	18,2	87,3	96,1
3	28	29	15	20	23,9	89,4	96,7
4	30	29	15	20	17,2	82,2	95,9
5	28	27	30	20	17,0	78,0	94,9
6	30	27	30	20	16,8	84,8	95,6
7	28	29	30	20	15,9	74,4	94,7
8	30	29	30	20	16,3	77,1	95,1
9	28	27	15	30	33,5	65,8	97,5
10	30	27	15	30	25,4	69,6	97,1
11	28	29	15	30	26,1	65,0	96,7
12	30	29	15	30	21,7	68,0	96,6
13	28	27	30	30	35,6	66,0	97,7
14	30	27	30	30	25,2	65,4	96,7
15	28	29	30	30	24,0	62,9	96,3
16	30	29	30	30	25,3	65,6	97,0
17	27	28	22,5	25	20,9	79,9	96,1
18	31	28	22,5	25	12,6	85,8	94,1
19	29	26	22,5	25	23,9	81,0	96,6
20	29	30	22,5	25	19,2	83,6	95,7
21	29	28	7,5	25	21,1	85,1	96,1
22	29	28	37,5	25	21,1	88,5	96,1
23	29	28	22,5	15	17,1	88,0	95,7
24	29	28	22,5	35	18,3	83,6	95,5
25	29	28	22,5	25	19,3	83,8	95,7
26	29	28	22,5	25	18,8	78,9	95,6
27	29	28	22,5	25	21,2	85,6	96,2
28	29	28	22,5	25	17,8	82,9	95,4

De acordo com as mudanças nos níveis que a análise de efeitos orientou, obteve-se um incremento na recuperação absoluta. Contudo, houve uma redução na recuperação relativa e no coeficiente de partição. A combinação de 28 % de etanol, 27% de fosfato de sódio por 30 minutos e à temperatura de 30°C foi a mais promissora, com $K = 35,6$, $R1 = 66\%$, $R2 = 97,7\%$.

Na sequência, são mostrados os efeitos significativos (Tabela 16) com 92% de confiança para cada resposta experimental.

Tabela 16 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta coeficiente de partição

	K		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear) *	- 3,93	0,006634	0,582499
Etanol (Quadrático)	- 0,129	0,838749	0,582499
Fosfato de sódio (Linear) *	- 2,62	0,020587	0,582499
Fosfato de sódio (Quadrático) *	+ 2,27	0,029952	0,582499
Tempo (Linear)	- 0,883	0,226671	0,582499
Tempo (Quadrático) *	+ 2,046	0,039137	0,582499
Temperatura (Linear) *	+ 6,10	0,001859	0,582499
Temperatura (Quadrática)	+ 0,346	0,594498	0,582499
Etanol x Fosfato de sódio	+ 1,48	0,130551	0,713413
Etanol x Tempo	+ 1,60	0,110680	0,713413
Etanol x Temperatura	- 1,58	0,114347	0,713413
Fosfato de sódio x Tempo	- 0,525	0,515109	0,713413
Fosfato de sódio x Temperatura *	- 2,90	0,026850	0,713413
Tempo x Temperatura *	+ 2,18	0,055484	0,713413

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 92% de confiança.

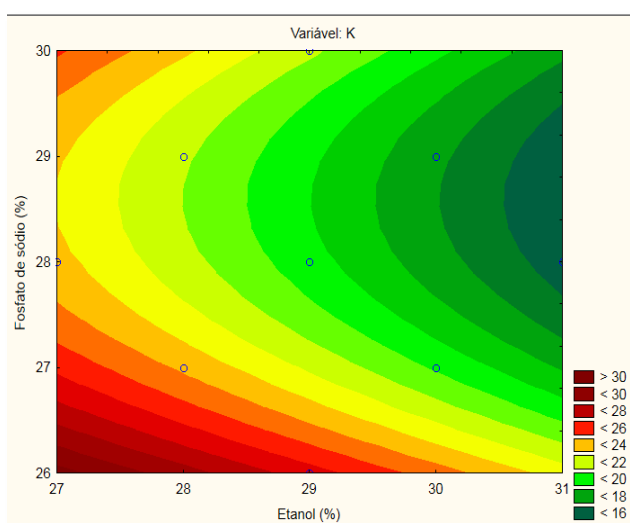
A análise evidenciou que para a resposta coeficiente de partição os efeitos da concentração de etanol (linear), concentração de fosfato de sódio (linear e quadrático), do tempo (quadrático), da temperatura (linear), e as interações da concentração de fosfato de sódio x temperatura e tempo x temperatura foram significativos a 92% de confiança.

Dada essa observação, efetuou-se a análise de variância (ANOVA) obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,66$, o que indica que apenas 66% da variabilidade na resposta coeficiente de partição pode ser explicada através de um modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 5,60$ foi superior ao do $F_{\text{Tabelado}} (2,19)$. Quando o valor de F calculado for maior que o tabelado para o nível de confiança adotado, há evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis. Nesse caso houve uma baixa relação, pois deveria ser no mínimo 3 vezes maior e dessa forma indicou que um modelo não pode ser estabelecido para correlacionar os dados com confiança.

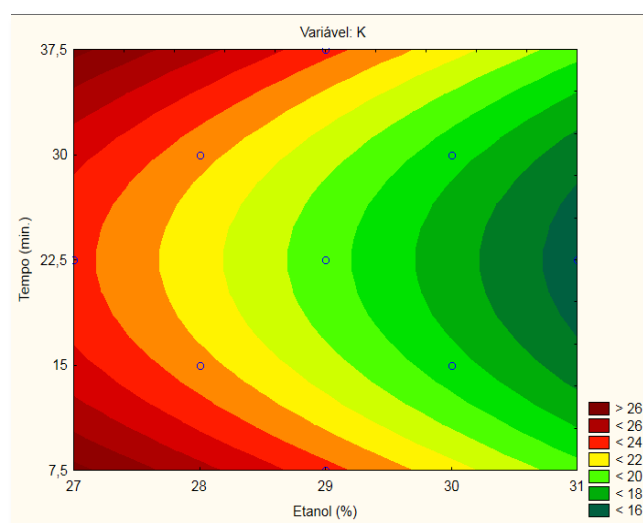
Em busca das condições mais pertinentes para alcançar o máximo coeficiente de partição das antocianinas, foi realizada a análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno, como é mostrado na Figura 8 para o coeficiente de partição.

Figura 8 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta coeficiente de partição: a) concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio; b) concentração de etanol x tempo c) concentração de etanol x temperatura; d) concentração de fosfato de sódio x tempo; e) concentração de fosfato de sódio x temperatura; f) tempo x temperatura.

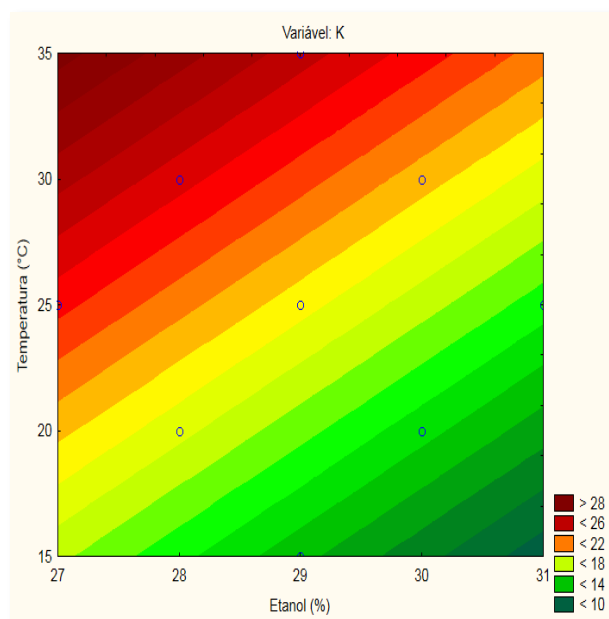
a)



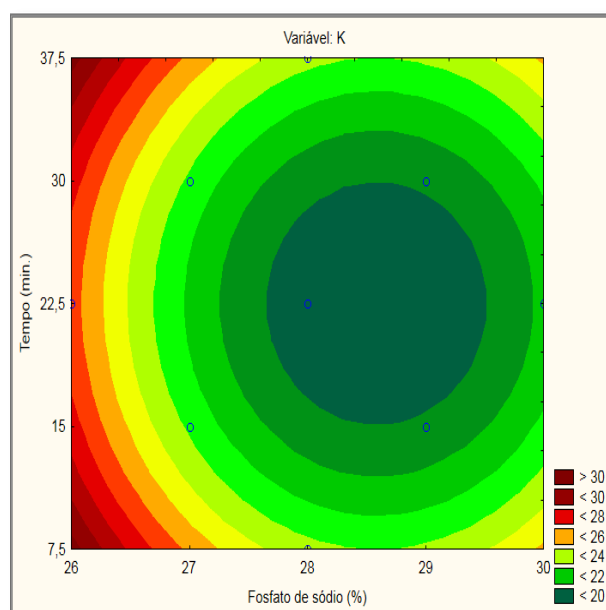
b)



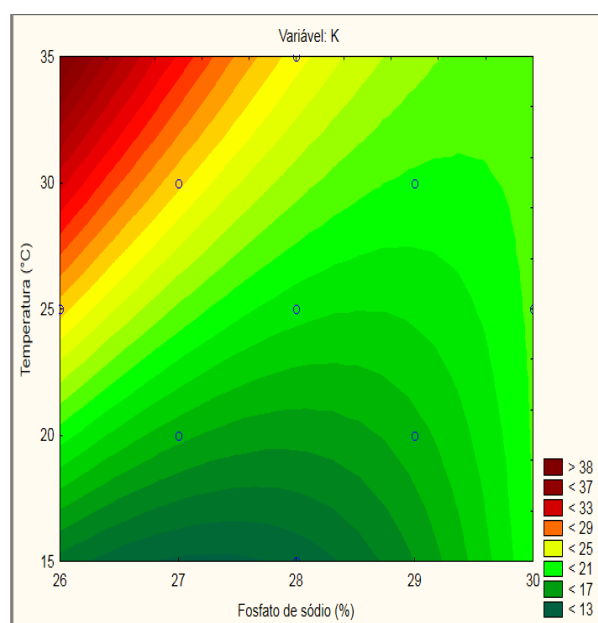
c)



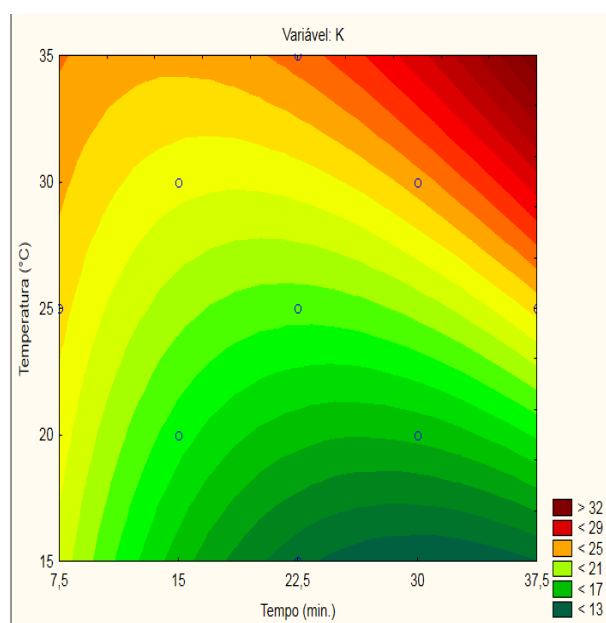
d)



e)



f)



As curvas de contorno evidenciaram, dentro do cenário estudado, duas alternativas: diminuição da concentração de etanol, diminuição da concentração de fosfato de sódio e aumento da temperatura para todo intervalo de tempo estudado ou aumento do tempo. Para tomar a decisão correta, deve-se fazer testes experimentais avaliando as duas alternativas, para assim poder trabalhar na melhor região possível para promover a partição das antocianinas.

Visando atingir as melhores condições para maximizar a recuperação absoluta (R1) das antocianinas, foi realizada a análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno, como é mostrado na Figura 9 para essa resposta.

Tabela 17 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta recuperação absoluta (R1)

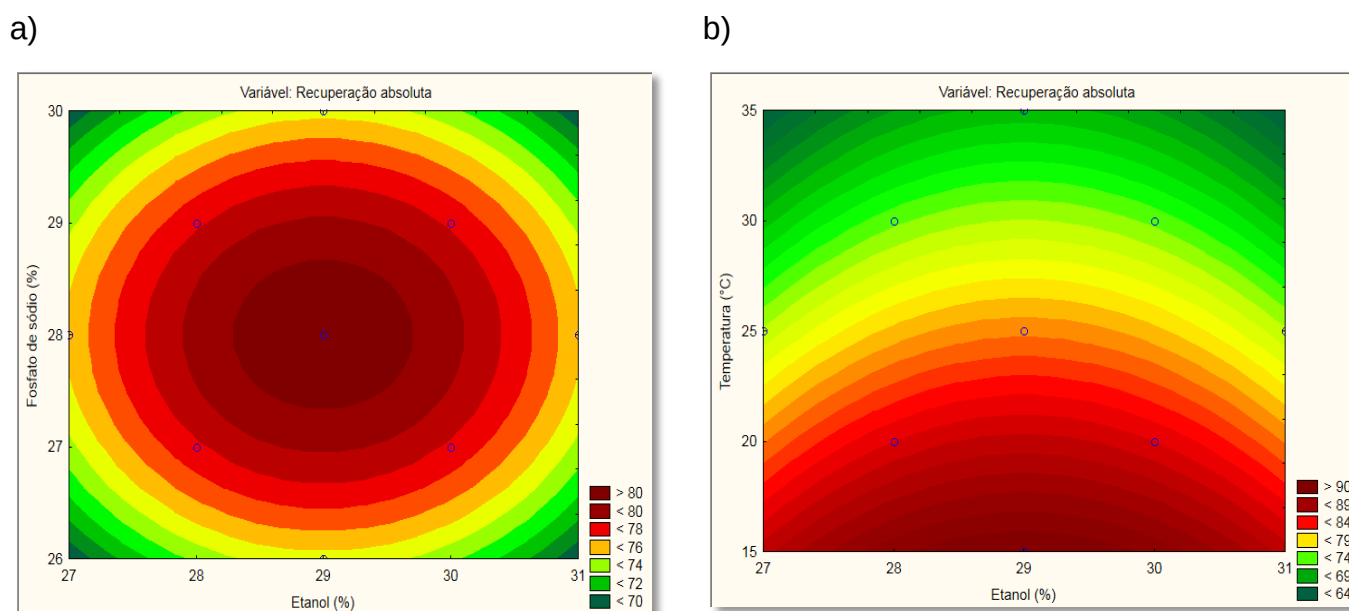
	R1		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)	+ 2,33	0,136893	1,156143
Etanol (Quadrático) *	- 3,46	0,058072	1,156143
Fosfato de sódio (Linear)	- 0,783	0,546636	1,156143
Fosfato de sódio (Quadrático) *	- 3,73	0,048248	1,156143
Tempo (Linear)	- 2,38	0,131313	1,156143
Tempo (Quadrático)	- 1,48	0,289629	1,156143
Temperatura (Linear) *	- 11,3	0,002256	1,156143
Temperatura (Quadrática)	- 1,98	0,184766	1,156143
Etanol x Fosfato de sódio	- 1,72	0,310202	1,415980
Etanol x Tempo	+ 0,875	0,580352	1,415980
Etanol x Temperatura	+ 0,200	0,896628	1,415980
Fosfato de sódio x Tempo	- 1,72	0,310202	1,415980
Fosfato de sódio x Temperatura	+ 0,500	0,747359	1,415980
Tempo x Temperatura	+ 2,30	0,202773	1,415980

+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 92% de confiança.

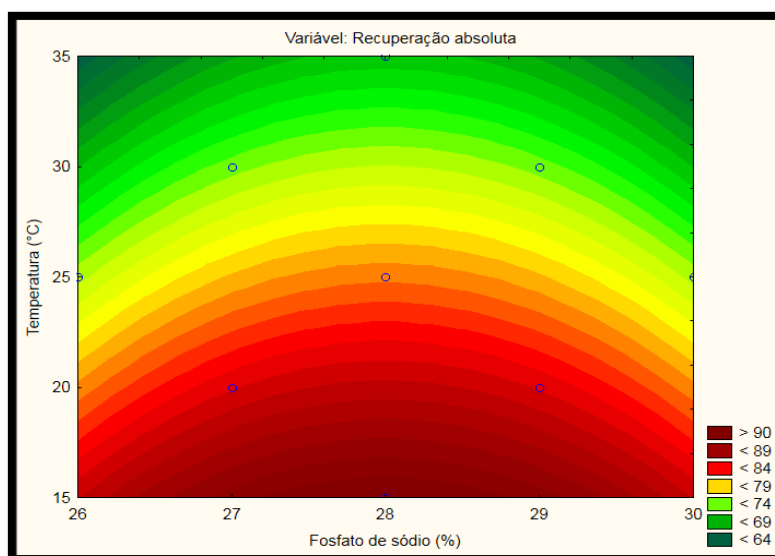
A análise de efeitos permitiu determinar que para a resposta recuperação absoluta, os efeitos concentração de etanol (quadrático), concentração de fosfato de sódio (quadrático) e temperatura (linear) foram significativos a 92% de confiança.

A partir desse resultado, efetuou-se a análise de variância (ANOVA) obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,44$, isso indica que apenas 44% da variabilidade na resposta da partição pode ser explicada por um modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 6,17$ foi superior ao valor do F_{Tabelado} (2,54), mas não mais do que o mínimo de 3 vezes. Dado que o coeficiente de correlação foi baixo, não foi válido estabelecer um modelo preditivo para esta resposta.

Figura 9 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta recuperação absoluta: a) concentração de etanol x concentração de fosfato de sódio; b) concentração de etanol x temperatura c) concentração de fosfato de sódio x temperatura



c)



Através da análise da Figura 9, observou-se que dentro do cenário estudado, diminuindo a temperatura e trabalhando na faixa de 28% a 30% de etanol e 27% a 29% de fosfato de sódio, houve um aumento na resposta recuperação absoluta.

Já para a resposta recuperação relativa (Tabela 18), observou-se que os efeitos da concentração de fosfato de sódio (quadrático), tempo (linear), temperatura (linear) e a interação: tempo x temperatura foram significativos a 92% de confiança.

Tabela 18 – Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações para a resposta recuperação relativa (R2)

	R2		
	Efeito	p	Desvio padrão
Etanol (Linear)	- 0,381	0,085692	0,150811
Etanol (Quadrático)	- 0,136	0,433277	0,150811
Fosfato de sódio (Linear)	- 0,382	0,085417	0,150811
Fosfato de sódio (Quadrático) *	+ 0,413	0,071390	0,150811
Tempo (Linear) *	- 0,412	0,071837	0,150811
Tempo (Quadrático)	+ 0,363	0,095054	0,150811
Temperatura (Linear) *	+ 0,825	0,011997	0,150811
Temperatura (Quadrática)	+ 0,129	0,455653	0,150811
Etanol x Fosfato de sódio	+ 0,139	0,507000	0,184705
Etanol x Tempo	+ 0,260	0,253160	0,184705
Etanol x Temperatura	- 0,112	0,585419	0,184705
Fosfato de sódio x Tempo	- 0,0633	0,754458	0,184705
Fosfato de sódio x Temperatura	- 0,271	0,238026	0,184705
Tempo x Temperatura *	+ 0,548	0,059178	0,184705

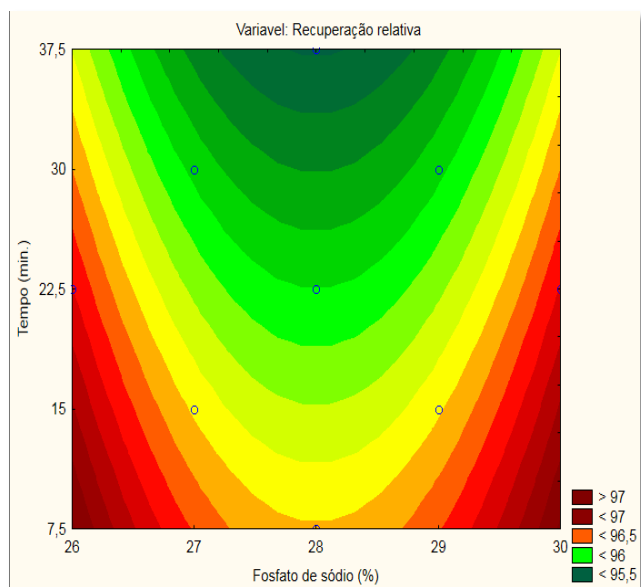
+ = efeito positivo; - = efeito negativo; * = variável significativa com 92% de confiança.

A análise de variância (ANOVA) forneceu um coeficiente de determinação $R^2 = 0,39$, o que indica que apenas 39% da variabilidade na resposta da recuperação relativa pode ser explicada através de um modelo matemático. O valor de $F_{\text{calculado}} = 3,72$ foi superior ao valor de $F_{\text{Tabelado}} (2,39)$. Nesse caso, assim como para as respostas coeficiente de partição e recuperação absoluta, houve uma baixa relação, pois o valor do $F_{\text{calculado}}$ deveria ser no mínimo 3 vezes maior que do F_{Tabelado} . Dado ainda que o coeficiente de correlação foi baixo, um modelo seria inválido para fins preditivos.

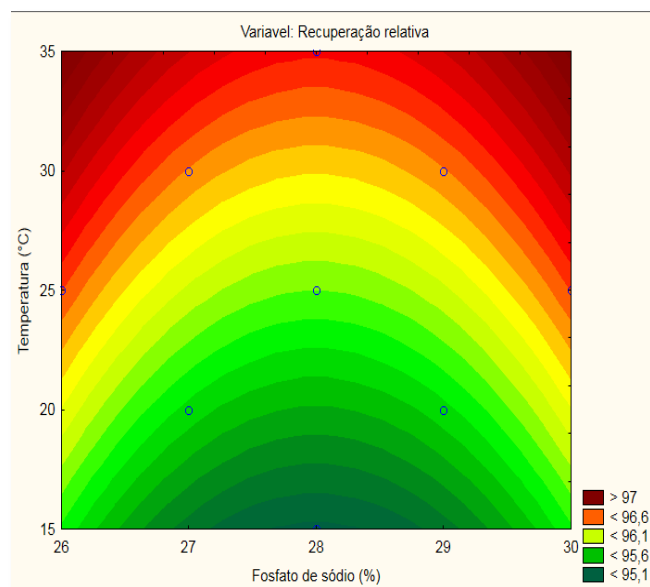
Em seguida foi realizada a análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno para a recuperação relativa, como está ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Curvas de contorno das interações das variáveis independentes estudadas para a resposta recuperação relativa: a) concentração de fosfato de sódio x tempo; b) concentração de fosfato de sódio x temperatura c) tempo x temperatura

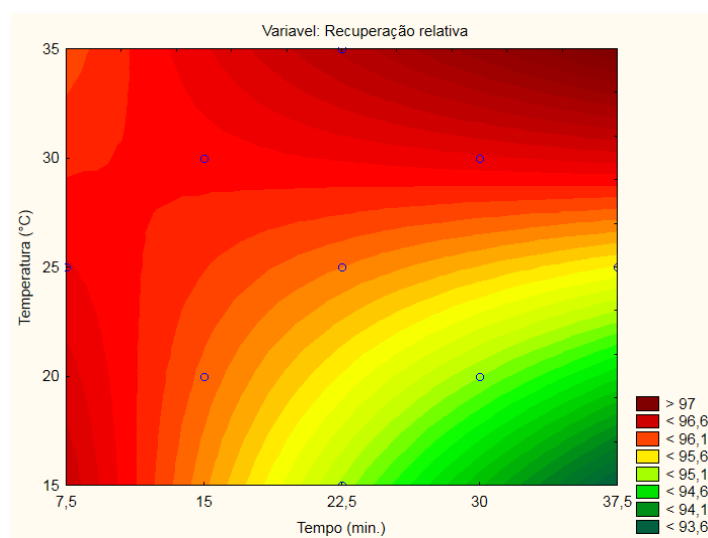
a)



b)



c)



O estudo da Figura 10 permitiu observar que dentro do cenário estudado, houveram duas possibilidades: diminuição do tempo para todo intervalo de concentração de fosfato de sódio estudado ou aumento do tempo e aumento da temperatura. Para decidir qual alternativa é mais promissora devem-se testar as duas e verificar qual delas ocasiona um maior incremento na recuperação relativa das antocianinas do repolho roxo.

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO JAMBOLÃO E DO REPOLHO ROXO

Comparando-se os resultados obtidos no SAB com extrato de jambolão e com extrato de repolho roxo, apenas o tempo não foi significativo na purificação do primeiro extrato, sendo todas variáveis de entrada significativas na purificação do extrato de repolho roxo. As matrizes do planejamento experimental e as tendências para a realização do DCCR, de acordo com a análise dos efeitos, foram as mesmas para ambos os extratos. Melhores resultados foram encontrados para o extrato de jambolão, com $k = 221$, enquanto que para o extrato de repolho roxo, $k = 35,6$, obtendo recuperação absoluta e relativa próximas, para o jambolão, $R1 = 68,9\%$ e $R2 = 99,6\%$ e para o repolho roxo, $R1 = 66\%$ e $R2 = 97,7\%$.

Para o extrato de jambolão, no planejamento fatorial completo 2^4 , foi encontrado $k = 175$ e no DCCR teve um acréscimo de $26,3\%$ com $k = 221$. Percebe-se que para este extrato ocorreu o efeito de salting out, como explicado anteriormente, aumentando a partição para a fase de topo. Já o extrato de repolho roxo, no planejamento fatorial completo 2^4 , obteve $k = 417$ e no DCCR, $k = 35,6$, sendo esse fenômeno explicado pelo efeito do volume de exclusão, ocasionado pelo aumento da concentração do álcool e acarretando na diminuição da solubilidade e aumento da viscosidade das antocianinas na fase de fundo. Para ambos os extratos, para aumentar a resposta de coeficiente de partição o planejamento fatorial completo indicou trabalhar na

faixa de baixas temperaturas, sendo este fator importante na estabilidade das antocianinas porque à medida que se submete a solução de antocianinas a uma temperatura superior à ambiente (25°C), a sua degradação é maior, mesmo quando complexadas com ácido tânico, e esta degradação é ainda mais acentuada quando se aumenta o pH do meio (STRINGHETA, 1991).

Apesar da importância do estudo do sistema de purificação da antocianina é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo, este sempre vai causar alterações na biomolécula. Alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação. Portanto, a caracterização bioquímica das antocianinas é importante, por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações sofridas pela mesma.

6. CONCLUSÃO

Para todos os sistemas houve predominância do pigmento da fase superior (rica em álcool). O maior coeficiente de partição foi obtido para o sistema composto por 26 % de concentração de etanol, 25 % de concentração de fosfato de sódio e 15°C, para o extrato de jambolão, e apresentou condições mais favoráveis para recuperação de antocianina, enquanto que para o extrato de repolho roxo o maior coeficiente de partição foi obtido para o sistema composto por 28 % de concentração de etanol, 27 % de concentração de fosfato de sódio, 30 minutos e 30°C.

Os resultados obtidos através do planejamento experimental para o extrato de jambolão sugeriram que para aumentar o coeficiente de partição deve-se trabalhar com baixas temperaturas para toda faixa de concentração de etanol e de fosfato de sódio estudadas. Já para o extrato de repolho roxo, sugeriram para aumentar o coeficiente de partição baixas concentrações de etanol, baixas concentrações de fosfato de sódio e altas temperaturas para toda faixa de tempo estudada ou até o aumento do tempo, seriam adequados, podendo-se trabalhar na faixa de concentração de 28% a 30% de concentração de etanol e 27% a 29% de concentração de fosfato de sódio.

Dado o êxito na partição das antocianinas de ambos os extratos, o SAB não convencional mostrou-se como uma alternativa viável e econômica para a purificação parcial das antocianinas, com coeficiente de partição e recuperações adequadas ao tipo de processo, estimulando o uso industrial desse pigmento, aliado a outros fatores favoráveis relacionados às antocianinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York, v. 161, n. 1, p. 227, 1987.

ALMEIDA, H. N. **Extração e purificação parcial de antocianinas do mirtilo com remoção simultânea dos açúcares redutores usando o sistema de duas fases aquosas etanol/sulfato de amônio**, 2016. Dissertação (Graduação em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

ANDERSEN, O. M.; JORDHEIM, M. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. p.1197, 2006.

ANTELO, F.; COSTA, J.; KALIL, S. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in Aqueous Two-Phase Systems using an Experimental Design. **Journal Brazilian Archives of Biology And Technology**, v.58, p.1-11, 2015.

AQIL, F.; GUPTA, A.; MUNAGALA, R.; JEYABALAN, J.; KAUSAR, H.; SHARMA, R.; SINGH, I. P. Antioxidant and antiproliferative activities of anthocyanin/ellagitannin-enriched extracts from *Syzygium cumini* L. (Jamun, the Indian Blackberry). **Nutrition and cancer**, Hillsdale, v. 64, n. 3, p. 428-438, 2012.

AYYANAR, M.; BABU, P. S. *Syzygiumcumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Journal of Tropical Biomedicine**, v. 18, n. 3, p. 240-246, 2012.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 83-89, 2008.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, p. 401, 2001.

BARUFFALDI, R., OLIVEIRA, M.N. **Fundamentos de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, v. 3, p. 317, 1998.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, p. 234, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 44, de 25 de novembro de 1977. – ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: maio de 2018. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 28 out. 1997.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 26 março 1965.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 28 out. 1997.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro com o-fenantrolina. Um tutorial, Parte III. **QuímicaNova**, v. 37, p. 564, 2014.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B.; Statistical Design – Chemometrics, 1st ed., **Elsevier Science**: Amsterdam, 2006.

BURIN, V. M.; SILVA, A. L.; MALINOVSKI, L. I.; ROSIER, J. P.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Characterization and multivariate classification of grapes and wines of two Cabernet Referências 194 Sauvignon clones. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 474-481, 2011.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de Experimentos usando o estatística**, ed. E-Papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro, 2003.

CARDOSO, G.B.; SOUZA, I.N.; MOURÃO, T.; FREIRE, M.G.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile

and polyols: phase diagrams and extractive performance. **Separation and Purification Technology**. In press, 2014.

CARVALHO, C. C.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. H.; MAFFIA, M. C. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15). **Journal Chemical & Engineering Data**, 52, p. 351-356, 2007.

CASTANEDA, L. M. F. **Antocianinas: o que são? Onde estão? Como atuam**. Seminário, UFRGS; Porto Alegre; 2009.

CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1148-55, 2010.

CHIGURUPATI, N.; SAIKI, L.; GAYSER JR., C. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, n.2, p.293-299, 2002.

CLÁUDIO, A. F. M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D., COUTINHO, J. A. P. Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquidbased aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 97, p. 142–149, 2012.

CLÁUDIO, A. F. M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D., COUTINHO, J. A. P. Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75, p. 39-47, 2010.

COBUCCI, R. M. A. **Análise Sensorial: Apostila do Curso. Curso Tecnológico Superior em Gastronomia**. Pontifica Universidade Católica de Goiás, 2010.

COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido, Viçosa: UFV, 2003.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2002.

COSENTINO, H. M. **Efeitos da Radiação Ionizante em Corantes Naturais de Uso Alimentício**. Tese (Doutor em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

COSTA, A. R. **Partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação de Mestrado, UESB; Itapetinga; 2010.

CUNHA, F. G. **Estudo da Extração Mecânica de Bixina das Sementes de Urucum em Leito de Jorro**. Dissertação (Mestre em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

DILER, E. A.; IPEK, R. Main and interaction effects of matrix particle size, reinforcement particle size and volume fraction on wear characteristics of Al–SiCp composites using central composite design. **Composites Part B: Engineering**, v. 50, p. 371–380, 2013.

DRUNKLER, D.; FALCÃO, L.; BORDIGNON-LUIZ, M. Influência dos ácidos tânico e gálico na estabilidade de betacianinas do extrato bruto de beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*). **Alimentos e Nutrição**, v.15, n.1, p.35-41, 2004.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/23670438/pesquisa-desenvolve-corantes-naturais-de-frutas-tropicais-com-potencial-funcional>, 2017. Acesso em: maio de 2018.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the FolinCiocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8.139-8.144, 2010.

FABRÍCIO, A.; COELHO, A.; ANDRADE, K.; ALMEIDA, R.; SANTOS, T. **Estudo do comportamento de alguns pigmentos naturais**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sertão Pernambucano, 2010.

FALCÃO, L. D.; BARROS, D. M.; GAUCHE, C.; LUIZ, M. T. **B.Copigmentação intra e intremolecular de antocianinas: uma revisão**. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v. 21, p. 351-366, 2003.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. C. de V.; SILVA, M. A. A. P. da; CHAVES, J. B. P.; BARBOSA, E. M. de M. Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos, p. 127, 2000.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, p. 279-299, 2008.

FRICK, D. The coloration of food. **Revista Prog. Color**, v 33, p 14-32, 2003.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins: Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p.72-77, 1968.

GOMES, L. M. M. **Inclusão de Carotenoides de Pimentão Vermelho em Ciclodextrinas e Avaliação da Sua Estabilidade, Visando Aplicação Em Alimentos**. Dissertação (Mestre em Ciências Aplicadas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letter**, v. 171, p. 17-25, 2001.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J. **The flavonoids: advances in research since 1980**. p. 161, 1988.

HUA, Z.; YUESHENG, D.; GE, X.; MENGLU, L.; LIYA, D.; LIJIA, A.; ZHILONG, X. Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. **Journal of Chromatography & Separation Technique**, v.4, p. 1-5, 2013.

IDAKA, E., Aciled anthocyanins from red cabbage, Patente japonesa 62,209,173, 1987.

JAMPANI, CHANDRASEKHAR; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Differential Partitioning for Purification of Anthocyanins from Brassica oleracea L. **Separation and Purification Technology**, v. 151, p. 57-65, 2015.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; I WASHINA, A.; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced Epstein virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, v. 115, p. 173-178, 1997.

KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Eclética Química**, v. 26, 2001.

KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. Antocianinas de uvas (Vitis vinífera L.) produzidas em sistema convencional. Campus Ponta Grossa - Paraná – Brasil. ISSN: 1981-3686. v. 06, n. 02: p. 809-821, 2012

KIRAN, B. et al. Statistical optimization using Central Composite Design for biomass and lipid productivity of microalga: A step towards enhanced biodiesel production. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 73–81, 2016.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 63-68, 2002.

LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; OLIVEIRA, M. G. M.; R IEHL, H. C. A. S. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of Syzygium cumini (L.) skeels (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 860-864, 2007.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 40, p. 173-289, 2000.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Composição centesimal, potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de jambolão (*Syzygiumcumini*). **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 219-223, 2009.

MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: Na eficiente, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7623-29, 2009.

MALPIEDI, L.P., ROMANINI, D., PICÓ, G.A., NERLI, B.B., Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers, **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 40–45, 2009.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, Vol. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MENDONÇA, J. N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MORITZ, D. E. **Produção do Pigmento Monascus Por Monascusruber CCT 3802 em Cultivo Submerso**. Tese (Doutor em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2006.

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**. v. 44, p. 1083–1087, 2009.

PATRÍCIO, P. R. Extração e purificação de antocianina utilizando sistemas aquosos bifásicos. Viçosa, 2012.

PEREIRA, A. C. S.; MOURA, S. M.; CONSTANT, P. B. L. Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 189-200, 2008.

PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri - SP, Manole, 2005

PRADO, M. A.; GODOY, M. T. Corantes Artificiais Em Alimentos, **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.

RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food and Bioproducts Processing**, doi: 10.1016/j.fbp.2010.02.001, 2010.

REDDY, P. B. S.; NISHINA, K.; BABU, S. A. “Taguchi’s methodology for multi-response optimization: a case study in the Indian plastics industry”. **International Journal of Quality & Reliability Management**. v.15, n.6, p. 646 – 668, 1998.

REIS, I. A. O., CAMPOS, A. F., SANTOS, P. H. S., SANTOS, S. B., SOARES, C. M. F., LIMA, A. S. Potassium Phosphate Salts-Based Aqueous Two-Phase Systems Applied in the Extraction of Gallic Acid from Guava. **Separation Science and Technology**, v. 50, p. 520-528, 2015.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 883-890, 2008.

Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Azevedo, A. M., Aires-Barros, M. R. Aqueous twophase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296–2305, 2010.

ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296–2305, 2010.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two phase affinity partitioning systems: current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1–13, 2012.

SANTOS, F. M.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A.; BARTHUS, R. C.; POPPI, R. J.; AMARAL, A. C. F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphusamazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1629-1633, 2011.

SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature, *Process Biochemistry*, v. 43, p. 905-911, 2008.

SHOW, P. L., OOI, C. W., ANUAR, M. S., ARIFF, A., YUSOF, Y.A., CHEN, S. K., ANNUAR, M. S. M., LING, T. C. Recovery of lipase derived from *Burkholderiacenocepacia* ST8 using sustainable aqueous two-phase flotation composed of recycling hydrophilic organic solvent and inorganic salt. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 112–118, 2013.

SILVA, E. O.; CARNELOSSI, M. A. G.; PUSCHMANN, R.; SOARES, N. F. F.; VANETTI, M. C. D.; MININ, V. P. R.; CAMPOS, R. S. **Processamento mínimo**

de repolho. Manual de Processamento de Frutas e Hortaliças. Cap 25. pág. 465-482. Embrapa. Brasília, DF. 2007.

SIQUEIRA, A. C. A.; BRITO, E. S.; SILVA, I. J.; SANT'ANA, H. B. Partição de antocianinas da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* M.) em sistema aquoso bifásico etanol/sulfato de amônio, 2016.

SOUSA, P.H.M. ; RAMOS, A.M., MAIA, G.A. BRITO, E.S.; GARRUTI, D.S.; FONSECA, A.V.V.; Adição de extratos de Ginkgobiloba e Panaxginsengem néctares mistos de frutas tropicais. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.2, p.463 – 470, 2010.

SOUZA, R. M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde.** Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

STRINGHETA, P.C.; **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (Melinis minutiflora, Pal de Beauv.),** Campinas, p. 138, 1991. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – UNICAMP.

SWAMI, S. B.; THAKOR, N. S. J.; PATIL, M. M.; HALDANKAR, P. M. Jamun (*Syzygiumcumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1100-1117, 2012.

TIVELLI, S. W.; PURQUERIO, L. F. V. **Repolho.** 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Repolho/Repolho.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p.1231-1246, 2010.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 619-627, 2007.

VELOSO, L. A. Corantes e Pigmentos - Dossiê Técnico. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas.** Instituto de Tecnologia do Paraná, 2012.

VIZZOTO, M.; FETTER, M. R. **Jambolão: o poderoso antioxidante**, 2009. Disponível em: empraba.br. Acessado em: 10 de Agosto de 2018.

WANG, Y.; HAN, J.; XU, X.; HU, S.; YAN, Y. Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous twophase systems. **Separation and Purification Technology**, 75, p. 352–357. 2010.

WENZEL, G. E. **Bioquímica Experimental dos Alimentos**. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 2001.

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. **Food Chemistry**, v. 129, p. 443–453, 2011.

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**, v. 124, p.170-178, 2014.

YAU, Y.K.; OOI, C. W.; NG, E.-P.; LAN, J. C.-W.; LING, T. C.; SHOW, P. L. Current applications of diferent type of aqueous two-phase systems. **BioresourceandBioprocess**, v. 2, p. 49, 2015.

ZENG, C. et al. Optimization of the process variables of tilianin-loaded composite phospholipid liposomes based on response surface-central composite design and pharmacokinetic study. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 123–131, 2016.