

PARTIÇÃO DE ANTOCIANINA EM SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

ISBN 978-85-85905-23-1

Área

Química Verde

Autores

Rocha Caldeira, A.C. (UFMG) ; Teles de Faria, J. (UFMG)

Resumo

A antocianina é um composto fenólico responsável pela coloração que varia do vermelho ao azul em frutas, flores e legumes, e cujo consumo está associado a diversos benefícios à saúde humana. Sua extração/purificação por meio de métodos tradicionais vem sendo substituída por métodos alternativos, como os sistemas aquosos bifásicos (SAB). O objetivo deste estudo foi avaliar a partição da antocianina extraída de Jamelão em SAB compostos por isopropanol e sulfato de magnésio a 25 °C. Foram avaliados o coeficiente de partição (K_p) e rendimento (Y) em três sistemas de composições distintas. A antocianina particionou preferencialmente para fase superior e elevado rendimento foi obtido. Melhores resultados foram verificados no SAB composto por 24% de álcool e 13% de sal ($K_p=8,29$ e $Y=89,24\%$).

Palavras chaves

Corante natural; Extração líquido-líquido; Partição

Introdução

As antocianinas são compostas fenólicas pertencentes ao grupo dos flavonoides, tendo como estrutura química básica o esqueleto carbônico C6- C3-C6, que confere cores que variam entre o vermelho e o azul violáceo aos frutos, flores, tubérculos e hortaliças (PATRÍCIO, 2012; MALACRIDA e MOTTA, 2005). Esse pigmento natural é

comumente encontrado em flores como hibisco vermelho, rosa vermelha e orquídeas, em frutos como morango, amora, açaí, framboesa, uva, jamelão, jabuticaba, azeitona preta (KHOO et al., 2017), e em tubérculos como batata roxa e batata doce (LIU et al., 2013). Nas plantas, as antocianinas têm como função a atração de polinizadores, auxiliar na dispersão de sementes, proteção à radiação UV-B e contra o ataque de patógenos (LATADO et al., 2008). Em relação à saúde, destacam-se por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, anticancerígena e antidiabética, bem como de prevenção de doenças cardiovasculares (JUNG et al., 2015; CHEN et al., 2012). Além dos diversos benefícios proporcionados à saúde humana, as antocianinas vêm sendo amplamente utilizadas na indústria alimentícia como corante natural de alimentos e bebidas, devido a sua maior aceitabilidade pelo consumidor, uma vez que o consumo de corantes naturais apresenta menor risco à saúde quando comparados aos sintéticos (KHOO et al., 2017; MALCRIADA e MOTTA, 2005). O uso de antocianinas para aplicações na indústria de alimentos torna necessária a extração do pigmento das células vegetais. Industrialmente é desejável que os métodos de extração sejam rápidos, simples, de baixo custo e baixa toxicidade. Devido à alta solubilidade das antocianinas em compostos polares, essas podem ser facilmente extraídas por solventes orgânicos alcoólicos, como metanol e etanol, e também pela água (FAVARO, 2008; HUA et al., 2013; KHOO et al., 2017), sendo essa última uma opção mais ecológica. Estudos reportam que a utilização de solventes orgânicos acidificados aumenta a eficiência extrativa, pois melhora a penetração nos tecidos vegetais (MACZ-POP et al., 2006) e proporciona maior estabilidade ao pigmento (KHOO et al., 2017; MACZ-POP et al., 2006; LIU et al., 2013). A extração comercial de pigmentos naturais como a antocianina a partir de matrizes vegetais (folhas, flores, frutos, etc) é normalmente realizada por extração por solventes (HUA et al., 2013), embora outras tecnologias como alta pressão hidrostática e extração com fluido supercrítico têm sido reportadas na literatura (CORRALES et al., 2009; LUQUE-RODRÍGUEZ et al., 2007). Os extratos de antocianinas obtidos a partir de plantas e vegetais são uma mistura de compostos (KHOO et al., 2017) co-extraídos junto ao pigmento, sendo necessária a realização de etapas de extração e purificação do analito de interesse. Dentre os possíveis métodos de extração e pré-purificação, tem-se os sistemas aquosos bifásicos (SAB), um método de extração líquido-líquido que vem sendo estudado nas últimas décadas como uma técnica alternativa à extração tradicional com solventes. Os SAB são compostos por dois componentes hidrofílicos que sob determinadas condições de concentração, pH, pressão e temperatura levam à formação de duas fases imiscíveis (CHAKRABORTY e SEN, 2016). Esses sistemas podem ser compostos por dois polímeros, polímero e sal, líquido iônico e sal, ou álcool e sal (RUIZ et al., 2012). Sistemas compostos por líquido iônico ou apenas por polímeros têm como desvantagem o alto custo de implantação, além da alta viscosidade no caso dos sistemas poliméricos (GUO et al., 2012). Já os sistemas formados por álcool e sal são conhecidos por apresentarem vantagens como o baixo custo, menor viscosidade, maior eficiência de extração/purificação (LIU et al., 2013), além da facilidade de separação do analito e recuperação do álcool por evaporação (HUA et al., 2013). De modo geral, os SAB formados por álcool e sal têm sido estudados como um método inicial de separação devido à sua facilidade de escalonamento, alta capacidade e rendimento, menor custo e rapidez do tempo de processo (OZLEM et al., 2011). Somado a essa série de vantagens, o fato dos sistemas álcool-sal, assim como os demais, serem compostos majoritariamente por água permite que esses sejam utilizados para a extração e purificação de diversas biomoléculas, incluindo corantes naturais como as antocianinas (HUA et al., 2013; SANG et al., 2018; WU et al., 2011; WU et al., 2014), uma vez que tais sistemas propiciam condições que preservam a atividade biológica das biomoléculas.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a partição de antocianina extraída da casca de Jamelão (*Syzygium cumini*), fruta típica do cerrado brasileiro, em sistemas aquosos bifásicos compostos por isopropanol e sulfato de magnésio a 25 °C.

Material e métodos

Materiais O isopropanol e o sulfato de magnésio foram adquiridos da Êxodo Científica e Synth, respectivamente. Frutos de Jamelão (*Syzygium cumini*) em estágio de maturação próprio para consumo foram colhidos de árvores do campus da UFMG em Montes Claros. Água deionizada foi utilizada em todos os experimentos. Obtenção do extrato de antocianina da casca de Jamelão Os frutos foram lavados em água corrente e as cascas foram separadas da fração comestível para obtenção do extrato de antocianina. As cascas foram mantidas em contato com água acidificada (pH 2) por 24 h sob agitação (200 rpm) a 25 °C. Em seguida foram removidas por filtração a vácuo e o filtrado foi liofilizado até obtenção do extrato concentrado, o qual foi alíquotado em tubos eppendorf e mantido sob congelamento. Preparo dos sistemas aquosos bifásicos (SAB) e partição de antocianina SAB foram preparados a partir da pesagem de massas apropriadas de isopropanol, solução estoque de sulfato de magnésio (25% m/m) e água, utilizando balança analítica, de modo a obter três misturas globais pré- definidas. Os componentes foram pesados em tubos Falcon de 15 mL para uma massa total de 8 g. Os tubos foram homogeneizados por agitação manual vigorosa e mantidos em repouso em um banho termostático a 25 °C por 24 h para que atingissem o equilíbrio. Em seguida, 3 mL das fases superior e inferior foram coletados com auxílio de pipeta automática e seringa com cateter, respectivamente, e transferidos para outros tubos aos quais 100 µL de extrato de antocianina foi adicionado. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em repouso por 15 h em um banho termostático a 25 °C. Decorrido esse tempo, as fases foram cuidadosamente coletadas, conforme descrito anteriormente, para posterior determinação da concentração de antocianina. O coeficiente de partição (K_p), razão entre a concentração de antocianina nas fases superior e inferior, foi calculado. A recuperação teórica na fase superior (YSUP, %), razão entre a massa do composto particionado na fase superior e massa total do composto no sistema, foi calculada (Equação 1) e utilizada para avaliar o sistema com melhor capacidade de purificação do pigmento. $Y (\%) = 100((K_p R_v)/(1+(K_p R_v)))$ (1) Onde R_v é a razão entre os volumes das fases superior e inferior. Os experimentos foram realizados em duas repetições. Determinação da concentração de antocianina A concentração de antocianina foi determinada por meio do método espectrométrico de pH diferencial conforme descrito por HESSEINIAN e colaboradores (2008), por meio da leitura direta em 520 e 700 nm. Antes das leituras de absorvância, as amostras foram diluídas em tampões de pH 1 e 4,5 e deixadas em repouso por 30 min. A concentração de antocianina (CA) foi calculada pela Equação 2 (GIUSTI e WROLSTAD, 2001) e expressa em equivalentes de cianidina-3-glucósido. $CA = (A * MM * FD * 1000) / (\epsilon * L)$ (2) Sendo $A = (ABS_{520} - ABS_{700})_{pH1} - (ABS_{520} - ABS_{700})_{pH4,5}$; MM a massa molar das antocianinas cianidina-3-glicósido; FD o fator de diluição; ϵ o coeficiente de extinção molar e L o caminho ótico da cubeta.

Resultado e discussão

A partição de antocianina a partir do extrato bruto da casca de Jamelão foi avaliada em três sistemas de composição global diferentes, formados por isopropanol + sulfato de

magnésio + água a 25 °C. Na Tabela 1 são apresentados os resultados do coeficiente de partição (K_p) e recuperação teórica (Y) de antocianina nos sistemas avaliados. Conforme a Tabela 1, é possível notar que a partição de antocianina foi influenciada pela composição global do sistema, uma vez que os sistemas avaliados apresentaram valores de coeficiente de partição distintos. Esse resultado indica que a variação nas concentrações de isopropanol e sulfato de magnésio influenciou na migração do pigmento para uma das fases. Para todos os sistemas avaliados, maior concentração de antocianina foi observada na fase superior, resultando em valores de K_p maiores do que 1, o que indica que o pigmento migrou preferencialmente para a fase superior, rica em isopropanol, devido a maior afinidade desse pigmento por soluções alcoólicas (KHOO et al., 2017). Resultado semelhante foi encontrado por JAMPANI e colaboradores (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 K_p maiores do que 6 ($6 < K_p < 62,5$), indicando que o pigmento apresentou maior afinidade pela fase superior. Comportamento semelhante foi observado também em sistemas compostos por etanol e sais. SANG e colaboradores (2018), em seu estudo sobre a partição de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*, *Morus atropurpurea*, *Nitraria tangutorun* Bobr. e *Lycium ruthenicum* Murr. em SAB compostos por etanol e fosfato monossódico/sulfato de amônio, reportaram a maior preferência das antocianinas presentes nos extratos vegetais e nas soluções das amostras purificadas pela fase rica em álcool. AL-ALAWI e colaboradores (2018), ao avaliarem a extração e purificação de antocianinas da casca de *Dacrydes rostrata* em sistemas compostos por etanol e sulfato de amônio/fosfato dipotássico/dihidrogenofosfato de potássio, também observaram que a maior parte da antocianina particionou para a fase superior. A distribuição distinta da antocianina entre as duas fases aquosas do sistema resulta do balanço de interações entre o pigmento e os componentes das fases. Uma vez que ocorreu maior migração do pigmento para fase superior, infere-se que as interações entre este e o álcool são mais favoráveis do que as interações pigmento-sal. Observa-se pela Tabela 1 que à medida que se aumenta a concentração de sal e álcool no sistema, aumenta o coeficiente de partição. Esse comportamento da partição de antocianina em função do aumento da concentração global do sistema foi similar ao observado por HUA e colaboradores (2013). Tal 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). Logo a maior solvatação resulta em menor concentração de antocianina na fase superior e, conseqüentemente, menor K_p em SAB com menores concentrações de sal. Em relação à recuperação teórica (Y), uma vez que os sistemas avaliados foram formados com mesmo volume de fases superior e inferior (razão volumar igual a 1), os valores de Y dependeram apenas do coeficiente de partição. Assim como os valores de K_p , os valores de Y aumentaram com o aumento da concentração de sal e álcool no sistema, de modo que máxima recuperação (próxima a 90%) do pigmento após uma etapa de extração foi obtida para o sistema composto por 24 %m/m de isopropanol e 13 %m/m de sulfato de magnésio. No entanto, destaca-se que a eficiência de extração foi superior a 80% ($Y > 80\%$) para todos os sistemas avaliados, indicando que mais de 80% do pigmento presente no extrato da casca de Jamelão foi recuperado na fase superior desses sistemas, o que indica boa separação. WU e colaboradores (2014), ao avaliarem a extração e purificação preliminar de antocianinas do suco de uva em SAB compostos por etanol e sais (fosfato monossódico e sulfato de amônio), reportaram valores de coeficiente de partição e de recuperação superiores a 7 e 95% para sistemas compostos de NaH_2PO_4 e superiores a 2,4 e 77% para os compostos por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente. Comportamento

semelhante foi observado no estudo de TANG e colaboradores (2017) sobre a separação e purificação de antocianina de suco de uva em SAB compostos por líquido iônico e sal. Valores de $K_{p^{-1}} > 3,7$ e $Y > 69,5\%$ foram obtidos para sistemas compostos por L44 e NaH_2PO_4 (TANG et al., 2017). AL-ALAWI e colaboradores (2018) encontraram valores próximos aos reportados por WU e colaboradores (2014) para os sistemas contendo etanol e sulfato de amônio ($K_{p^{-1}} > 4,96$ e $Y > 80,95\%$), enquanto LIU e colaboradores (2013) obtiveram maior eficiência de extração de antocianinas de batata doce roxa ($Y = 90\%$) em SAB composto por 25% de etanol e 22% de sulfato de amônio. Sistemas compostos por etanol e de fosfato dipotássico também foram estudados por AL-ALAWI e colaboradores (2018), que obtiveram melhores resultados ($K_{p^{-1}} \sim 158$ e $Y > 99,4\%$) para o sistema contendo 30 %m/m do álcool e 15 %m/m do sal.

Tabela

Tabela 1. Coeficiente de partição (K_p) e recuperação teórica (Y) de antocianina em SAB composto por isopropanol + sulfato de magnésio + água a 25 °C.

Composição do SAB inicial* (% m/m)			K_p	Y (%)
Isopropanol	Sulfato de magnésio	Água		
20	11	69	4,13	80,49
22	12	66	5,90	85,51
24	13	63	8,29	89,24

* Sistema do qual foram coletados 3 mL de fases superior e inferior para formar o sistema para partição.

Conclusões

Para todos os sistemas houve predominância do pigmento da fase superior (rica em álcool). O coeficiente de partição de antocianinas aumentou com o aumento da composição global do sistema, de modo que maior $K_{p^{-1}}$ foi obtido para o sistema composto por 24 %m/m de isopropanol e 13 %m/m de sulfato de magnésio. Esse mesmo sistema apresentou condições mais favoráveis para recuperação de antocianina (~ 90%). Os SAB compostos por isopropanol e sulfato de magnésio nas condições avaliadas mostraram-se adequados como um método inicial para obtenção de antocianina a partir do extrato da casca de Jamelão.

Agradecimentos

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

Referências

AL-ALAWI, A.; NITHYANADAM, R.; HONG, T. L. Integrated Extraction and Purification of Anthocyanin from *Dacryodes rostrata* Peel Using Aqueous Two-Phase Extraction (ATPE). EURECA 2018 – Conference Paper, p.1-14, 2018.

CHAKRABORTY, ARABINDA; SEN, KAMALIKA. Impact of pH and Temperature on Phase Diagrams of Different Aqueous Biphasic Systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1433, p. 41-55, 2016.

CHEN, X. Q. et al. Anti-oxidative Analysis, and Identification and Quantification of Anthocyanin Pigments in Different Coloured rice. *Food chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2783-2788, 2012.

CORRALES, M.; GARCÍA, A.F. ; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of Anthocyanins from Grape Skins Assisted by High Hydrostatic Pressure. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 415-421, 2009.

FAVARO, MARTHA MARIA ANDREOTTI et al. Extração, Estabilidade e Quantificação de Antocianinas de Frutas Típicas Brasileiras para Aplicação Industrial como Corantes. 2007.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001.

GUO, WENLU et al. Liquid–liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Hydrophilic Alcohols (ethanol/2-propanol/1-propanol) and MgSO₄/ZnSO₄ at (303.15 and 313.15) K and Correlation. *Thermochimica acta*, v. 546, p. 8-15, 2012.

HOSSEINIAN, F. S.; LI, W.; BETA, T. Measurement of Anthocyanins and other Phytochemicals in Purple Wheat. *Food Chemistry*, v. 109, n. 4, p. 916-924, 2008.

HUA, Z.; YUESHENG, D.; GE, X.; MENGLU, L.; LIYA, D.; ZHILONG, X. Extraction and Purification of Anthocyanins from the Fruit Residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. *Journal of Chromatography Separation Techniques*, v. 4, p. 1-5, 2013.

LUQUE-RODRÍGUEZ, J.M.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; PÉREZ-JUAN, P. Dynamic Superheated Liquid Extraction of Anthocyanins and other Phenolics from Red Grape Skins of Winemaking Residues. *Bioresource Technology*, v.98, p. 2705-2713, 2007.

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.

JUNG, J. et al. Investigation of the Mechanisms of Using Metal Complexation and Cellulose Nanofiber/Sodium Alginate Layer-by-Layer Coating for Retaining Anthocyanin Pigments in Thermally Processed Blueberries in Aqueous media. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 63, n. 11, p. 3031-3038, 2015.

KHOO, HOCK ENG et al. Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits. *Food & nutrition research*, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

LATADO, RODRIGO ROCHA et al. Acúmulo de Antocianinas e Características Físicas e Químicas de Frutos de Laranjas Sanguíneas Durante o Armazenamento a Frio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2008.

LIU, X.; MU, T.; SUN, H.; ZHANG, M.; CHEN, J. Optimisation of Aqueous Two-Phase Extraction of Anthocyanins from Purple Sweet Potatoes by Response Surface methodology. *Food Chemistry*, n° 141, 3034-41, 2013.

MACZ-POP G.A., RIVAS-GONZALO J.C., PEREZ-ALONSO J.J.; GONZÁLEZ-PARAMÁS A.M. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 94, 448-456, 2006.

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. Compostos Fenólicos Totais e Antocianinas em Suco de Uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, 2005.

OZLEM, A.; EMINE, B.; ULKU, M. Aqueous Two-Phase Extraction of Lactic Acid: Optimization by Response Surface methodology. *Separation Science and Technology*, v. 46, p. 1164-1171, 2011.

PATRICIO, P. R.; MAGESTE, A. B.; da SILVA, L. H. M.; da SILVA, M. C. H. Extração e Purificação de Antocianinas utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2011, Florianópolis-SC. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química., 2011. p. TEC 51.

RUIZ-RUIZ, F. et al. Aqueous Two-Phase Affinity Partitioning Systems: Current Applications and Trends. *Journal of chromatography A*, v. 1244, p. 1-13, 2012. Polar Anthocyanins in Aqueous Two-Phase Systems and Extraction of Anthocyanins from SANG, J.; DANG, K.; MA, Q.; Li, B., HUANG, Y.; LI, C. Partition Behaviors of Different Nitraria tangutorun Bobr. and Lycium ruthenicum Murr. *Food Analytical Methods*, v. 11, p. 980–991, 2018.

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.

WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YANG, L. Aqueous Two-Phase Extraction, Identification and Antioxidant Activity of Anthocyanins from mulberry (*Morus Atropurpurea* Roxb.) *Food Chem* v. 129, p. 443-453, 2011.

XU TANG.; YUN WANG.; JUAN HAN.; LEI WANG.; CHENG LI.; LIANG NI. Separation, Purification of Anthocyanin and Vitis linn Polysaccharide from Grape Juice by the Two-Step Extraction and Dialysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, p.1-7, 2017.