

Capítulo 3

Sistema aquoso bifásico: dados de equilíbrio e partição de pigmento natural

Ana Clara Rocha Caldeira*¹; Janaína Teles de Faria²

Resumo

Dados de equilíbrio de fase foram obtidos para sistema aquoso bifásico (SAB) composto por isopropanol e sulfato de magnésio a 298 e 308 K. Verificou-se que a temperatura não promoveu alterações significativas nas concentrações mínimas dos componentes formadores de fases, de modo que as curvas binodais obtidas nas duas temperaturas praticamente coincidiram. Observou-se que o aumento da concentração de álcool e sal na mistura resultou em maior comprimento da linha de amarração (*CLA*). Comportamento semelhante foi observado para o aumento de temperatura, mantendo-se a composição da mistura constante. Os diferentes *CLA* foram avaliados quanto à partição de antocianinas, as quais migraram preferencial para a fase superior, rica em álcool. O coeficiente de partição e o fator de recuperação teórica na fase de topo aumentaram com o *CLA*, sendo os maiores valores ($K_p=15,6$ e $Y=94,3\%$) obtidos para o sistema composto por 24% m/m de isopropanol e 13% m/m de sulfato de magnésio ($CLA=49,6\%$ m/m) a 308 K. Tal sistema mostrou-se atrativo para a partição de antocianinas, uma vez que requer reagentes e processos comuns e de baixo custo.

Palavras-chave: Antocianinas. Coeficiente de partição. Curva binodal. Extração líquido-líquido. Linha de amarração.

Introdução

Processos de separação e purificação de biocompostos tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores, interessados na potencial aplicação dos mesmos nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos. Dentre as técnicas de extração líquido-líquido, a utilização de sistema aquoso bifásico (SAB) tem se destacado como uma importante tecnologia para processos *downstream* de extração e purificação de biomoléculas (WU *et al.*, 2011).

Tais sistemas tornam-se atrativos dos pontos de vista ambiental, por serem compostos por substâncias atóxicos e não inflamáveis, e de processo, por serem constituídos majoritariamente por

¹ Estudante de Engenharia Agrícola e Ambiental, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

² Docente do curso de Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

água, o que favorece a manutenção das atividades biológicas dos biocompostos (ALBERTSSON, 1986; GUO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017)

SAB compostos por álcool e sal, em especial, são uma opção sustentável e de baixo custo que apresentam ainda vantagens como disponibilidade dos componentes formadores de fase, facilidade de recuperação do álcool e sua reutilização, baixa viscosidade, rápida separação de fases e facilidade de recuperação do produto na fase rica em álcool (WU *et al.*, 2011)

A disponibilidade de dados de equilíbrio de SAB é imprescindível para o projeto de processos de separação/purificação e para o desenvolvimento de modelos de transferência de massa aplicáveis à extração líquido-líquido (GRABER *et al.*, 2004), além de fornecer informações a respeito do comportamento de fase e das propriedades físico-químicas, as quais são úteis no estudo da partição de moléculas entre as duas fases (LO *et al.*, 2015).

Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar dados de equilíbrio de fase (curva binodal e linhas de amarração) de SAB composto por isopropanol e sulfato de magnésio a 298 e 308 K, bem como verificar o potencial dos sistemas para partição de antocianinas a partir de um extrato bruto, obtido de frutos de jamelão (*Syzygium cumini*).

Material e métodos

Materials

Os reagentes utilizados (isopropanol, sulfato de magnésio, acetato de sódio, cloreto de potássio e ácidos acético e clorídrico) foram de grau analítico. Frutos de *Syzygium cumini* (jamelão) em estágio final de maturação foram coletados no campus regional da UFMG, situado no município de Montes Claros, Minas Gerais. Os frutos foram lavados com água corrente e armazenados em embalagens de polipropileno a 248 K até sua utilização. Água ultrapura foi utilizada para realização dos experimentos.

Curva binodal e linhas de amarração

As curvas binodais foram obtidas pelo método de titulação turbidimétrica, conforme metodologia descrita por Albertsson (1986), a partir de álcool (isopropanol) e solução estoque de sulfato de magnésio (25 % m/m), à pressão atmosférica nas temperaturas de 298 e 308 K. Após

obtenção da composição dos pontos de turbidez por meio do balanço de massa dos componentes formadores de fase, obteve-se as curvas binodais.

As Equações 1-4 foram ajustadas aos dados experimentais da curva binodal:

$$[w_1] = A * \exp(B * [w_2]^{0,5} - C * [w_2]^3) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$[w_1] = A + B * [w_2]^{0,5} + C * [w_2] \quad (\text{Eq. 2})$$

$$[w_1] = A + B * [w_2]^{0,5} + C * [w_2] + D * [w_2]^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$[w_1] = \exp(A + B * [w_2]^{0,5} + C * [w_2] + D * [w_2]^2) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde $[w_1]$ e $[w_2]$ são as concentrações (% m/m) de isopropanol e sulfato de magnésio na mistura, respectivamente, e A , B , C e D são constantes obtidas por regressão.

Uma vez determinadas as curvas binodais, três pontos distintos foram escolhidos na região bifásica a 298 e 308 K para determinação das linhas de amarração pelo método gravimétrico descrito por Merchuk, Andrews e Asenjo (1998). Sistemas de 8 g foram preparados em tubos de centrifuga graduados a partir da pesagem de quantidades apropriadas de isopropanol, solução estoque de sulfato de magnésio e água. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente e deixados em repouso, em banho termostático nas temperaturas avaliadas, por 24 h. Decorrido esse período, as fases superior e inferior foram cuidadosamente separadas com seringa de agulha longa. As fases coletadas foram pesadas e acondicionadas separadamente para posterior utilização no experimento de partição. A composição das fases em equilíbrio de cada sistema foi determinada por meio da regra da alavanca para relação entre as composições das linhas de amarração e global do sistema, pela resolução simultânea das Equações 5-8:

$$[w_1]_m = \alpha * ([w_1]_m - [w_1]_b) + [w_1]_m \quad (\text{Eq. 5})$$

$$[w_2]_m = \alpha * ([w_2]_b - [w_2]_m) + [w_2]_t \quad (\text{Eq. 6})$$

$$[w_1]_t = \exp(A + B * [w_2]_t^{0,5} + C * [w_2]_t + D * [w_2]_t^2) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$[w_1]_b = \exp(A + B * [w_2]_b^{0,5} + C * [w_2]_b + D * [w_2]_b^2) \quad (\text{Eq. 8})$$

sendo os subscritos t , b e m referentes à fase superior, fase inferior e mistura global, respectivamente; α é a razão entre a massa da fase inferior e a massa da fase superior do sistema, e A , B , C e D são os coeficientes de regressão da equação de melhor ajuste.

O comprimento da linha de amarração (CLA) foi determinado como:

$$CLA = \left(([w_1]_t - [w_1]_b)^2 + ([w_2]_t - [w_2]_b)^2 \right)^{0.5} \quad (\text{Eq. 9})$$

Extrato bruto de antocianinas

Para obtenção do extrato de antocianinas foram utilizadas casca de jamelão e água acidificada (com ácido clorídrico, pH 2) como solvente extrator, na proporção 1:2 (sólido: líquido). A extração foi realizada ao abrigo da luz, sob agitação de 200 rpm a 298 K, por 24 h. O extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo (11 µm) e concentrado por liofilização até obtenção de um extrato viscoso. O extrato concentrado foi armazenado em microtubos e mantidos a 248 K até sua utilização.

Partição de antocianina

Sistemas para avaliação da partição foram preparados a partir das fases (superior e inferior) pré-equilibradas obtidas no experimento de avaliação das linhas de amarração. Assim, para cada condição experimental, 3 mL das fases superior e inferior foram transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL, ao qual foram adicionados 100 µL de extrato bruto de antocianina. Os tubos, protegidos da luz com papel alumínio, foram homogeneizados e mantidos em repouso por 15 h em banho termostático a 298 e 308 K. Após a partição, as fases superior e inferior foram cuidadosamente coletadas para quantificação da concentração de antocianinas.

O coeficiente de partição (K_p) é definido como a razão entre as concentrações de antocianinas na fase superior e inferior. O fator de recuperação teórica da fase superior (Y), parâmetro utilizado para determinar a capacidade de purificação do pigmento, é calculado como a razão entre a massa de analito particionado na fase superior e a massa total adicionada ao sistema (Equação 10):

$$Y (\%) = 100 \left(\frac{K_p R_v}{1 + (K_p R_v)} \right) \quad (\text{Eq. 10})$$

sendo R_v a razão entre os volumes das fases superior e inferior.

Determinação da concentração de antocianinas

A concentração de antocianinas totais (CA) foi determinada pelo método Fuleki e Francis (1968) com modificações. As amostras (fases) foram diluídas em duas soluções tampões: uma a pH

1 (0,03 mol/L KCl) e outra a pH 4,5 (0,4 mol/L CH₃CO₂Na • 3 H₂O) e mantidas em repouso por 30 min. A absorbância das diluições foi medida a 520 e 700 nm em espectrofotômetro e a concentração de antocianinas totais foi calculada pela Equação 11:

$$CA \text{ (mg/mL)} = \frac{A * MM * FD * 1000}{\epsilon * L} \quad (\text{Eq. 11})$$

sendo $A = (ABS_{530} - ABS_{700})_{pH \ 1} - (ABS_{530} - ABS_{700})_{pH \ 4,5}$, MM a massa molar da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol); FD o fator de diluição; ϵ o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glicosídeo (26900 L/(cm.mol)) e L o caminho ótico da cubeta (1 cm).

Análise estatística

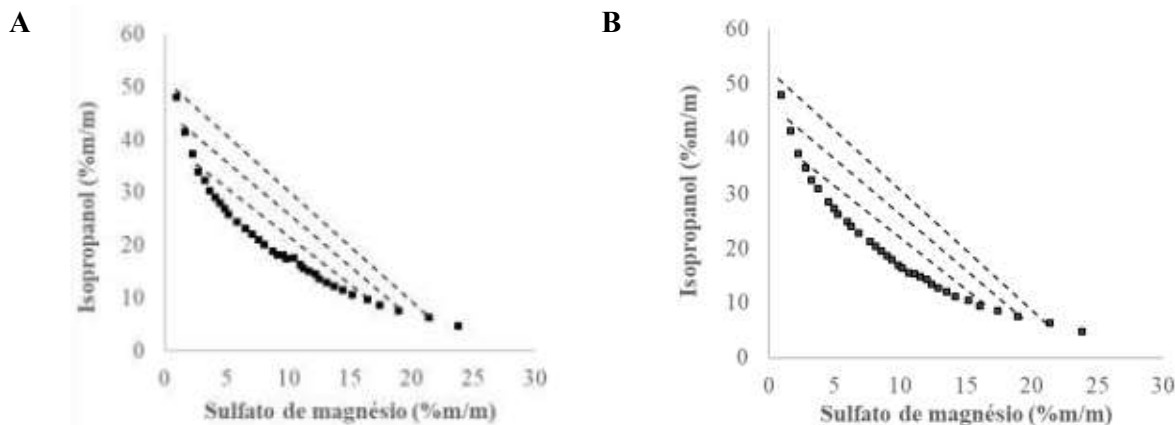
Os experimentos foram realizados com três repetições e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. A significância dos ajustes das Equações 1-4 foi avaliada pela análise de variância (p-valor<0,05) e a qualidade do ajuste foi avaliada pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}), erro médio quadrático (*root mean squared error*, $RMSE$) e significância dos coeficientes de regressão pelo teste t (p-valor<0,05).

Resultados e discussão

As curvas binodais e linhas de amarração para os sistemas compostos por isopropanol, sulfato de magnésio e água a 298 e 308 K são apresentadas na Figura 1. Verificou-se pela sobreposição das curvas binodais que o aumento de temperatura de 298 para 308 K não promoveu alteração significativa da região bifásica (acima da curva). Resultado semelhante foi observado em outros estudos com SAB compostos por álcoois e sais (GUO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017)

Todos os modelos (Equações 1-4) ajustados aos dados das curvas binodais foram significativos (p-valor<0,05), bem como seus coeficientes de regressão. Os valores desses coeficientes, do coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajust}) e do erro médio quadrático ($RMSE$) são listados na Tabela 1. Observa-se pelos elevados valores de R^2_{ajust} e pequenos valores de $RMSE$ que todas as equações apresentaram excelente correlação aos dados experimentais, podendo ser utilizadas satisfatoriamente para descrever as curvas binodais. Para determinação das linhas de amarração, optou-se pela Equação 4, que apresentou maior R^2_{ajust} e menor $RMSE$ nas duas temperaturas avaliadas.

Figura 1 – Curva binodal (■) e linhas de amarração (--) para SAB compostos por isopropanol e sulfato de magnésio a (A) 298 e (B) 308 K



Fonte: Dos autores, 2018.

Tabela 1 – Parâmetros de ajuste das Equações 1- 4

Temperatura (K)	Equações	Coeficientes de regressão				R^2_{ajust}	RMSE
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>		
298	1	74,08	-0,46	0,00004		0,9985	0,4012
	2	64,72	-20,82	1,78069		0,9957	0,6777
	3	71,06	-27,84	3,72738	-0,03496	0,9979	0,4747
	4	4,46	-0,67	0,07472	-0,00263	0,9990	0,3210
308	1	74,85	-0,45	0,00005		0,9989	0,3482
	2	65,78	-21,13	1,78008		0,9984	0,4229
	3	68,49	-24,15	2,61933	-0,01511	0,9987	0,3714
	4	4,34	-0,50	0,02534	-0,00178	0,9992	0,2975

Fonte: Dos autores, 2018.

A composição global dos sistemas e de suas fases em equilíbrio, que correspondem às linhas de amarração apresentadas na Figura 1, e o comprimento das linhas de amarração (*CLA*) são apresentados na Tabela 2. Independente da temperatura, observa-se que quanto maior a concentração de álcool e sal na mistura, maior a diferença de composição entre as fases (superior, rica em álcool, e inferior, rica em sal) e, conseqüentemente, maior o *CLA*. Comportamento semelhante foi reportado por Guo *et al.* (2012) e Li *et al.* (2017) ao avaliarem SAB compostos por álcoois e sais.

Tabela 2 – Dados experimentais das linhas de amarração de SAB compostos por isopropanol (1) e sulfato de magnésico (2) e parâmetros de partição de antocianinas

Temperatura (K)	Composição (% m/m)						CLA (% m/m)	K_p	Y (%)
	Global		Fase superior		Fase inferior				
	w_1	w_2	w_1	w_2	w_1	w_2			
298	20,0	11,0	35,4	2,6	9,4	16,8	26,7	4,1	80,5
	22,0	12,0	42,9	1,5	7,2	19,5	40,0	5,9	85,5
	24,0	13,0	49,6	0,9	5,7	21,7	48,6	8,3	89,2
308	20,0	11,0	35,9	2,6	9,2	16,7	30,1	7,3	88,0
	22,0	12,0	43,6	1,4	7,2	19,3	40,6	12,4	92,5
	24,0	13,0	50,9	0,7	5,8	21,3	49,6	16,5	94,3

Fonte: Dos autores, 2018.

Composições globais que correspondem a pontos sobre uma mesma linha de amarração possuem fases superior e inferior com mesma composição final e, conseqüentemente, mesmo *CLA* (SILVA; LOH, 2006). Como o experimento de partição foi realizado com sistemas formados a partir de fases pré-equilibradas, tais sistemas apresentam os mesmos *CLA* que os sistemas originais. Assim, observa-se na Tabela 2 que quanto maior o *CLA*, maior o coeficiente de partição (K_p). Os valores de $K_p > 1$ indicam que as antocianinas migraram preferencialmente para a fase superior, devido à maior afinidade do pigmento a soluções alcólicas (KHOO *et al.*, 2017). Esses resultados estão de acordo com os observados em outros estudos de partição de antocianinas em SAB compostos por álcoois e sais (AL-ALAWI; NITHYANADAM; HONG, 2018; TANG *et al.*, 2018).

O comportamento do fator de recuperação teórica da fase superior (Y) foi semelhante ao comportamento de K_p , uma vez que a razão entre volumes da fase foi igual a 1 no experimento de partição. Assim, maior a recuperação teórica do pigmento quanto maior o *CLA*.

Maiores valores de K_p e Y para os sistemas avaliados a 308 K podem estar associados ao maior *CLA* apresentados, quando comparados aos sistemas a 298 K, uma vez que com o aumento de temperatura houve transferência de água das fases superior para inferior, o que pode ser verificado pela ligeira diminuição da concentração de sal na fase inferior, com simultâneo aumento da concentração de álcool na fase superior (Tabela 2).

Conclusão

Dados de equilíbrio para SAB formados por isopropanol e sulfato de magnésio foram obtidos a 298 e 308 K, não sendo observada influência da temperatura na região bifásica. O aumento da concentração dos componentes formadores de fase na mistura global levou ao aumento da diferença das composições das fases em equilíbrio, resultando em maiores comprimentos de linha de amarração. A migração preferencial das antocianinas para fase rica em álcool nos SAB avaliados aumentou com o aumento do *CLA* relacionado à maior concentração de álcool e sal na mistura e/ou temperatura, de modo $K_p = 15,6$ e $Y = 94,3\%$ foram obtidos para sistema composto por 24% m/m de isopropanol e 13% m/m de sulfato de magnésio ($CLA = 49,6\%$ m/m) a 308 K. A utilização desse sistema para partição de antocianinas mostrou-se atrativa.

Agradecimentos

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

Referências

- ALBERTSSON, P.A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. New York: Ed. John Wiley, 1986.
- AL-ALAWI, A.; NITHYANADAM, R.; HONG, T. L. Integrated Extraction and Purification of Anthocyanin from *Dacryodes rostrata* Peel Using Aqueous Two-Phase Extraction (ATPE). In: EURECA, 2018 e Subang Jaya. **Conference Paper** [...], Subang Jaya: Taylor's University, 2018. p.1-14.
- FULEKI, T; FRANCIS, F J. Quantative methods for analysis. 2. Determination of total anthocyanin and degeadition index in cranberries. *Journal of Food Science*, v. 33, p. 78–83, 1968.
- GRABER, Teófilo A. *et al.* Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at different temperatures. experimental determination and correlation. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 49, n. 6, p. 1661–1664, 2004.
- 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2012.07.022>. Acesso em: 07 jul.2018.
- 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. Disponível em: <http://foodandnutritionresearch.net/index.php/fnr/article/view/1257>. Acesso em: 01 out.2018.
- LI, Yuliang *et al.* Phase equilibria and salt effect on the aqueous two-phase system of ethanol + 2-

propanol + salt [(NH₄)₂SO₄/Na₂SO₄] + water. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 127, n. 3, p. 2473–2487, 2017.

LO, Sewn Cen *et al.* Liquid-Liquid Equilibrium of Alcohols + Ammonium/Potassium/Sodium Acetate + Water Systems: Experimental and Correlation. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 60, n. 10, p. 2848–2857, 2015.

MERCHUK, Jose C.; ANDREWS, Barbara A.; ASENJO, Juan A. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v. 711, n. 1–2, p. 285–293, 1998.

TANG, Xu *et al.* 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, n. 1, 2018.

WU, Xiangyang *et al.* Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, v. 129, n. 2, p. 443–453, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>. Acesso em: 13 maio.2019