

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**ESTUDO DO PARTICIONAMENTO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS  
FORMADOS POR ACETONITRILA E DIFERENTES  
SOLVENTES CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS**

Autora: Isabela Nascimento Souza

Orientadores: Prof. Álvaro Silva Lima, Dr.  
Prof. Ranyere Lucena de Souza, Dr.

ARACAJU, SE - BRASIL.

FEVEREIRO DE 2019

ESTUDO DO PARTICIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SISTEMAS  
AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR ACETONITRILA E DIFERENTES  
SOLVENTES CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS

Isabela Nascimento Souza

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:

---

Álvaro Silva Lima, Dr.

---

Ranyere Lucena de Souza, Dr.

---

Luiz Fernando Romanholo Ferreira, Dr.

---

Matheus M. Pereira, Dr.

---

Igor Adriano de Oliveira Reis, Dr.

ARACAJU, SE - BRASIL.

FEVEREIRO DE 2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Isabela Nascimento.

S719e            Estudo do particionamento de compostos fenólicos em sistemas aquosos bifásicos formados por acetonitrila e diferentes solventes convencionais e não convencionais / Isabela Nascimento Souza; orientação [de] Prof. Dr. Álvaro Silva Lima e Prof. Dr. Ranyere Lucena de Souza – Aracaju: UNIT, 2019.

89 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2019.

Inclui bibliografia.

Sistemas aquosos bifásicos. 2. Composto fenólicos. 3. Particionamento. 4. Acetonitrila 5. Solventes convencionais e não convencionais I. Souza, Isabela Nascimento. II. Lima, Álvaro Silva. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 661. 725. 852: 544.35

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*Marthin Luther King*

## *Agradecimentos*

Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão. *Jean de la Bruyere*

Primeiramente expressarei minha gratidão a Deus pelo dom da existência, por cada oportunidade concedida, por todos os detalhes de como minha história se escreveu e ainda assim me dá forças para não desistir. Agradeço a minha mãe/pai Selma por toda confiança, carinho, compreensão e amor. Por não medir esforços para que todos os meus sonhos na vida pessoal e acadêmica sejam realizados. Te amo de forma incondicional por diversos motivos, e o mais importante deles é por você ser esse humano de coração imensamente grande e lindo para com todos. Agradeço ao meu Paidrasto por sempre estar ao meu lado, acreditando em mim e se mostrando sempre feliz e orgulhoso com minhas conquistas. Agradeço ao meu pai José que mesmo distante sei que em nenhum momento deixou de torcer pelo meu sucesso. EU AMO VOCÊS!

Agradeço aos meus irmãos, Nilvânia e Messias por sempre estarem disponíveis, confiantes, alegres, felizes e me dando todo apoio necessário nesta longa caminhada. Eu amo vocês imensamente. Agradeço a toda minha família pela confiança, torcida, compreensão e por todo apoio. Em especial a minha sobrinha Maria Eduarda (que repete várias vezes: Tia quando eu crescer quero ser igual a você) e isso me fortalece de uma forma imensurável. As minhas tias Joseane e Eliane por todo orgulho que transmitem sentirem de mim. Aos meus primos Tassiana e Tarcísio que desde o início dessa jornada de estudos, em todos os momentos estavam lá torcendo, acreditando e ouvindo meus desabafos. Agradeço aos meus amigos, os construídos e adquiridos ao longo desses 26 anos (Luma, Murilo, Larissa, Felipe, Moises, Raedson) por todo apoio, compreensão, por toda ajuda, por tantos momentos de felicidade ao lado de vocês. Agradeço ao meu “marido” Jeff, aquele que é mais que um simples amigo, é um irmão, amigo, companheiro, cúmplice, representa tudo em uma só pessoa para mim. Agradeço a Tathiane por todos os momentos que esteve me segurando, me apoiando, me ouvindo ao longo desses dois anos de mestrado, e sempre compreendendo e colocando minha autoestima para cima. Obrigada a todos vocês por me proporcionarem momentos tão lindos, de diversão, lazer e aprendizado. Mostrando que nunca estarei sozinha. Minha família e amigos, amo vocês e esse amor será ETERNO.

Agradeço aos meus orientadores por me acompanharem e me passar todos os conhecimentos adquiridos. Ao professor Álvaro por toda confiança, e por acreditar tanto em meu potencial (certos momentos acreditando em mim, mais do que eu mesma), por sempre estar ao meu lado, nos momentos de alegrias e comemorações, também como nos difíceis. Saiba que te admiro

demais e serei infinitamente grata a você por tudo. São seis anos e meio que tenho a honra de que compartilhe seus conhecimentos comigo. Obrigada por TUDO! Ao professor Ranyere por toda paciência, compreensão e carinho durante esses dois anos de mestrado. Transmitindo conhecimento e sempre disposto a ajudar. Meu muitos obrigado por toda colaboração a vocês dois. Agradeço a equipe que vocês formam, o LPA/LEB que permitiu tantas novas amizades, amizades estas da mais diferentes, cada um com seu jeitinho, mas com um significado grande em minha vida. Ao Anderson por todas as conversas, aprendizados e cumplicidade. Obrigada por todas as risadas e experiências dentro e fora do laboratório, seu bom humor-diário torna tudo mais leve. (sabe que és a gema do meu ovo, seremos o eterno casalzinho do réveillon). Agradeço a Lalá (meu amorzinho) sempre transmitindo calma e disposta a ajudar, Nay (minha mainha) por todas as experiências vividas e conselhos, Dany (meu bepantol) por todos os momentos de descontração e os de quebra de cabeça tentando aprendermos uma com a outra, Kenia (a mineirinha) por toda solidariedade e amizade de sempre, Jaislan por todo companheirismo, Silvia por todos os bolos, caronas e momentos de risadas e Regina por todas dúvidas solucionadas, conversas sérias e descontraídas. Obrigada pelo convívio maravilhoso, por todo apoio e torcida, pela preocupação, por todas as conversas e momentos compartilhados. Obrigada pela amizade e carinho de todos vocês, quero vocês sempre fazendo parte da minha vida. E obrigada a todos os outros que compõem a equipe LPA/LEB, que contribuem de forma direta e indiretamente para meu crescimento e convivem comigo diariamente.

Meu agradecimento as amizades nascidas e cultivadas no processo de disciplinas cursadas durante o mestrado, e que se consolidaram de forma linda. A Katilis, This e Momis meu muito obrigada a vocês que tornaram tudo mais leve e fácil nessa caminhada.

Agradeço também a turma de mestrado 2016.1 pela amizade, informações trocadas e angústias compartilhadas. A CAPES pela bolsa concedida, a UNIT e ao ITP pela infraestrutura disponibilizada para realização desta dissertação de mestrado. Agradeço também aos professores que fazem parte do Programa em Engenharia de Processos (PEP).

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

## ESTUDO DO PARTICIONAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR ACETONITRILA E DIFERENTES SOLVENTES CONVENCIONAIS E NÃO CONVENCIONAIS

Isabela Nascimento Souza

Os compostos fenólicos (CF) são antioxidantes com diversas propriedades biológicas, que podem atuar de diversas formas, tais como, agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais e desativadores do oxigênio singlete, são compostos de suma importância tanto para a indústria alimentícia quanto para a indústria farmacêutica. O sistema aquoso bifásico (SAB) é uma técnica para a extração, concentração e purificação de vários compostos, que apresenta alta versatilidade, alta eficiência, alto rendimento, seletividade, baixo custo e simplicidade tecnológica. Inúmeras são as combinações de compostos que podem promover a formação de SAB. O objetivo deste trabalho é a extração de CFs utilizando SAB formados por acetonitrila (ACN) e solventes convencionais (carboidratos e maltodextrina) e não-convencionais (cloreto de colina e solventes eutéticos profundos-DES). Os diagramas de fase foram determinados a 25 °C e a pressão atmosférica, verificou-se o efeito da razão molar dos DES na sua capacidade de formação de fase com ACN, bem como a influência do doador de ligação de hidrogênio do DES, também foi realizada a comparação quanto a capacidade de formação de fase com sistemas baseados em ACN e os constituintes do DES individualmente. O efeito da dextrose equivalente da maltodextrina na capacidade de formação de fase foi avaliado. E o potencial de particionamento dos sistemas foram avaliados utilizando os compostos fenólicos, tais como ácido cafeico, ferúlico, vanílico, siríngico e vanilina como biomoléculas a serem extraídas. Nos SAB formados por maltodextrina obteve uma recuperação máxima da vanilina de 92,38% em um único passo, já com os SAB baseados em DES obteve uma faixa de valores entre 34,85% e 89,75% para as diferentes biomoléculas particionadas.

Palavras-chave: Sistemas aquosos bifásicos, compostos fenólicos, particionamento, acetonitrila, solventes convencionais e não-convencionais

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

STUDY OF THE PARTITIONING OF PHENOLIC COMPOUNDS IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS FORMED BY ACETONITRILE AND DIFFERENT CONVENTIONAL AND NON-CONVENTIONAL SOLVENTS

Isabela Nascimento Souza

Phenolic compounds (PCs) are antioxidants with diverse biological properties, which can act in different ways, such as reducing agents, free radical scavengers, metal chelators and singlet oxygen deactivators, are compounds of paramount importance for the food industry as well as pharmaceutical industry. Aqueous two-phase systems (ATPS) is a technique for the extraction, concentration and purification of various compounds, which presents high versatility, high efficiency, high yield, selectivity, low cost and technological simplicity. Numerous are combinations of compounds that can promote the formation of ATPS. The objective of this work is the extraction of PCs using ATPS composed of acetonitrile (ACN) and conventional (carbohydrate and maltodextrin) and non-conventional solvents (choline chloride and deep eutectic solvents-DES). The phase diagrams were determined at 25 ° C and at atmospheric pressure, verified the effect of the DES molar ratio on its ACN phase formation capacity, as well as the influence of the DES hydrogen bonding donor, also compared the phase formation capability with ACN based systems and the constituents of DES individually. The effect of maltodextrin equivalent dextrose on the phase formation capacity was evaluated. The partitioning potential of the systems were evaluated using phenolic compounds such as caffeic acid, ferulic acid, vanillic acid, syringic acid and vanillin as biomolecules to be extracted. In maltodextrin formed ATPs, a maximum vanillin recovery of 92.38% was achieved in a single step, whereas DES-based ATPS obtained a range of values between 34,85% e 89,75% for the different partitioned biomolecules.

Keywords: Aqueous two-phase systems, phenolic compounds, partitioning, acetonitrile, conventional and non-conventional solvents



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS .....	5
3.1.1. Ácidos Fenólicos.....	6
3.1.1.1. Ácido Caféico.....	8
3.1.1.2. Ácido Ferúlico.....	9
3.1.1.3. Ácido Siríngico .....	10
3.1.1.4. Ácido Vanílico .....	10
3.1.1.5. Vanilina.....	11
3.2. SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB).....	13
3.3. CONSTITUINTES DO SAB .....	17
3.3.1. Solventes Convencionais .....	17
3.3.1.1. Carboidratos .....	17
3.3.1.2. Maltodextrina .....	18
3.3.2 Solventes não-convencionais .....	19
3.3.2.1. Cloreto de Colina.....	19
3.3.2.2 Solventes Eutéticos Profundos (DES) .....	21
3.3.3 Acetonitrila .....	23
<b>INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS 4 E 5.....</b>	<b>25</b>
<b><i>AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS FORMED BY MALTODEXTRIN AND ACETONITRILE: PHASE DIAGRAMS AND PARTITIONING STUDIES.....</i></b>	<b>26</b>
<b><i>PHENOLIC COMPOUNDS PARTITIONING IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM BASED ON ACETONITRILE + DEEP EUTECTIC SOLVENTS + WATER.....</i></b>	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>FIGURA 1: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO CAFÉICO.</i> .....	8
<i>FIGURA 2: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO FERÚLICO.</i> .....	9
<i>FIGURA 3: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO SIRÍNGICO.</i> .....	10
<i>FIGURA 4: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO VANÍLICO.</i> .....	11
<i>FIGURA 5: ESTRUTURA MOLECULAR DA VANILINA.</i> .....	12
<i>FIGURA 6: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UM DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO</i> .....	15
<i>FIGURA 7: ESTRUTURA QUÍMICA DOS AÇUCARES ESTUDADOS.</i> .....	18
<i>FIGURA 8: ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE COLINA.</i> .....	20
<i>FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PONTO EUTÉTICO DE UM DIAGRAMA DE FASES DE DOIS COMPONENTES.</i> .....	21
<i>FIGURA 10: EXEMPLO DA FORMAÇÃO DE UM SOLVENTE EUTÉTICO.</i> .....	22

## LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1: CLASSES DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS.....</i>	<i>6</i>
<i>TABELA 2: PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS DERIVADOS DO ÁCIDO BENZÓICO.....</i>	<i>7</i>
<i>TABELA 3: PRINCIPAIS ÁCIDOS FENÓLICOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO.....</i>	<i>7</i>
<i>TABELA 4: PROPRIEDADES DO CLORETO DE COLINA.....</i>	<i>20</i>

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos (CF) são substâncias que possuem em sua estrutura química anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, os quais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Podem ser subdivididos em três grupos: ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, estes compostos possuem uma variedade de efeitos biológicos sobre a saúde humana, incluindo atividades anti-inflamatória, antialérgica, antioxidante, vascular, e citotóxica antitumoral.

Com o aumento do consumo de alimentos há também o aumento da demanda por aditivos alimentares com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo, alguns destes são os compostos fenólicos. Considerando estas diversas propriedades biológicas e utilidades, então é de grande importância estudos envolvendo sua produção, separação e purificação, com técnicas que mantenham suas características funcionais inalteradas, cada vez mais sustentáveis e de baixo custo, pois os mesmos se mostram de suma importância tanto para a indústria alimentícia quanto para a indústria farmacêutica.

Geralmente a extração destes biocompostos utilizados na indústria é realizada por meio de processos tido como tradicionais, com utilização de extração sólido-líquido com solventes orgânicos, a quente ou a frio, agentes quelantes e precipitantes, técnicas cromatográficas ou através de técnicas menos tradicionais, tais como a aplicação de extração com fluidos supercríticos, ultrassom, e radiação micro-ondas. Entretanto, essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos dispendiosos e podem apresentar condições que sejam danosas às biomoléculas, como danos estruturais.

Uma técnica que surge e se encaixa no perfil adequado para contribuir na extração destes biocompostos são os sistemas aquosos bifásicos (SAB), devido à sua versatilidade, alta eficiência, alto rendimento, seletividade, baixo custo e simplicidade tecnológica e apresentarem ambiente biocompatível, e vêm sendo bastante utilizada para a detecção, extração, concentração e purificação de vários compostos de interesse industrial. São vários os constituintes que podem formar SAB, no entanto ainda não é discutido na literatura sobre o uso do solvente convencional

(maltodextrina) e não-convencional (solventes eutéticos profundos ou do inglês Deep Eutectic Solvents-DES) na formação de SAB quando combinados com a acetonitrila (ACN).

Dentro da classificação de solventes convencionais estão as maltodextrinas (Mx), que são biopolímeros de baixo custo, sendo assim uma alternativa para substituir outros polímeros de alto custo como a dextrana na formação de SAB e assim tornar possível a aplicação do processo em grande escala. Também como os carboidratos são um grupo grande e diverso de elementos orgânicos, incluindo açúcares, celulose e amido, são moléculas não carregadas, biodegradáveis, não tóxicas e uma matéria-prima renovável. Os carboidratos são usados para promover SAB individualmente para uma melhor discussão dos resultados obtidos, e também como doador de ligação de hidrogênio na preparação dos DES para formação de SAB com a ACN.

Classificados como solventes não convencionais, os DES surgiram nos últimos anos como uma nova classe de solventes com aplicações promissoras em várias áreas da pesquisa como eletroquímica, biocatálise, extrações líquido-líquido, sólido-líquido, entre outras. Apresentam vantagens tais como, solventes de baixo custo, preparação fácil e rápida, sem necessidade de purificação adicional, utilizando matérias-primas biodegradáveis e renováveis, viabilizando assim a sua utilização em larga escala. Recentemente alguns autores relataram a sua capacidade de formar SAB quando combinado com sal. No entanto ainda não é reportado na literatura sua aplicação na formação de SAB com solvente orgânico, nomeadamente acetonitrila. Visto que a união de uma técnica de extração ecologicamente correta, aliada a utilização de um solvente verde, permite um processo de extração não agressivo ao meio ambiente. Já o cloreto de colina (ChCl) é um sal amplamente usado devido à sua natureza não tóxica, destaca-se por ser uma matéria-prima de baixo custo, biodegradável e de baixa toxicidade. No presente estudo é o sal utilizado tanto na preparação dos DES, para posterior formação de SAB com ACN, como na sua forma pura para promover SAB juntamente com ACN.

Os solventes orgânicos surgem como constituintes para formação de SAB, tendo como vantagens a obtenção de maior grau de pureza, seletividade adequada, baixo custo, melhorando a solubilidade e eficiência do processo de transferência de massa. Vários SAB são reportados na literatura formados por solventes orgânicos, dentre eles têm-se álcoois, ACN, tetrahidrofurano, acetona, entre outros.

Neste sentido, este trabalho apresenta a formação de novos SAB baseados em ACN + Mx e ACN + DES, não reportados na literatura, também como sua aplicação no particionamento

de diversos compostos fenólicos de grande interesse industrial, tais como ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido vanílico e vanilina.

# Capítulo 2

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o particionamento dos compostos fenólicos em sistemas aquosos bifásicos formados por acetonitrila (ACN) e solventes convencionais (carboidratos e maltodextrina) e não-convencionais (cloreto de colina e DES).

### 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os solventes eutéticos profundos, com diferentes doadores de ligação de hidrogênio, os açúcares monossacarídeos D-(+)- glicose, D(+)- manose, , D-(+)- xilose, L-(+)- arabinose e o dissacarídeo sacarose. E cloreto de colina como acceptor de ligação de hidrogênio;
- Construir diagrama de fases para sistemas formados por solventes eutéticos profundos + acetonitrila; maltodextrina + acetonitrila.
- Determinar os coeficientes de partição e recuperações dos compostos fenólicos (ácido cafeico, siríngico, vanílico, ferúlico e vanilina) nos sistemas propostos;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentado o estado da arte referente à extração de biomoléculas com aplicação de SAB, e as propriedades dos constituintes formadores do SAB (DES, carboidratos, cloreto de colina e ACN) e dos compostos fenólicos a serem extraídos.

#### 3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos (CF) constituem um dos mais numerosos grupos de metabólitos secundários em plantas e os principais componentes antioxidantes, comumente encontrados em diversos produtos alimentares como vegetais e frutas (SOOBRAATTEE et al., 2005; TAPAS et al., 2008; LI et al., 2014). Estes compostos têm um papel importante no crescimento e reprodução das plantas, proporcionando proteção contra patógenos e predadores (BRAVO, 1998). Muitos destes compostos fenólicos são produzidos como um mecanismo de defesa da planta em resposta ao rompimento do tecido ou ataque patogênico (ABREU et al., 2012). Auxilia na maturação dos frutos, proteção contra bactérias e insetos e também no desenvolvimento sensorial como a cor e sabor dos alimentos. Os antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável, tem como papel proteger as células sadias do organismo contra a ação oxidante dos radicais livres. Diversas são as formas antioxidantes que os CF podem atuar, tais como, como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais e desativadores do oxigênio singlete (PAZ et al., 2015).

Estruturalmente, os CF constituem-se em um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxilas. Suas estruturas podem variar desde uma molécula fenólica simples até um polímero complexo de elevado peso molecular (BRAVO, 1998; DUBICK & OMAYE, 2001; BALASUNDRAM et al., 2006; LI et al., 2014). Com mais de 8.000 compostos já identificados, os CF podem ser classificados quanto à sua estrutura básica, ou seja, com relação ao número de átomos de carbono em sua estrutura, como mostrado na Tabela 1 (HARBORNE, 1989; HARBORNE et al., 1999). Destes, os flavonóides, taninos e ácidos fenólicos, são consideradas as principais classes de compostos fenólicos. Por que os flavonóides são o maior grupo de fenóis vegetais e os mais estudados. Os taninos, são compostos de alto peso molecular que são divididos em 2 classes: taninos hidrolisáveis e condensados. Os ácidos fenólicos formam um grupo diverso que inclui os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico amplamente distribuídos (BALASUNDRAM et al., 2006; BORGES et al., 2013; KHAN et al., 2014).



Além disto, podem também ser classificados de uma forma mais simplificada, de acordo com sua massa molecular, como, compostos fenólicos de baixa massa molecular (ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos), massa molecular intermediária (flavonóides) e alta massa molecular (taninos condensados e os taninos hidrolisáveis) (ESCARPA & GONZALEZ, 2001).

**Tabela 1:** Classes de compostos fenólicos em plantas.

<b>Classe</b>	<b>Átomos de Carbono</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzóicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Ácidos hidroxicinâmico, fenilpropanoides (cumarinas, isocumarinas, cromonas, cromenas)	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Naptoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Xantanas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Estilbenas, antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Flavovonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignanas, neolignanas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados (proantocianidinas)	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

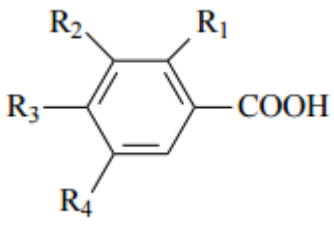
**Fonte:** (BALASUNDRAM et al., 2006)

### 3.1.1. Ácidos Fenólicos

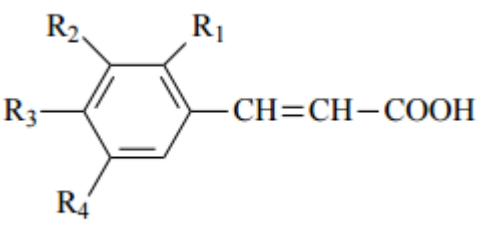
Os ácidos fenólicos (AF) caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, as quais conferem propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002). São considerados um dos componentes funcionais dos frutos, podendo representar cerca de um terço dos compostos fenólicos na alimentação humana. Além de inibirem a formação de radicais livres e inativar espécies radiculares, algumas vezes funcionam como quelantes de metais, agem tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo e, conseqüentemente, previne danos ao DNA (RAMALHO & JORGE, 2006; GRUZ et al., 2011) e na sua forma livre também apresentam atividade antimicrobiana (LICANDRO-SERAUT et al., 2013).

Os AF podem ser divididos em dois grupos principais, os ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, ambos derivados de ácidos não fenólicos, como o ácido benzóico (Tabela 2) e o ácido cinâmico (Tabela 3), respectivamente.

**Tabela 2:** Principais ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico.

<i>Derivados do Ácido Benzóico</i>	<i>Substituintes</i>
	$R_1 = OH; R_2=R_3=R_4= H$ (Ácido Salicílico)
	$R_1 = R_4 = OH; R_2=R_3= H$ (Ácido Gentísico)
	$R_3 = OH; R_1=R_2=R_4= H$ (Ácido p- hidroxibenzóico)
	$R_2 = R_3 = OH; R_1=R_4= H$ (Ácido Protocatequínico)
	$R_2 = OCH_3 ; R_3 = OH; R_1= R_4= H$ (Ácido Vanílico)
	$R_2 = R_3 = R_4 = OH; R_1= H$ (Ácido Gálico)
	$R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH; R_1= H$ (Ácido Siríngico)

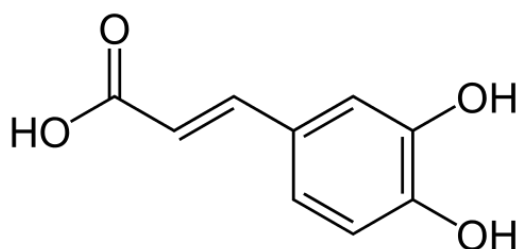
**Tabela 3:** Principais ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.

<i>Derivados do Ácido Cinâmico</i>	<i>Substituintes</i>
	$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ (Ácido cinâmico)
	$R_1 = OH; R_2 = R_3 = R_4 = H$ (Ácido o- cumárico)
	$R_2 = OH; R_1 = R_3 = R_4 = H$ (Ácido m- cumárico)
	$R_3 = OH; R_1 = R_2 = R_4 = H$ (Ácido p- cumárico)
	$R_2 = R_3 = OH; R_1=R_4= H$ (Ácido Caféico)
	$R_2 = OCH_3; R_3 = OH; R_1=R_4= H$ (Ácido Ferúlico)

Ácidos hidroxibenzóicos incluem o gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, ácido vanílico e siríngico, que têm em comum a estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ácidos hidroxicinâmicos, por outro lado, são compostos aromáticos com uma cadeia de três carbonos laterais (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), como caféico, ferúlico, ácidos p-cumárico e sinápico sendo os mais comuns (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM et al., 2006; GIADA, 2013). Os ácidos fenólicos que serão extraídos neste trabalho são: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido siríngico e ácido vanílico.

### 3.1.1.1. Ácido Caféico

O ácido caféico (AC) ou 3,4-dihidroxi ácido cinâmico (Figura 1), de fórmula molecular  $C_9H_8O_4$  é um dos compostos fenólicos mais importantes, apresentando diversas propriedades farmacológicas. Está presente em todas as plantas e é naturalmente encontrado em frutas, legumes, e produtos como o vinho, azeite e café (PRASAD et al., 2011). É um composto fenólico antioxidante, responsável pela neutralização dos radicais livres que possam causar danos oxidativos nas membranas celulares e DNA, é um dos hidroxicinâmicos mais amplamente distribuídos e pode ser encontrado em diversas formas como ésteres e amidas (FU et al., 2010).



**Figura 1:** Estrutura molecular do ácido caféico.

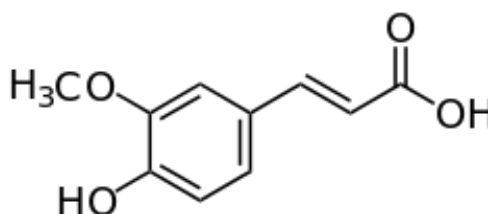
O AC quando puro é um pó cristalino amarelo claro, incompatível com oxidantes fortes e bases fortes e tem uma densidade de  $1,478 \text{ g/cm}^3$ . Tem um ponto de fusão da ordem dos  $223\text{-}225^\circ\text{C}$ , uma massa molecular de  $180,16 \text{ g/mol}$ , e apresenta um pico de absorção a  $327 \text{ nm}$  (CHEMSPIDER CHEMICAL DATABASE, 2017).

A extração deste composto tem um grande interesse prático, devido à sua grande variedade de atividades biológicas, incluindo antioxidante, antitrombose, anti-hipertensiva, anti-fibrótica, propriedades antiviral, atuando como importante scavenging de radicais, e também como quelante de íons metálicos (AMORATI et al., 2006; GULCIN, 2006; PRASAD et al., 2011), antiinflamatórias (CHEN et al., 1995), antibacterianas (ANI et al., 2006) e anticarcinogênicas (KANG et al., 2009). Quando absorvido pela corrente sanguínea, o ácido cafeico apresenta capacidade de proteger *in vitro* a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, além de apresentar um grande poder inibidor de dano no DNA dependente de ferro (HYNES & O'COINCEANAINN, 2004; CHAO et al., 2009). Um estudo realizado por Kuenzing et al. (1984), demonstrou que o ácido cafeico podem desempenhar um papel na defesa

do organismo contra a carcinogênese, inibindo a formação de compostos N-nitrosos. É um ácido que ajuda a prevenir danos às nossas células, causados pela luz ultravioleta (PRASAD et al., 2011). Outros autores observaram o efeito hipoglicemiante deste ácido, demonstrando que este composto fenólico pode reduzir os níveis de glicose no sangue (JUNG et al., 2006; CHENG et al., 2003).

### 3.1.1.2. Ácido Ferúlico

O ácido ferúlico (AFé) ou 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (Figura 2), de fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_4$  é um composto de ocorrência natural, extremamente abundante no reino vegetal, presente na linhaça (CHOO & BIRCH, 2009), no trigo, milho, aveia e especialmente rico na forma de éster em farelos de arroz. Concentrado na parede celular do revestimento exterior da semente (ZUPFER, et al., 1998), tem baixa toxicidade e é sintetizado a partir da via do chiquimato, a partir da fenilalanina ou da L-tirosina. Na natureza ocorre principalmente como isômero E (ITAGAKI et al., 2009; WANG et al., 2011; SONG et al., 2014).



**Figura 2:** Estrutura molecular do ácido ferúlico.

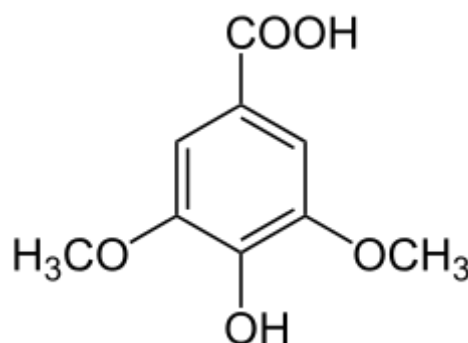
Considerando suas propriedades físico-químicas e biológicas, o AFe apresenta solubilidade aquosa de  $6,63 \text{ mg.dL}^{-1}$  em pH 7,2 (SAIJA, 2000), uma meia-vida de 42 min (ZHAO, 2008) e um coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) de 1,67 (ROLEIRA, 2010).

Tem atividade terapêutica diversificada, incluindo efeitos como anti-inflamatório, antioxidante, antitrombótico, anticancerígeno, neuroprotetor e cardioprotetor. Quando aplicado sobre a pele pode apresentar um efeito fotoprotetor (SCALIA & MEZZENA, 2009; YU et al., 2010; WANG et al., 2011; DU et al., 2011; MERLIN et al., 2012; STANIFORTH et al., 2012). Os estudos demonstram que o AFe está entre os fatores mais inibidores à degradabilidade da parede celular de polissacarídeos (DU et al., 2009). Na forma livre o AFe é um adstringente e

pode, conseqüentemente, atuar como inseticida em insetos e animais. Os AFe e AC foram utilizados como aditivo antioxidante ao biodiesel de soja (WANG et al., 2011).

### 3.1.1.3. Ácido Siríntrico

O ácido siríntrico (AS) ou 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (Figura 3), de fórmula molecular  $C_9H_{10}O_5$  ocorrem naturalmente em muitos alimentos vegetais comestíveis como a canela, o gergelim e o azeite (GÓMEZ et al., 2002; RAO & GAN, 2014; WU et al., 2016).



**Figura 3:** Estrutura molecular do ácido siríntrico.

O AS tem ponto de fusão entre 205-209 °C e um coeficiente de partição octanol/água (log P) de 1,129. Quando puro apresenta-se como um pó castanho claro, de massa molecular de 198,173 g/mol (CHEMSPIDER CHEMICAL DATABASE, 2017).

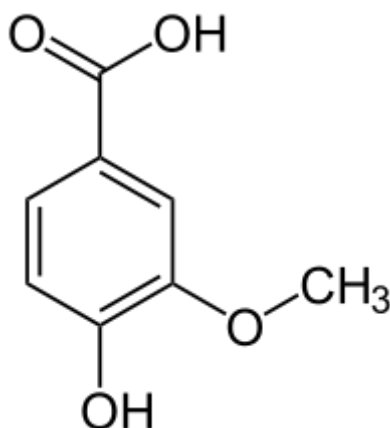
É um composto que possui atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (SIDDARAJU & DHARMESH, 2007; SEVGI et al., 2015). AS é um forte antiproliferativo (PREETHA et al., 2013), anti-endotóxico (KAMPA et al., 2004), anticancerígeno (LIU et al., 2003) e atividade hepatoprotetora (GUIMARAES et al., 2007).

Almeida et al. (2010) trabalhou com SAB composto de polietileno glicol (PEG) e  $Na_2SO_4$  utilizando líquidos iônicos como aditivos com aplicação no particionamento de ácidos fenólicos, tais como ácido gálico, vanílico e siríntrico obtendo eficiências de extração variando entre 80% e 99%.

### 3.1.1.4. Ácido Vanílico

O ácido vanílico (AV) ou ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (Figura 4), de fórmula molecular  $C_8H_8O_4$  é um derivado de ácido diidroxibenzoico utilizado como agentes

aromatizantes em alimentos e produtos farmacêuticos. É uma forma oxidada da vanilina. E um intermediário na produção de vanilina a partir do ácido ferúlico (LESAGE-MEESSEN et al., 1996; CIVOLANI et al., 2000; SREEDHAR et al., 2007; SINGH e al., 2015; VINOITHIYA & ASHOKKUMAR, 2017). Também é encontrado nas plantas e frutos comestíveis e a maior quantidade é nas raízes de *Angelica sinensis* (SWISŁOCKA et al., 2013)



**Figura 4:** Estrutura molecular do ácido vanílico.

O AV se apresenta na forma física como cristais ou pó branco inodoro, tem uma densidade de  $1,4 \pm 0,1 \text{ g/cm}^3$ , ponto de fusão entre 208-210 °C e um coeficiente de partição octanol/água (log P) de 1,334 (CHEMSPIDER CHEMICAL DATABASE, 2017).

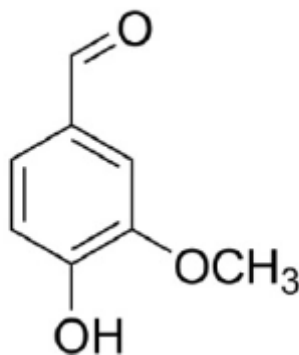
O AV tem sido associado a uma variedade de atividades farmacológicas tais como a inibição da atividade de veneno de cobra (DHANANJAYA et al., 2009), antifilarial (VARMA et al., 1993), antibacteriana (RAI & MAURYA, 1966), antimicrobiana (YEMIŞ et al., 2011), anti-inflamatório (KIM et al., 2011), antioxidante (TAI et al., 2012), anti-carcinogênese (VETRANO et al., 2005), antiapoptose (HUANG et al., 2008), hepatoprotetor (ITOH et al., 2009), anti-colítico (KIM et al., 2010), quimiopreventiva (TSUDA et al., 1994) e efeitos cardioprotetores em ratos miocárdicos (STANELY MAINZEN PRINCE et al., 2011).

### 3.1.1.5 Vanilina

A vanilina (Figura 5) é uma molécula originalmente produzida por orquídeas do gênero *Vanilla* sendo que a mais comum é a *Vanilla planifolia*. Mais precisamente a vanilina é produzida na vagem ou fava da *Vanilla* (Walton, Mayer e Narbad, 2003). De acordo com as regras da IUPAC sua nomenclatura é 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído e popularmente conhecida

como baunilha. A vanilina é um composto cristalino de cor branca com boa solubilidade em clorofórmio e éter. Sua massa molar é de 152,14 g.mol<sup>-1</sup> e possui a fórmula química (CH<sub>3</sub>O)(OH)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CHO).

O interesse sobre a vanilina é principalmente apreciado por criar sabores artificiais em uma ampla gama de produtos comerciais, é atualmente utilizada em alimentos, bebidas, na indústria de cosméticos devido à sua fragrância e em produtos químicos especiais para aplicações técnicas, tais como a análise por cromatografia em camada fina (NOUBIGH et al., 2010). Devido ao seu caráter fenólico, a vanilina possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que são devidas à interação com espécies radicalares, evitando, dessa forma, os processos oxidativos (ANTONIOLLI et al., 2004). Além disso, algumas pesquisas ilustram o seu potencial antimutagênico (MAURYA et al., 2007).



**Figura 5:** Estrutura molecular da Vanilina.

Diversos SAB formados por diferentes constituintes têm sido reportado na literatura para a extração da vanilina. Cláudio et al. (2010) extraíram a vanilina utilizando SAB formado por líquidos iônicos. Em todos os sistemas e condições testadas, a vanilina migra preferencialmente para a fase rica em IL. Cardoso et al. (2013) estudou o potencial de partição de SAB baseados em ACN e carboidratos utilizando a vanilina como biomolécula extraída. Neste caso a vanilina migra preferencialmente para a fase rica em ACN.

Portanto, diante das diversas propriedades biológicas e utilitárias destas biomoléculas, faz se necessárias pesquisas envolvendo a extração destes compostos, pois os mesmos se mostram de suma importância tanto para a indústria alimentícia quanto para a indústria farmacêutica. E uma técnica que vêm se revelando ter um grande potencial de extração de biomoléculas de interesse é o SAB.

### 3.2. SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

A formação dos SAB foi descrita pela primeira vez no final do século XIX. Em 1896, quando Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, se separavam em duas fases aquosas, sendo a fase mais densa enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, e que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Posteriormente, Ostwald e Hertel em 1929, continuaram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc), isto é, possuindo diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esses resultados mostravam a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Com o objetivo de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a miscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes autores constataram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, e puderam concluir que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DIAMOND & HSU, 1992; SILVA & LOH, 2006).

Porém, foi somente nos anos de 1950 que os trabalhos de Albertson deram aos SAB a importância no âmbito de sua aplicação para processos de partição e extração de biomoléculas devido aos SAB serem constituídos majoritariamente por água (HUSTEDT et al., 1985). Mais tarde, precisamente nos anos de 1980, estudos com os SAB mostraram também a sua eficiência para uso na extração não só de compostos orgânicos e inorgânicos como também de íons (ROGERS et al., 1996; RITO PALOMARES, 2002).

O SAB ocorre quando dois compostos solúveis em água são misturados acima das concentrações críticas de cada um desses componentes, resultando em duas fases imiscíveis (fase de topo e fase de fundo) (GARZA-MADRID et al., 2010). Para promover a formação de SAB, vários compostos podem ser utilizados, tais como diferentes polímeros (SILVA & MEIRELLES, 2000; AZEVEDO et al., 2009), sais inorgânicos (SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2010), açúcares (WU et al., 2008; CHEN et al., 2010), líquidos iônicos (FREIRE et al., 2011), alcoóis (REIS et al., 2012), acetonitrila (CARDOSO et al., 2015; SANTOS et al., 2016), tetrahidrofurano (SOUSA et al., 2016) e solventes eutéticos profundos (ZENG et al., 2014, XU et al., 2015, LI et al., 2016).

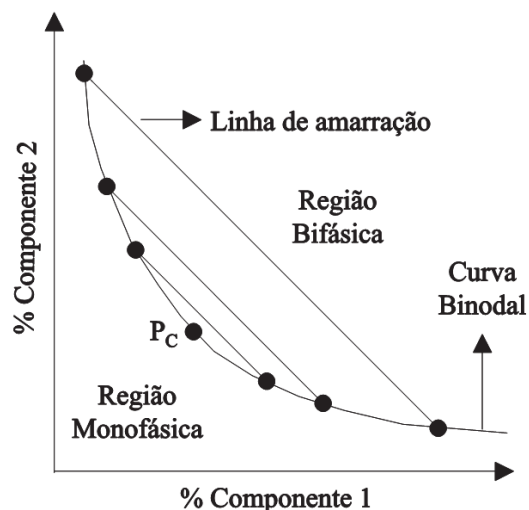


A formação de duas fases durante o processo de mistura dos compostos dependerá das interações intermoleculares, as quais são responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, como por exemplo, a distribuição dos diferentes componentes no sistema, da relação de volumes entre as fases, da diferença de potencial eletrostático e do excesso de energia livre associados à interface, do coeficiente de partição de um soluto específico, etc. (SILVA & LOH, 2006).

Os SAB têm sido usados na extração e purificação de biomoléculas de interesse (REIS et al., 2012), como albumina (YAN-MIN et al., 2010), triptofano (PEREIRA et al., 2010), aminoácidos (DOMINGUEZ-PEREZ et al., 2010), antibióticos (WANG et al., 2010), alcalóides (TELLO et al., 2011), diuron (SOUSA et al., 2016) e vanilina (CARDOSO et al., 2015), também como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI et al., 2003), na remoção de íons metálicos (HANSON et al., 1992), compostos aromáticos de óleo (MAZZERA et al., 1999), poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS et al., 1998).

As vantagens do SAB são a biocompatibilidade, baixa tensão interfacial, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das biomoléculas (SELVAKUMAR et al., 2010). O componente majoritário em ambas as fases é a água, fornecendo um ambiente ameno para as biomoléculas evitando, assim, mudanças em suas estruturas e perdas das atividades biológicas (SILVA & LOH, 2006). Além de possuir potencial de reuso dos reagentes utilizados (FERREIRA et al., 2011). A utilização de SAB é compatível com os processos de biosseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial (DIAMOND & HSU, 1992; ZASLAVSKY, 1995; CASTRO; AZNAR, 2005; COIMBRA & TEIXEIRA, 2009).

Para que se possa aplicar os SAB ao estudo de partição de biomoléculas é importante que se conheça previamente seus diagramas de fase. Devido ao alto teor de água, a representação gráfica dos dados termodinâmicos do SAB é feita geralmente por meio de diagramas retangulares (Figura 6). A concentração de um dos componentes é representada na abcissa (1), e a concentração do outro componente, na ordenada (2). A quantidade de água (ou do terceiro componente) é obtida por diferença.



**Figura 6:** Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio  
**Fonte:** (SILVA; LOH, 2006).

Esses diagramas representam graficamente quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal. São representadas também, as linhas de amarração ou do inglês *tie-lines* (TL), que são retas que ligam os pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio (PEI et al., 2012). Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases de topo e fundo com composição final iguais, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA & LOH, 2006). O ponto crítico ( $P_c$ ) é onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). Este ponto pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias TL, de uma curva binodal. O ponto médio é representado pelo ponto onde a curva binodal é tangente à linha que une os segmentos iguais nos eixos do diagrama. A posição relativa do ponto limite e do  $P_c$  define a simetria do diagrama de fases. Quando estes dois pontos são coincidentes, o diagrama de fases é considerado simétrico (RODRIGUES et al., 2001).

O comprimento da linha de amarração (usualmente referido como TLL) é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição. De acordo com Malpiedi et al. (2009), o aumento da TLL ocasiona uma diminuição do volume livre na fase de fundo do sistema, promovendo a partição da biomolécula para a fase de topo, porém não é uma regra geral, depende dos sistemas em questão, podendo acontecer o contrário. A medida que o valor do TLL aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases, podendo elevar, a eficiência na extração e/ou partição da molécula

de interesse (PEI et al., 2012). A TLL pode ser calculada a partir das diferenças nas concentrações dos componentes de cada fase, por meio da equação (1):

$$TLL = [(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2]^{0.5} \quad (1)$$

onde:  $\Delta C_1$  e  $\Delta C_2$  são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente.

O método de Merchuk é o modelo matemático que correlaciona os pontos experimentais e descreve o sistema, utilizado para partição e recuperação de moléculas em SAB. Diferentes modelos termodinâmicos têm sido desenvolvidos, o modelo da equação virial, baseada no conhecimento da pressão osmótica de um solvente, NRTL (Non Random Two Liquid) e o de Wilson, modelos que são frequentemente utilizados para correlação e predição do equilíbrio de SAB constituído por polímero e sal (ZAFARANI-MOATTAR & NASIRI, 2010).

Para a partição da molécula de interesse aplicando SAB, outro parâmetro torna-se indispensável, o coeficiente de partição (K). A distribuição desigual da biomolécula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a biomolécula e as outras espécies presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU et al., 2010). A distribuição de biomoléculas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada pelo K. Esse coeficiente de partição é definido como a razão entre a concentração de uma molécula nas fases de topo e fase de fundo (WANG et al., 2011) pela equação (2):

$$K_{CF} = \frac{C_T}{C_B} \quad (2)$$

onde:  $C_T$  e  $C_B$  são as concentrações das biomoléculas nas fases de topo e fundo (T= topo ou F= fundo), respectivamente.

Como relatado anteriormente, para promover a formação de SAB vários compostos podem ser utilizados e neste estudo os novos SAB são compostos por solventes convencionais e não-convencionais combinado com a ACN.

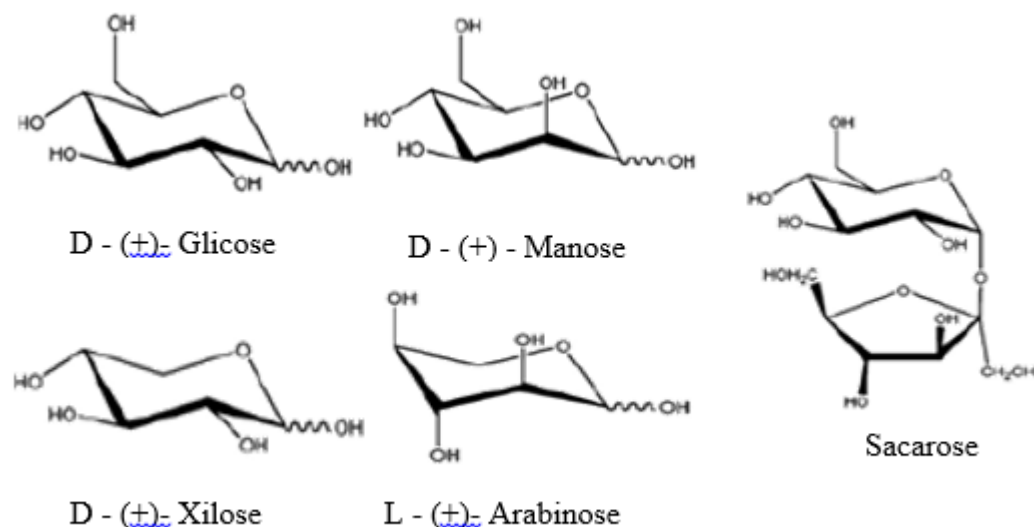
### 3.3. CONSTITUINTES DO SAB

#### 3.3.1. Solventes Convencionais

##### 3.3.1.1. Carboidratos

Os carboidratos são os compostos mais abundantes na natureza (POMIN & MOURÃO, 2006), algumas delas existem de forma natural, praticamente pura, como: sacarose, glicose, frutose, amido e celulose e em termos de volume de produção mundial, os carboidratos ficam apenas atrás dos óleos vegetais. Na utilização industrial, exceto pela indústria alimentícia, seu uso está restrito a alguns mono e dissacarídeos de baixo peso molecular, sendo extremamente atrativos como matéria-prima para experimentos laboratoriais, devido a sua disponibilidade em grandes quantidades, baixo custo e ecologicamente adequados (FERREIRA et al., 2001). Caracteriza-se um grupo grande e diverso de elementos orgânicos, incluindo açúcares, celulose e amido de fórmula geral  $(CH_2O)_n$ . Essas moléculas são biodegradáveis, não carregadas, não tóxicas e uma matéria-prima renovável e são classificados em monossacarídeos, oligossacarídeos (2-10 monossacarídeos ligados) e polissacarídeos (> 10 monossacáridos ligados) (SOLOMONS & FRYHLE, 2002). Os carboidratos são polihidroxi aldeídos ou cetonas com alta afinidade pela água uma vez que vários grupos -OH, com um duplo doador/aceptor, podem estar envolvidos na ligação de hidrogênio (MONTEIRO-FILHO, 2010).

Neste trabalho os açúcares monossacarídeos (glicose, manose, xilose e arabinose) e dissacarídeo (sacarose) foram usados como os doadores de ligação de hidrogênio na preparação dos DES, e individualmente para a formação de SAB com a ACN, e assim avaliar o potencial de extração utilizando compostos fenólicos. Na Figura 7 são apresentadas as estruturas químicas de todos os açúcares utilizados.



**Figura 7:** Estrutura química dos açúcares estudados.

**Fonte:** (CARDOSO et al., 2013).

Os monossacarídeos são os carboidratos mais simples, e quimicamente são aldeídos ou cetonas podendo conter um ou mais grupos hidroxila na molécula. Os monossacarídeos são compostos incolores, solúveis em água e insolúveis em solventes apolares. As moléculas dos monossacarídeos são constituídas por uma cadeia carbônica não-ramificada na qual todos os átomos de carbono estão unidos entre si por ligações covalentes simples. (CONN & STUMPF, 1975; LEHNINGER et al., 2006). Já os oligossacarídeos são polímeros pequenos de vários monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, a qual é formada quando um grupo hidroxila de uma molécula de açúcar reage com o átomo de carbono anomérico da outra molécula de açúcar. As ligações glicosídicas são facilmente hidrolisadas por ácido em solução, mas são resistentes à separação e quebra por base. Os oligossacarídeos mais comuns são os dissacarídeos como a sacarose, galactose, presentes no leite e na cana de açúcar (HODGE & OSMAN, 1976).

### 3.3.1.2 Maltodextrina

As maltodextrinas (Mx) são polímeros adquiridos a partir de hidrolisados de amido, provindos de diversos vegetais, por meio de tratamento térmico, ácido e/ou enzimático. São constituídas por unidades de D-glicose, que se ligam principalmente por ligações glicosídicas com ampla distribuição da massa molecular, variando entre 900 e 18000 Da e com valores de

dextrose equivalente (DE) variando de 3 a 20 (CASTRO et al., 2016). Elas são classificadas pelo grau de hidrólise, expressado em DE, que é a porcentagem de açúcares redutores calculados como glicose em relação ao peso seco do amido (KENNEDY et al., 1995; CHRONAKIS, 1998).

As Mx têm larga utilização como ingrediente principal ou aditivos nas indústrias de cosmético, alimentar e farmacêutico, sendo mais popular seu uso na indústria alimentícia por oferecer características particulares a alimentos industrializados, tais como, modificação de textura, para atribuir brilho à superfície do alimento, substituir a gordura, encapsulamento, na prevenção da cristalização e, assim, expandir a vida útil dos produtos, e em diversas outras aplicações específicas (AANDARAMAN & REINECCIUS, 1986; ALDERLIESTEIN et al., 1994; CHRONAKIS, 1998). Além disso já é relatado na literatura o uso da Mx combinado com o polietileno glicol (PEG) como um dos componentes na formação de fase em SAB (SZLAG et al., 1990; SILVA & MEIRELLES, 2000), com o propileno glicol (SILVA & MEIRELLES, 2001) e com um copolímero de etileno e óxido de propileno (BOLOGNESE et al., 2005), por ser um polímero de baixo custo, e com isso uma alternativa de facilitar a aplicação do processo em larga escala. No presente estudo as Mx foi utilizada para promover SAB juntamente com a acetonitrila, e posterior aplicação na extração da vanilina.

### 3.3.2 Solventes não-convencionais

#### 3.3.2.1. Cloreto de Colina

O cloreto de colina se enquadra como um solvente alternativo para a formação de SAB, pois é um solvente de natureza não tóxica, um reagente prontamente disponível, um cátion colina que faz parte do complexo B de vitaminas, definido como líquido iônico, ou seja, um sal quaternário de amônio assimétrico e que contém um grupo funcional polar que faz com que o ponto de congelamento seja reduzido. Além de se destacar por ser uma matéria-prima de baixo custo, biodegradável e de baixa toxicidade (PETKOVIC et al., 2010; KHAN et al., 2014; SILVA et al., 2014).

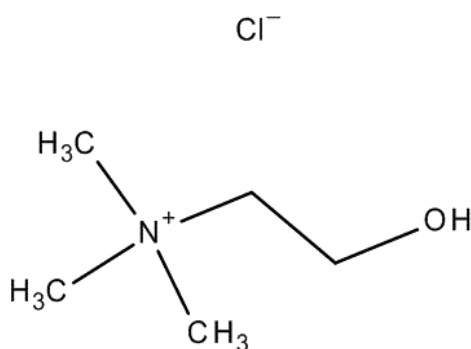
Recentemente publicações no que diz respeito a colina vem sendo realizadas, pois é um importante aditivo para ração animal, especialmente para frangos e peixes. Um composto que foi oficialmente reconhecido como nutriente essencial para o funcionamento do corpo em 1998 pelo Instituto de Medicina dos Estados Unidos (Institute of Medicine, 1998). O Instituto destaca que a colina é necessária para a síntese de neurotransmissor, sinalização de membrana

celular, transporte de lipídios, metabolismo metil-grupo e, além disso, desempenha papel importante no cérebro e desenvolvimento da memória ainda na fase fetal (ZEIZEL & COSTA, 2009). Algumas propriedades físicas químicas deste composto são retratadas na Tabela 4 e a estrutura química apresentada na Figura 8.

**Tabela 4:** Propriedades do cloreto de colina.

Propriedade	Valor
Massa Molar	139,624 g/mol
Formula Molecular	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub>
Solubilidade em Água	500 mg/ml
Ponto de Fusão	202-305 °C
Coeficiente Octanol-Água (logK <sub>ow</sub> )	-5,16
Doadores de Hidrogênio	1
Aceptores de Hidrogênio	2

**Fonte:** (OPEN CHEMISTRY DATABASE, 2017)

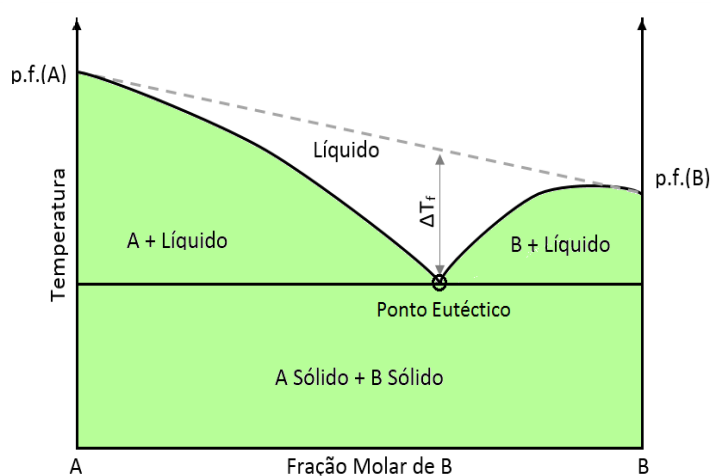


**Figura 8:** Estrutura química do cloreto de colina.

Santos et al. (2016) utilizou líquidos iônicos à base de colina para a recuperação de Capsaicina de *Capsicum frutescens*. Vários autores relatam diversas combinações com o cloreto de colina para síntese de DES quando combinada, com açúcares, ácidos carboxílicos, polióis, entre outros (FUKUMOTO et al., 2005; POLETTI et al., 2007; GORE et al., 2011; MUKHOPADHYAY et al., 2016; CRAVEIRO et al., 2016). O cloreto de colina foi utilizado individualmente pra a formação de SAB com a ACN e posterior aplicação na extração dos compostos fenólicos, também como na preparação dos DES, como acceptor de ligações de hidrogênio.

### 3.3.2.2 Solventes Eutéticos Profundos (DES)

O termo "eutético" é utilizado para descrever uma mistura de dois ou mais compostos que, a uma composição bem definida, a composição eutética exibe um ponto de fusão único e mínimo no diagrama de fases. O ponto de fusão mínimo é significativamente menor do que os pontos de fusão dos componentes individuais, e refletem as afinidades não covalentes a nível molecular. Estas interações levam à redução de energia caracterizada por uma redução do ponto de fusão da mistura (ABBOTT et al., 2007). Na Figura 9 encontra-se um exemplo de um diagrama de fases de dois componentes e o respectivo ponto eutético da mistura.

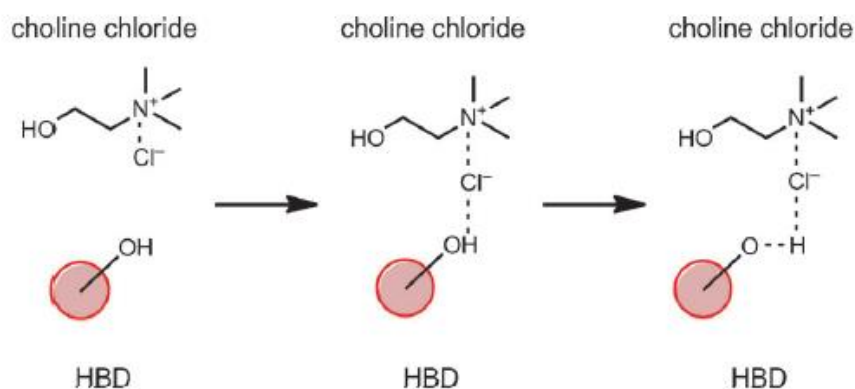


**Figura 9:** Representação esquemática do ponto eutético de um diagrama de fases de dois componentes.  
**Fonte:** (SINGH et al., 2012).

Abbott et al. (2003) reportaram o DES (do inglês deep eutectic solvents), um solvente fundamentado no ponto eutético de uma mistura, como um novo tipo de solvente com vantagens adicionais aos solventes existentes: uma mistura sustentável, biodegradável e com um grande número de variantes que podem ser produzidos a partir de materiais prontamente disponíveis. O primeiro DES proposto era constituído por ChCl e ureia na proporção molar de 1:2 de aceptor de ligação de hidrogênio (HBA) e doador de ligação de hidrogênio (HBD), respectivamente. As ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals* entre os dois constituintes do DES, o doador de ligação de hidrogênio (HBD) e o aceptor de ligação de hidrogênio (HBA), são a principal força motriz deste fenómeno. Estas interações evitam a cristalização do composto inicial, resultando em misturas no estado líquido (JHONG et al., 2009). Na Figura 10, pode-se observar um exemplo do estabelecimento de ligações entre um HBA (cloreto de colina) e um



HBD, onde o íon cloreto do HBA irá ligar-se ao hidrogênio do grupo funcional, OH, do HBD por meio de uma ponte de hidrogênio (HAYYAN et al., 2013).



**Figura 10:** Exemplo da formação de um solvente eutético.

Fonte: (HARRIS, 2009).

O DES podem ser sintetizados a partir de materiais de baixo custo, prontamente disponíveis e toxicologicamente bem caracterizados (MORRISON et al., 2009; ZHANG et al., 2012). As combinações entre o HBA e HBD permitem adaptar as propriedades físicas e a natureza química do DES (GARC et al., 2015).

Do ponto de vista da Química Verde, os DES são ainda mais atraentes que a maioria dos líquidos iônicos, uma vez que grande parte dos DES têm vantagens como vasta gama de líquidos, compatibilidade com água, baixa pressão de vapor, não inflamabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, a síntese dos DES possui uma economia de átomos de 100% (não se perde átomos na síntese, um componente doa e o outro aceita) e uma das suas características mais benéficas é a sua fácil preparação, podem ser formados simplesmente misturando os materiais de partida a temperaturas moderadas, sem necessidade de purificação adicional, viabilizando assim a sua utilização em larga escala (FLORINDO et al., 2014).

DES são geralmente considerados não-tóxicos e biodegradáveis com base nas propriedades dos seus componentes individuais, porque são compostos de sais de amônio e as espécies HBD, que são considerados ecológicos (WEN et al., 2015; NASER et al., 2016). Mais recentemente Radosevic et al. (2015) avaliaram DES baseados em  $\text{ChCl}$  quanto à toxicidade *in vitro* usando linhagens celular de peixes e humanos, fitotoxicidade usando trigo e biodegradabilidade usando microrganismos de águas residuais através de teste de garrafa fechada e concluíram que os DES testados possuem uma citotoxicidade baixa a moderada,

possuem baixa fitotoxicidade, foram classificados como "prontamente biodegradáveis" e que ambos têm um potencial perfil verde e uma boa perspectiva para uso mais amplo. Por todas suas propriedades mais benéficas que outros solventes voláteis convencionais e líquidos iônicos, estes são considerados uma melhor alternativa (AHMAD et al., 2011). Adicionalmente, parece provável que os materiais de partida do DES sejam facilmente recuperáveis rompendo ou alterando estruturas complexas em sua matriz. Esta recuperabilidade pode ser atribuída à inexistência de reações químicas durante a sua formação (FRANCISCO et al., 2013).

O primeiro artigo sobre DES foi publicado em 2001 e na última década tem havido uma grande evolução neste campo. Têm sido utilizados em numerosos processos químicos como em reações orgânicas (IMPERATO et al., 2005; ILGEN et al., 2009; GORE et al., 2011) extrações orgânicas (ABBOTT et al., 2009), eletroquímica (NKUKU et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2009) e reações enzimáticas realizadas a 60 °C (GORKE et al., 2008).

Mais recentemente DES baseado em cloreto de colina e álcoois foram aplicados na formação de SAB quando combinado com sais inorgânicos para extração de proteínas e obtiveram uma eficiência de extração de 98,71 % da albumina de soro bovino na fase rica em DES, em uma extração de passo único sob as condições otimizadas, aplicaram com estas mesmas condições na extração da tripsina e obtiveram alta eficiência de extração com 94,36 % (XU et al., 2015). Li et al. (2016) utilizou DES baseado em betaína para formação de SAB com solução de fosfato e aplicação na extração de proteínas.

Estes novos compostos contêm materiais de origem natural, tais como ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares, colina e ureia (NASER et al., 2016). Entre as mais diversas combinações, o cloreto de colina está presente no topo da lista de HBA como um constituinte natural para DES (FRANCISCO et al., 2013). Choi et al. (2011) relataram a descoberta de 30 combinações com cloreto de colina, ácidos carboxílicos naturais, diferentes açúcares e até mesmo água, que formavam DES.

### 3.3.3 Acetonitrila

A acetonitrila (ACN) é um composto orgânico translúcido, inflamável, com temperaturas de fusão e ebulição de -45 °C e 81,6 °C, respectivamente. Um solvente aprótico, com polaridade média, miscível em água, metanol, acetatos de metila e etila, acetona, éter etílico, hidrocarbonetos insaturados, clorofórmio, tetracloreto de carbono e cloreto de vinila a temperaturas próximas da temperatura ambiente (ZHANG et al., 2011). Produzida industrialmente pela desidratação da acetamida ou pela reação entre acetileno e amônia,

entretanto sua principal rota de produção, dar-se pela amoxidação da acroleína (processo industrial utilizado na produção de nitrilas utilizando amônia e oxigênio), para a qual um precursor pode ser utilizado sob condições específicas para que a quantidade de ACN produzida seja pelo menos o dobro da quantidade de acrilonitrila (TAKAMUKU et al., 1998).

Um composto largamente utilizado na síntese orgânica de amins, amidas, cetonas, aldeídos e uma variedade de outros compostos, nas indústrias de cosméticos, borracha, pesticidas e produtos farmacêuticos e usada principalmente como fase móvel para separação de compostos, especialmente por cromatografia líquida, em função de suas propriedades físico-químicas favoráveis como a baixa viscosidade, alta resolução, baixo ponto de ebulição, baixa absorção de luz ultravioleta e alta miscibilidade com solventes apolares e água (SADEK, 2002; NEMATI & SHEKAARI, 2013).

Na literatura está relatado o seu uso para formação de SAB combinado com diversos outros compostos, tais como carboidratos (DHAMOLE et al., 2010; CARDOSO et al., 2013), polissacarídeos (CARDOSO et al., 2014b), polióis (CARDOSO et al., 2014a), polivinil álcool (CARDOSO et al., 2015) e líquidos iônicos (OKANO et al., 2013; SANTOS et al., 2016) para extração e purificação de diferentes biomoléculas de interesse industrial. O uso deste solvente no SAB possibilita rendimentos similares ou superiores aos solventes tradicionais (SANTOS et al., 2010).

## **Introdução aos capítulos 4 e 5**

Os capítulos 4 e 5 estão apresentados em forma de artigos científicos. No capítulo 4 o artigo está organizado conforme as normas propostas pelo periódico que foi publicado e suas figuras e ilustrações se encontram no apêndice A. No capítulo 5 o artigo está apresentado nas normas propostas pelo periódico a que será submetido para sua publicação. Estes capítulos são compostos por pequenas introduções, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e suas discussões, bem como as conclusões observadas.

No primeiro artigo (Capítulo 4 – “Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies. Este artigo foi publicado no periódico “Fluid Phase Equilibria”

O segundo artigo (Capítulo 5 – “Phenolic Compounds Partitioning in Aqueous Two-Phase System based on Acetonitrile + Deep Eutectic Solvents + Water. Este artigo será submetido no periódico “ACS Sustainable Chemistry & Engineering”

## Capítulo 4

### **Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies**

Isabela N. Souza<sup>a</sup>, Cleide M. F. Soares<sup>a,b</sup>, Ranyere L. Souza<sup>a,b</sup>, Mara G. Freire<sup>c</sup>, Álvaro Silva Lima<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brazil

<sup>c</sup>CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

\*corresponding author

E-mail: alvaro\_lima@itp.org.br; Phone: +55 7932182115; Fax: +55 7932182190.

## Abstract

Novel aqueous two-phase systems (ATPS) formed by water, acetonitrile and maltodextrin with different dextrose equivalent values (DE) are here described and characterized. The respective ternary phase diagrams were determined at 298.15 K. It was found that ATPS formed by maltodextrin and acetonitrile require lower amounts of phase forming-components to undergo liquid-liquid demixing than similar systems formed by mono- and disaccharides. To evaluate the ability of these systems as extraction strategies, experiments with vanillin were carried out. Conditions such as DE and concentration of maltodextrin, concentration of acetonitrile, and temperature were evaluated. In all the investigated systems, vanillin partitions preferentially to the top phase – acetonitrile-rich phase - with a partition coefficient ( $K_{\text{van}}$ )  $\gg 1$ . The best conditions for vanillin partitioning to this phase were obtained using maltodextrin DE 16.5-19.5 at 35 wt% + acetonitrile at 35 wt% + water at 30 wt%, at 308.15 K, for which  $K_{\text{van}}$  and recovery in top phase ( $R_T$ ) was 12.4 and 91.8, respectively. The temperature has no statistical influence in the vanillin partitioning. According to the data gathered at different temperatures, it was found that the vanillin partitioning process is spontaneous, endothermic and governed by entropic forces. Finally, the density and viscosity of the studied aqueous two-phase system (ATPS) coexisting phases were determined, showing significant differences in viscosity and density between the phases, which is highly beneficial for phase separation and scaled-up applications.

**Key words:** maltodextrin; acetonitrile; aqueous two-phase system; vanillin; separation.

## 1. Introduction

Maltodextrins (Mx) are a class of biopolymers (molecular weight between 900 and 18000 Da) highly soluble in water, and obtained from thermic, enzymatic and/or acid hydrolysis of starch. These compounds are formed by D-glucose units linked by 1-4-glucosidic bonds, with the number of reducing sugar content described as the dextrose equivalent value – DE, which may range from 3 to 20. For instance, the starch DE is zero, while glucose DE is 100 [1,2]. These biopolymers are employed in cosmetic, pharmaceutical and food industries, mainly due to their film forming ability, to enhance the rheological properties of pastes and gels, and to retard the crystallization and decrease the hygroscopy of a mixture. As a result, maltodextrins are able to improve the shelf-life stability of food matrices. Furthermore, maltodextrins are odor-, color- and tasteless, and for this reason are also employed as encapsulating agents and as additives for the elaboration of bio-based materials [3-5].

Maltodextrins can be additionally used as a constituent of aqueous two-phase systems (ATPS), mainly to replace the more expensive dextran [6,7]. ATPS are formed when two water-soluble compounds are mixed in water over certain concentrations, resulting in two liquid phases, a top and a bottom aqueous-rich phase [8]. This technique is widely investigated in the purification of proteins [9], enzymes [10], anthocyanins [11], alkaloids [12], flavors [13,14], antimicrobial agents [15] and antibodies [16]. Furthermore, it was also investigated as a simultaneous extraction-purification platform for pesticides [17] and endocrine disruptors [18].

The main advantages of ATPS over other purification and concentration protocols are attributed to their high water content, low interfacial tension, scaling up feasibility, and recycling capability [8,19,20]. Several compounds combinations in water are able to form ATPS, such as polymers [21,22], inorganic salts [23,24], carbohydrates [25], ionic liquids [26], amino acids [27], organic solvents such as alcohols [13], tetrahydrofuran [28] and acetonitrile [29,30].

Acetonitrile (ACN) is an aprotic, colorless, and water-soluble polar solvent [31]. This two-carbon aliphatic nitrile is also known as cyanomethane or methyl-cyanamide, whose molecular structure is  $\text{CH}_3\text{CN}$ . ACN is a widely employed solvent in chromatography [32], and in the cosmetic and pharmaceutical industries [33]. Based on its properties, this work addresses the identification and characterization of ATPS based on acetonitrile and maltodextrin combinations. The respective ternary phase diagrams were determined at 298.15 K. To explore the feasibility of these systems to act as extraction strategies, the vanillin partitioning was

investigated. The effects of DE of maltodextrin, concentration of phase-forming components and temperature were investigated. Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) was chosen because it is widely used as flavoring in foods, beverages, cosmetics and drugs [34]. Moreover, this natural compound is extracted together with other biomolecules from vanilla (*Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitiensis*, and *Vanilla pompon*), for which alternative cost-effective purification platforms need to be explored.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Materials

The maltodextrins (Mx) with different dextrose equivalent (DE) values (Mx 13-17 (product number 419680) and Mx 16.5-19.5 (product number 419699)) were purchased from Sigma-Aldrich, and used without prior purification. Vanillin (purity > 99 wt%) and acetonitrile (HPLC grade 99.9 wt%) were also acquired from Sigma-Aldrich. The chemical structures of the ATPS phase-forming components and vanillin are shown in Figure 1 (Table DB1 in Data in Brief). Distilled and deionized water was used in all experiments.

### 2.2. Phase diagrams

Aqueous solutions of maltodextrin (40 wt%) and acetonitrile (80 wt%) were initially prepared. The experimental binodal curves data were determined gravimetrically ( $\pm 10^{-4}$  g) by the cloud point method at  $(298.15 \pm 1.00)$  K and  $(0.10 \pm 0.01)$  MPa as previously established in our works [11,12,28]. The drop-wise addition of acetonitrile was carried out to the maltodextrin solution until turbidity detection (biphasic area). Then, water was drop-wise added to the system to perform it clear (monophasic system). The procedure was accomplished under constant magnetic stirring and was repeated until no two-phase formation was detected. The experimental binodal curves were correlated using the Eq. (1) [35].

$$[\text{ACN}] = A \times \exp(B \times [\text{Mx}]^{0.5} - C \times [\text{Mx}]^3) \quad (1)$$

where [Mx] and [ACN] are the maltodextrin and acetonitrile mass fraction percentage, and *A*, *B* and *C* are constants obtained by the regression of experimental data.



### 2.3. Vanillin Partitioning

The partition behavior of vanillin in the studied systems was determined in ternary ATPS composed of Mx, ACN and water, at mixture compositions selected at the biphasic region, and optimized by changing the dextrose equivalent of maltodextrin (13-17 and 16.5-19.5), maltodextrin concentration (15 – 35 wt%), ACN concentration (20 – 35 wt%) and temperature (278.15 – 308.15 K). Appropriate amounts of the system constituents were weighted in graduated centrifuge tubes to form 10 g of total ATPS, each containing 0.75 mg of vanillin. The mixture was vortexed and the phase separation promoted by centrifugation (3000 rpm for 10 min at each temperature of interest) using a Hettich – Universal 320R centrifuge. The systems were then left in a thermostatic bath (Marconi MA-127, Piracicaba-SP, Brazil) for at least 12 h to reach the equilibrium at the desired temperature. All tubes were sealed to avoid ACN vaporization. The two phases were carefully withdrawn using a pipette for the top phase and a syringe with a long needle for the bottom phase. Their weights and volumes were determined.

The concentration of vanillin at each aqueous phase was quantified through UV-spectroscopy, using a Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrophotometer, at a wavelength of 280 nm in triplicate to obtain in the final average concentration, partition coefficient and recovery, with the associated standard deviation, using a calibration curve previously established. At the concentration of vanillin used, dilutions in the order of 1:50 (v:v) were carried out in deionized water. At these dilutions, there are no interferences by the phase-forming components at 280 nm in the quantification of vanillin. Therefore, no blanks were needed for the vanillin quantification at the dilutions carried out [36].

The partition coefficients ( $K_{\text{van}}$ ) were determined according to Eq. (2):

$$K_{\text{van}} = \frac{C_{\text{T}}}{C_{\text{B}}} \quad (2)$$

where C is the concentration of vanillin ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and the subscripts T and B correspond to the top and bottom phase, respectively.

The vanillin recovery in top phase ( $R_{\text{T}}$ ) was also determined, according to Eq. (3):

$$R_{\text{T}} = \frac{100}{1 + 1/(K_{\text{van}} \times R_{\text{V}})} \quad (3)$$

where  $R_V$  is the volume ratio between the volume of the top phase ( $V_T$ ) and the volume of the bottom phase ( $V_B$ ).

Each ATPS was prepared at least in triplicate, allowing to establish the average and the associated standard deviation of the vanillin partition coefficient and recovery at the top phase. It should be remarked that the top phase corresponds to the ACN-rich phase, whereas the Mx-enriched phase corresponds to the bottom phase.

The standard molar Gibbs free energy of transfer ( $\Delta_{tr}G_o^m$ ), the standard molar enthalpy of transfer ( $\Delta_{tr}H_o^m$ ) and standard molar entropy of transfer ( $\Delta_{tr}S_o^m$ ) associated to the vanillin partition process, from the Mx- to the ACN-rich phase, were determined by the van't Hoff approach at different temperatures (from 278.15 to 308.15 K). The following isochors were used to determine the molar thermodynamic functions of transfer (Eq. 4)

$$\Delta_{tr}G_m^o = \Delta_{tr}H_m^o - T \times \Delta_{tr}S_m^o = -RT \ln(K_{van}) \quad (4)$$

where  $T$  is the temperature (K) and  $R$  is the ideal gas constant. The enthalpy and entropy contributions can be directly deduced from the linear approximation of  $\ln(K_{van})$  versus  $T^{-1}$ .

#### 2.4. Density and viscosity of the ATPS coexisting phases

The density and viscosity of the top and bottom phases were determined at different temperatures (283.15 – 343.15 K), with an uncertainty of  $\pm 0.02$  K, using an automated SVM 3000 Anton Paar rotational Stabinger viscosimeter-densimeter, which was previously calibrated using standards solutions. The kinematic viscosity had a relative uncertainty of 0.35%, while the absolute uncertainty of density is  $5 \times 10^{-4}$  g.cm<sup>-3</sup>.

### 3. Results and Discussion

For the suitable application of ATPS in purification processes, it is necessary the prior knowledge of the respective ternary phase diagrams, mainly to address the mixtures compositions required to form two-phase systems, and equilibrium data on the target biomolecule partitioning between the phases. In this work, the phase diagrams of novel ATPS based on acetonitrile and maltodextrin with different values of dextrose equivalent (13-16 and 16.5-19.5) were determined at  $(298.15 \pm 1.00)$  K. These systems were then evaluated in terms of their extraction performance for vanillin, for which the effects of the dextrose equivalent value, the concentrations of acetonitrile and maltodextrin, and temperature were appraised.

### 3.1. Phase Diagrams

The experimental solubility data (weight fraction) of the ternary systems formed by water, maltodextrin and acetonitrile are given in the Data in Brief (Table DB2), whereas their representation is shown in Figure 2. This figure also has solubility/binodal curves data for ATPS formed by ACN and other carbohydrates, such as a monosaccharide (D-glucose), a disaccharide (sucrose), and a polysaccharide (dextran, molecular weight of 6,000 and 100,000 Da) for comparison purposes. In Figure 2 the respective binodal curves are presented, for which compositions above each binodal curve lead to the formation of two-phase systems, whereas mixture compositions below result in the formation of monophasic mixtures. In the orthogonal representation given, the amount of water is omitted, corresponding to the content required to reach 100 wt% of a given mixture composition.

Carbohydrates with low molecular weight ( $M_w$ ), namely monosaccharides like glucose ( $M_w = 180 \text{ g.mol}^{-1}$ ) and disaccharides like sucrose ( $M_w = 342 \text{ g.mol}^{-1}$ ), have a low two-phase formation ability (small biphasic regime in the phase diagram) when compared to heavier carbohydrates. On the other hand, dextrans appear as the more efficient species to lead to ATP formation. ATPS formed by maltodextrins display a biphasic area size between those display by sucrose and dextran, meaning that they display an intermediate ability to create two-phase systems with ACN. It was already demonstrated that the increase in the molecular weight of carbohydrates, e.g. mono- and disaccharides, increases the ATPS formation ability [37]. This finding is also true for polysaccharides, such as observed with dextrans (e.g.,  $M_w = 6000$  versus 100000 Da) [38]. Furthermore, an increase in the  $M_w$  of saccharides usually represents an increase in the number of hydroxyls group and in the ability of these species to establish hydrogen-bonds with water [39]. Overall, in all of these ATPS, the carbohydrates act as the salting-out species, leading to the exclusion of acetonitrile towards the opposite phase.

The maltodextrins molecular weight is inversely proportional to the dextrose equivalent value. According to Gregson and co-workers [40], maltodextrins with DE values between 5 and 18 ranged the  $M_w$  between 2446-1031 Da (maize), 2895-968 Da (*tapioca* – a Brazilian starch product) and 2261-1017 Da (maize from Cargil). Assuming the correlation between  $M_w$  and DE values, and the average DE values of the maltodextrins used in the present work (Mx 13-17 - average 15, and Mx 16.5-19.5 - average 18), it was determined the theoretical  $M_w$  of the studied maltodextrins, which correspond to 1197 Da and 1003 Da, respectively (Figure DB1 of Data in Brief). These  $M_w$  are significantly lower than those of the dextrans shown in Figure 2, thus supporting the Mx lower capacity to create ATP with ACN. Furthermore, the binodal

curves corresponding to APTS formed by ACN and maltodextrin do not show significant differences because their molecular weights are indeed very close to each other, and consequently with a similar number of hydroxyl groups.

All the binodal curves experimental weight fraction data were fitted using Eq. (1) – correlations shown in Figure DB2 in the Data in Brief. The respective parameters were estimated by the least-squares regression method. These parameters ( $A$ ,  $B$  and  $C$ ), and the corresponding standard deviations ( $\sigma$ ) and regression coefficients ( $R^2$ ) are reported in Table 1. Good correlation coefficients (0.994-0.997) were obtained for both systems containing maltodextrins.

### 3.2. Partitioning of Vanillin

The application of the novel APTS in the separation of vanillin was studied by evaluating the effect of dextrose equivalent of maltodextrin, concentration of maltodextrin and acetonitrile, and temperature on the partition coefficient and recovery of vanillin in the top (ACN-rich) phase. The top phase or acetonitrile-rich phase ( $\log K_{ow}$  of ACN = -0.17) ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)) is more hydrophobic than the bottom phase or maltodextrin-rich phase in ( $\log K_{ow}$  of Mx = -3.24) ([www.guidechem.com](http://www.guidechem.com)), thus favoring the preferential migration of vanillin ( $K_{ow} = 1.19$ ) [41] to the acetonitrile-rich phase, and as observed in all investigations discussed below.

The results showing the effect of DE of maltodextrin in the vanillin partitioning behavior are given in Figure 3 (detailed data given in Table DB3 in the Data in Brief), both in  $K_{van}$  and  $R_T$  at 298.15 K. These results correspond to an APTS formed by 25 wt% of Mx and 35 wt% of ACN at 298.15 K. The  $K_{van}$  obtained range from  $5.9 \pm 0.7$  (with DE 13-17) to  $7.6 \pm 0.1$  (with DE 16.5-19.0), while the recovery of vanillin in the top phase only undergoes a slight increase from  $85 \pm 1\%$  to  $87.8 \pm 0.8\%$  with the DE increase. Therefore, vanillin preferentially migrates to the ACN-rich phase, which may be also a result of the salting-out effect exerted by the saccharide. Given the results obtained, in the following experiments it was used maltodextrin with DE 16.5-19.5.

Figure 4 (detailed data given in Table DB4 in the Data in Brief) depicts the influence of maltodextrin concentration (from 15 to 35 wt%) with Mx with a DE 16.5-19.5 in the partition coefficient and recovery of vanillin in the APTS top phase at 298.15 K. In this study, the ACN concentration was kept at 35 wt%. In general, an increase in the maltodextrin concentration

favors the partition of vanillin to the opposite phase, which again justifies the saccharide salting-out aptitude. The  $K_{\text{van}}$  increases from  $2.58 \pm 0.06$  (Mx at 15 wt%) to  $12.2 \pm 0.5$  (Mx at 35 wt%), while the vanillin recovery in top phase reached  $91.6 \pm 0.1$  % at a concentration of maltodextrin of 35 wt%

In order to evaluate the influence of the acetonitrile concentration in the vanillin partitioning, experiments were carried out using ATPS formed by Mx 16.5-19.15 at 35 wt% + ACN at concentrations ranging from 20 – 30 wt%, at 298.15 K and 0.10 MPa. The results obtained are depicted in Figure 5, and given in Table DB5 in the Data in Brief. As observed with Mx, an increase in the ACN concentration leads to an increase in the partition coefficient and recovery of vanillin in the top phase, reaching maximum values of  $12.2 \pm 0.5$  and  $91.6 \pm 0.5$  %, respectively. This trend is associated with the vanillin hydrophobic character and increased phase hydrophobicity as the ACN content increases.

Amongst the several conditions evaluated, the ATPS constituted by Mx 16.5-19.5 (at 35 wt%) + acetonitrile (at 35 wt%) + water (30 wt%) was identified as the best system to enrich vanillin at the acetonitrile-rich phase. Therefore, this ATPS composition was used to appraise the effect of temperature (from 278.15 to 308.15 K) in the vanillin partitioning and related thermodynamic functions of transfer. The results obtained are presented in Figure 6 (detailed data given in Table DB6 in the Data in Brief). The temperature has a neglected effect on the partitioning of vanillin, which ranged from  $11.8 \pm 0.5$  (278.15 K) to  $12.4 \pm 0.8$  (308.15 K). Furthermore, the recovery of vanillin in the top phase is also not sensitive to temperature variations, at least at the temperatures investigated, ranging between  $91.7 \pm 0.2$  % (278.15 K) and  $91.8 \pm 0.6$  % (308.15 K). Similar results were observed by Lima and co-workers [38] for ATPS based on dextran 100,000 (18 wt%) and acetonitrile (30 wt%).

The thermodynamic parameters of transfer, such as the standard molar Gibbs energy ( $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m}}^{\circ}$ ), enthalpy ( $\Delta_{\text{tr}}H_{\text{m}}^{\circ}$ ) and entropy ( $\Delta_{\text{tr}}S_{\text{m}}^{\circ}$ ) of transfer, were additionally determined to better understand the partition process of vanillin (results given in Figure DB3 in the Data in Brief). The vanillin partitioning to the acetonitrile-rich phase using the studies ATPS is favorable ( $\Delta_{\text{tr}}G_{\text{m}}^{\circ} < 0$ , namely  $-6.20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), and the transference of vanillin is an endothermic process ( $\Delta_{\text{tr}}H_{\text{m}}^{\circ} > 0$ , namely  $1.11 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). The  $\Delta_{\text{tr}}S_{\text{m}}^{\circ}$  of vanillin is  $24.52 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$  and  $T \times \Delta_{\text{tr}}S_{\text{m}}^{\circ}$  is higher than  $\Delta_{\text{tr}}H_{\text{m}}^{\circ}$ , meaning that entropic contributions have an important role in the partitioning process.

The vanillin partitioning in systems based on monosaccharides (glucose), disaccharides (sucrose) or polysaccharides (dextran and maltodextrin) and ACN at 298.15 K and 0.10 MPa

are compared in Figure 7 (detailed data given in Table DB7 in the Data in Brief). In all cases, vanillin preferentially migrates to the top phase (ACN-rich phase), and the highest values of partition coefficient (12.2) and recovery of vanillin (91.6 %) were found using ATPS formed by maltodextrin, proving that the systems disclosed in this work display a better extraction performance for vanillin than those previously studied [37,38].

Other ATPS were investigated in the vanillin partitioning. Coutinho and co-workers [36] employed ionic liquids +  $K_3PO_4$ , and observed that the vanillin concentration influences its partitioning, and for the conditions closest to this work (vanillin concentration of  $1 \text{ g.dm}^{-3}$ ) the  $K_{\text{van}}$  was 44.98 using the IL 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [ $C_4\text{mim}$ ]Cl. Mozafari and co-workers [42] studied the vanillin partitioning in systems formed by cholinium chloride and  $K_3PO_4$ , with the vanillin again migrating to the ionic-liquid-rich phase ( $K_{\text{van}} = 11.4 \pm 0.5$ ; recovery =  $93.5 \pm 0.2 \%$ ). ATPS formed by alcohols and potassium phosphate were also investigated in the vanillin partitioning, with the best  $K_{\text{van}}$  ( $430 \pm 46$ ) and  $R_T$  ( $99.93 \pm 0.01\%$ ) found for ethanol +  $K_2HPO_4$  systems [13]. Still, in all these works, strong salting-out inorganic salts were used, favoring thus the vanillin partitioning to the opposite phase.

### 3.3. Density and Viscosity of the ATPS Coexisting Phases

In the previous section, it was demonstrated that the best conditions to enhance the vanillin partitioning to the top phase occurs with the ATPS composed of maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) + acetonitrile (35 wt%) + water (30 wt%). Therefore, this mixture composition was used to additionally determine the density and viscosity of the coexisting phases at different temperatures to better characterize these systems when their scale-up application is envisaged. When the difference of densities between the phases is high, the phase separation is improved; furthermore, low viscosities favor mass transfer and reduce energetic inputs [43].

According to Puig and co-workers [44] density and viscosity are important characteristics of fluids, moreover the authors report that density decrease linearly with increasing temperature:

$$\rho = a + bT \quad (5)$$

where  $\rho$  is the density,  $T$  is the temperature absolute,  $a$  and  $b$  are the linear parameters.

While the viscosity represent the resistance offered by a fluid to flow and it can be described by means of the Arrhenius equation:

$$\eta = A_1 \times \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (6)$$

where  $\eta$  is the kinematic viscosity,  $A_1$  is a constant,  $E_a$  is the activation energy for flow,  $R$  is the ideal universal gas constant and  $T$  is the temperature absolute.

Dokic and co-workers also observed that the viscosity of aqueous solution of maltodextrin changed with the temperature according to Arrhenius equation [45].

Figure 8 (detailed given in Table DB8 in the Data in Brief) depicts the density and viscosity profile of the coexisting phases (top and bottom) for the studied ATPS at different temperatures. The parameters  $a$  and  $b$  (density), and  $A_1$  and  $E_a$  (viscosity) are shown in Table 2.

The exponential and linear trends of viscosity and density, respectively, along temperature are consistent with the traditional behavior of these properties in ATPS. The viscosity and density of the top phase range between  $2.72 \times 10^{-7} - 6.70 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $0.213 - 0.566 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ) and  $0.783 - 0.844 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , respectively, and in the bottom phase range between  $1.71 \times 10^{-5} - 3.51 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $20.41 - 439.20 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ) and  $1.196 - 1.236 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Compared to other studied ATPS, for instance formed by polymers and salts [46] or ionic liquids and salts [43], and although the Mx-rich phase displays a high viscosity, the ACN-rich phase displays a significantly lower viscosity, being this the phase in which the target vanillin molecule is enriched. Furthermore, there is a larger difference in the densities of the coexisting phases of the ATPS based on ACN + Mx when compared to ATPS formed by polymers and salts [46] or ionic liquids and salts [43], which is highly for phase separation [47].

#### 4. Conclusions

Novel ATPS constituted by acetonitrile and maltodextrin of different value of dextrose equivalents are here shown to occur, and were characterized in terms of phase diagrams and extraction performance. Maltodextrins with a DE 13-17 and 16.5-19.5 form ATPS with acetonitrile, and are of better performance than mono- and disaccharides in what concerns the phase-forming components contents required to form ATPS. Vanillin was investigated as a model biomolecule, for which the ATPS extraction ability was studied by the evaluation of the effect of the DE value, maltodextrin and acetonitrile concentration, and temperature. The best system and operational conditions studied lead to a  $K_{\text{van}}$  of  $12.4 \pm 0.8$  and  $R_T$  of  $91.8 \pm 0.6 \%$ . These values are higher than those observed in previous works reporting on the use of ATPS formed by ACN and monosaccharides, disaccharides or a different polysaccharide (dextran).

By addressing the thermodynamic functions of transfer of vanillin, it was found that its partition is spontaneous, endothermic and governed by entropic forces. Finally, the density and viscosity of the studied ATPS coexisting phases were determined showing that the differences in viscosity and density between the phases are significant, which is highly beneficial for phase separation and scaled-up applications.

## Acknowledgements

This work was supported financially by research grants from *Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado* (FAPITEC) and CAPES for the scholarship of I.N. Souza. This work was developed in the scope of the project CICECO–Aveiro Institute of Materials, POCI-01-0145-FEDER-007679 (Ref. FCT UID/CTM/50011/2013), financed by national funds through Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal)/MEC, and co-financed by FEDER under the PT2020 Partnership agreement.

## References

- [1] Y.J. Wang, L. Wang, Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches, *Starch*. 52 (2000) 296–304.
- [2] I.S. Chronakis, On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review, *Food Sci. Nutr.* 38 (1998) 599–637.
- [3] N. Castro, V. Durrieu, C. Raynaud, A. Rouilly, Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes, *Carbohydr. Polym.* 144 (2016) 464–473.
- [4] F. Lai, I. Franceschini, F. Corrias, M.C. Sala, F. Cilurzo, C. Sinico, E. Pini, Maltodextrin fast dissolving films for quercetin nanocrystal delivery. A feasibility study, *Carbohydrate Polymers*. 121 (2015) 217–223.
- [5] L. Juszczak, D. Gałkowska, T. Witczak, T. Fortuna, Effect of maltodextrins on the rheological properties of potato starch pastes and gels, *Int. J. Food Sci.*, 2013 (2013) 1–7.
- [6] B. Bolognese, B. Nerli, G. Picó, Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 347–353.



- [7] L.H.M. Silva, A.J.A. Meirelles, Bovine serum albumin,  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous-two-phase systems, *Carbohydr. Polym.* 42 (2000) 279–282.
- [8] N. Li, Y. Wang, K. Xu, Y. Huang, Q. Wen, X. Ding, Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein, *Talanta*, 152 (2015) 23–32.
- [9] X. Ding, Y. Wang, Q. Zeng, J. Chen, Y. Huang, K. Xu, Design of functional guanidinium ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient purification of protein, *Anal. Chim. Acta* 815 (2014) 22–32.
- [10] R.L. Souza, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems, *Green Chem.* 17 (2015) 3026–3024.
- [11] A.S. Lima, C.M.F. Soares, R. Paltram, H. Halbwirth, K. Bica, Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions, *Fluid Phase Equilibr.* 451 (2017) 68–78.
- [12] W. Zhang, D. Zhu, H. Fan, X. Liu, Q. Wan, X. Wu, P. Liu, J.Z. Tang, Simultaneous extraction and purification of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. by microwave-assisted aqueous two-phase extraction with ethanol/ammonia sulfate system, *Sep. Purif. Technol.* 141 (2015) 113–123.
- [13] I.A.O. Reis, S.B. Santos, L.A. Santos, N. Oliveira, M.G. Freire, J.F.B. Pereira, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds, *Food Chem.* 135 (2012), 2453–2461.
- [14] M. Rito-Palomares, A. Negrete, E. Galindo, L. Serrano-Carreón, Aroma compounds recovery from mycelial cultures in aqueous two-phase processes, *J. Chromatogr. B* 743 (2000) 403–408.
- [15] C.F.C. Marques, T. Mourão, C.M.S.S. Neves, A.S. Lima, I. Boal-Palheiros, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire, Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and sodium carbonate as enhanced routes for the extraction of tetracycline, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 645–654.
- [16] I. Campos-Pinto, E. Espita-Saloma, A.S.L. Rosa, M. Rito-Palomares, O. Aguilar, M. Arevalo-Rodriguez, R. Aires-Barros, A.M. Azevedo, Integration of cell harvest with affinity-enhanced purification of monoclonal antibodies using aqueous two-phase systems with a dual tag ligand, *Sep. Purif. Technol.* 173 (2017) 129–134.

- [17] K.M. Sousa, G. Maciel, F.S. Buarque, A.J. Santos, M.N. Marques, E.B. Cavalcanti, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran + carbohydrates + water: Equilibrium data and partitioning experiments, *Fluid Phase Equilibr.* 433 (2017) 1-9.
- [18] H. Passos, A.C.A. Sousa, M.R. Pastorinho, A.J..A. Nogueira, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire, Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluid. *Anal. Methods*, 4 (2012) 2664–2667.
- [19] Y. Lu, T. Hao, S. Hu, J. Han, Z. Tan, Y. Yan, Measurement and correlation of phase diagram data for acetone and sulfate aqueous two-phase systems at different temperatures, *Thermochim. Acta* 568 (2013) 209–217.
- [20] G.A. Borges, A.P. Silva, J.A. Penido, L.R. Lemos, A.B. Mageste, G.D. Rodrigues, A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: Effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater, *J. of Environ. Manage.* 183 (2016) 196–203.
- [21] L.H.M. Silva, W. Loh, Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran), *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069–10073.
- [22] A.D. Diamond, J.T. Hsu, Protein partitioning in PEG/dextran aqueous two-phase systems, *AIChE J.* 26 (1990) 1017–1024.
- [23] M. González-Amado, E. Rodil, A. Arce, A. Soto, O. Rodriguez, The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate aqueous two phase systems, *Fluid Phase Equilibr.* 428 (2016) 95–101.
- [24] R.L. Souza, J.M.P. Barbosa, G.M. Zanin, M.W.N. Lobao, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 16 (2010) 288–300.
- [25] Y. Chen, Y. Meng, S. Zhang, Y. Zhang, X. Liu, J. Yang, Liquid–liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 3612–3616.
- [26] T. Wang, C.B. Gu, S.X. Wang, P. Kou, J. Jiao, Y.J. Fu, Simultaneous extraction, transformation and purification of psoralen from fig leaves using pH-dependent ionic liquid solvent based aqueous two-phase system, *J. Clean. Prod.* 172 (2018) 827–836.
- [27] E.C. Capela, M.V. Quental, P. Domingues, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire, Effective separation of aromatic and aliphatic amino acid mixtures using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *Green Chem.* 19 (2017) 1850–1854.

- [28] K.M. Sousa, L.H.Z. Merlo, M.N. Marques, E.B. Cavalcanti, R.L. Souza, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Partitioning of diuron in a novel aqueous two-phase system based on polyols and tetrahydrofuran, *Fluid Phase Equilib.* 429 (2016) 325–330.
- [29] P.L. Santos, L.N.S. Santos, S.P.M. Ventura, R.L. Souza, J.A.P. Coutinho, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and cholinium-based ionic liquids, *Chem. Eng. Res. Des.* 112 (2016) 103–112.
- [30] G.B. Cardoso, I.N. Souza, M.M. Pereira, L.P. Costa, M.G. Freire, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments, *Chem. Eng. Res. Des.* 94 (2015) 317–323.
- [31] T. Takamuku, M. Tabata, A. Yamaguchi, J. Nishimoto, M. Kumamoto, H. Wakita, T. Yamaguchi, Liquid structure of acetonitrile-water by X-ray diffraction and infrared spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 8880–8888
- [32] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Retention of ionizable compounds on HPLC.12. the properties of liquid chromatography buffers in acetonitrile–water mobile phases that influence HPLC retention, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3809–3818.
- [33] D. Zhang, Y. Zhang, Y. Wen, K. Hou, J. Zhao, Intrinsic kinetics for the synthesis of acetonitrile from ethanol and ammonia over Co–Ni/c-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst, *Chem. Eng. Res. Des.* 89 (2011) 2147–2152.
- [34] A. Tai, T. Sawano, F. Yazama, H. Ito, Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays, *Biochim. Biophys. Acta.* 1810 (2011) 170–177.
- [35] J.C. Merchuck, B.A. Andrews, J.A. Asenjo, Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion, *J. Chromatogr. B* 711 (1998) 285–293.
- [36] A.F.M. Cláudio, M.G. Freire, C.S.R. Freire, A.J.D. Silvestre, J.A.P. Coutinho, Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 75 (2010) 39–47.
- [37] G.B. Cardoso, T. Mourão, F.M. Pereira, M.G. Freire, A.T. Fricks, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin, *Sep. Purif. Technol.* 104 (2013) 106–113.
- [38] G.B. Cardoso, I.N. Souza, M.M. Pereira, M.G. Freire, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile, *Sep. Purif. Technol.* 136 (2014) 74–80.

- [39] M.G. Freire, C.L.S. Louros, L.P.N. Rebelo, J.A.P. Coutinho, Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications, *Green Chem.* 13 (2011) 1536–1545.
- [40] Y. Rong, M. Sillick, C.M. Gregson, Determination of dextrose equivalent value and number average molecular weight of maltodextrin by osmometry, *J. Food Sci.* 74 (2009) C33-C40.
- [41] A. Noubigh, A. Mgaidi, M. Abderrabba, Temperature effect on the distribution of some phenolic compounds: An experimental measurement of 1-octanol/water partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data* 55 (2010) 488–491.
- [42] F. Pourebrahimi, S. Shahriari, M. Salehifar, H. Mozafari, Partitioning of vanillin in aqueous two-phase systems formed by cholinium chloride and  $K_3PO_4$ , *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 88 (2015) 1494–1499.
- [43] M.V. Quental, H. Passos, K.A. Kurnia, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire, Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and acetate-based salts: phase diagrams, densities, and viscosities, *J. Chem. Eng. Data* 60 (2015) 1674–1682.
- [44] B. Esteban, J.R. Riba, G. Baquero, A. Rius, R. Puig, Temperature dependence of density and viscosity of vegetable oils, *Biomass Bioenergy.* 42 (2012) 164–171.
- [45] P. Dokic, J. Jakovljevic, Lj. Dokic-Baucal, Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions, *Colloid Surface A.* 141 (1998) 435–440.
- [46] S.M. Synder, K.D. Cole, D.C. Sziag, Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C, *J. Chem. Eng. Data* 37 (1992) 268–274.
- [47] F.L.C. Machado, J.S.R. Coimbra, D.G. Zuniga, A.R. Costa, J.P. Martins, Equilibrium data of aqueous two-phase systems composed of poly(ethylene glycol) and maltodextrin, *J. Chem. Eng. Data* 57 (2012) 1984–1990.

## Capítulo 5

### **Phenolic Compounds Partitioning in Aqueous Two-Phase System based on Acetonitrile + Deep Eutectic Solvents + Water**

Isabela Nascimento Souza<sup>a</sup>, Cleide Mara Faria Soares<sup>a,b</sup>, João A. P. Coutinho<sup>c</sup>, Ranyere

Lucena de Souza<sup>a,b</sup>, Álvaro Silva Lima<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

<sup>b</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. Prédio do ITP. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

\*Endereço para correspondência: e-mail: alvaro\_lima@itp.org.br. Telefone: +55 7932182115.

Fax: +55 7932182190.

## **Abstract**

This aim of this work was study the partitioning behavior of phenolic compounds, namely caffeic acid, syringic acid, vanillic acid, ferulic acid and vanillin in aqueous two-phase system based on acetonitrile and deep eutectic solvents (DES) based on choline chloride and carbohydrates (sucrose, glucose, mannose, arabinose and xylose). The binodal curves at 25 °C and 0.1 mPa using DES was compared with ATPS formed of choline chloride, carbohydrates and mixture of this compounds. The ATPS was used to study the partitioning of the phenolic compounds. The ability to form ATPS depend on the number and kind of hydroxyl group of hydrogen-bond donor compound (carbohydrates) of DES, moreover the molecular weight of DES plays also an important role in the ease of phase formation. ATPS based on DES showed biphasic area larger than system based on choline chloride and carbohydrates, however same area than system composed of mixture of glucose and choline chloride. For all system, the target biomolecule migrated preferentially to top phase (acetonitrile-rich phase), however ATPS based on DES present partition coefficient and recovery in top phase for all target biomolecules lower than ATPS based on glucose.

**Key-word:** partitioning; phenolic compounds; deep eutectic solvents, aqueous two-phase systems

## **Introduction**

Phenolic compounds are secondary metabolites of plants with one or more aromatic rings, which allows its classification into some sub-classes such as phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans (Li et al., 2014). Phenolic acids designates phenols that possess one carboxylic group, and contain 2 distinctive carbon frameworks: the hydroxycinnamic (ferulic and caffeic acids) and hydroxybenzoic (vanillic and syringic acids) structures (Stalikas, 2007). Although the basic skeleton remains, they differ from each other by number and position of hydroxyl groups on the aromatic ring (Kim et al., 2006).

Phenolic compounds have several health-promoting benefits; they have attracted interest due to their important biological and pharmacological properties, mainly the antioxidant (Jeszka-Skowron et al., 2015), anti-inflammatory (Kang et al., 2015), anticarcinogenic activities (Roleira et al., 2015), among others. Daily, the phenolic acids are consumed by humans, and the estimated range is 25 mg to 1 g a day, depending on diet (Clifford, 1999).

These compounds are extracted from natural matrixes using several protocols such as solvent extraction (Milagros et al., 2011), pressurized fluid extraction (Setyaningsih et al., 2016), supercritical fluid extraction (Walters et al., 2018), ultrasound-assisted extraction (Dahmoune et al., 2014) and microwave-assisted extraction (Pinela et al., 2016). Once extracted, clean-up protocols like solid phase extraction (Michalkiewicz et al., 2008) and molecular imprint (Fan et al., 2017) should be considered.

For an appropriate use, additional steps may be called for if the purification. Therefore, this work addressed in establishing a protocol using aqueous two-phase system (ATPS) to study the phenolic compounds partitioning, as a preliminary understanding in purification process.

ATPS is a protocol, which has been used in the partitioning, concentration and purification of different biocompounds such as enzymes (Souza et al., 2015), anthocyanins

(Lima et al., 2017), flavonoids (He et al., 2016), alkaloids (Placido et al., 2018), antibody (Campos-Pinto et al., 2017), phenolic acids (Almeida et al., 2014), among others; due to its versatility, biocompatibility, high efficiency, high yield, selectivity, low cost, ease scale-up and technological simplicity (Sousa et al., 2016). ATPS are formed when two soluble-compounds are mixing above a critical concentration, resulting in two immiscible phases (Garza-Madrid et al., 2010).

A wide range of compounds has already been used as ATPS inducers, initially it was built system based on polymer-polymer (Diamond and Hsu, 1990). However, the viscosity and high-cost led to develop systems constituted of polymer-salt (Zafarani-Moattar et al., 2010; Reschk et al., 2014), and since 2003 those formed of liquid ionic-salt (Gutowski et al., 2003; Tan et al., 2012), liquid ionic – carbohydrates (Chen et al., 2010) and liquid ionic – polymers (Panas et al., 2017) have been used. Recently, the efforts of the literature focus on the use of organic solvents – salt (Cen et al., 2018), organic solvent – carbohydrates (Sousa et al., 2016) and the application of DES as a constituent of ATPS (Li et al., 2016).

Organic solvents appeared as a low-cost alternative to form ATPS with low viscosity and easily separated from the target biomolecule (Ooi et al., 2009). Acetonitrile (ACN) has been used in ATPS, and present as a colorless, aprotic and water-soluble solvent (Nemati-Kande and Shekaari, 2013). Industrially, ACN plays an important role in processes of the pharmaceutical, cosmetic and agrochemical industry (Santos et al., 2010).

Deep eutectic solvents (DES) are a novel set of solvents prepared from two or three cheap and safe compounds, which can interact with each other through hydrogen bonds and van der Waals forces to form a eutectic mixture (Zeng et al., 2014; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2018). These interactions between the hydrogen-bond donor (HBD) and hydrogen-bond acceptor (HBA) are the driving force that to reduce the melting point of DES when compared

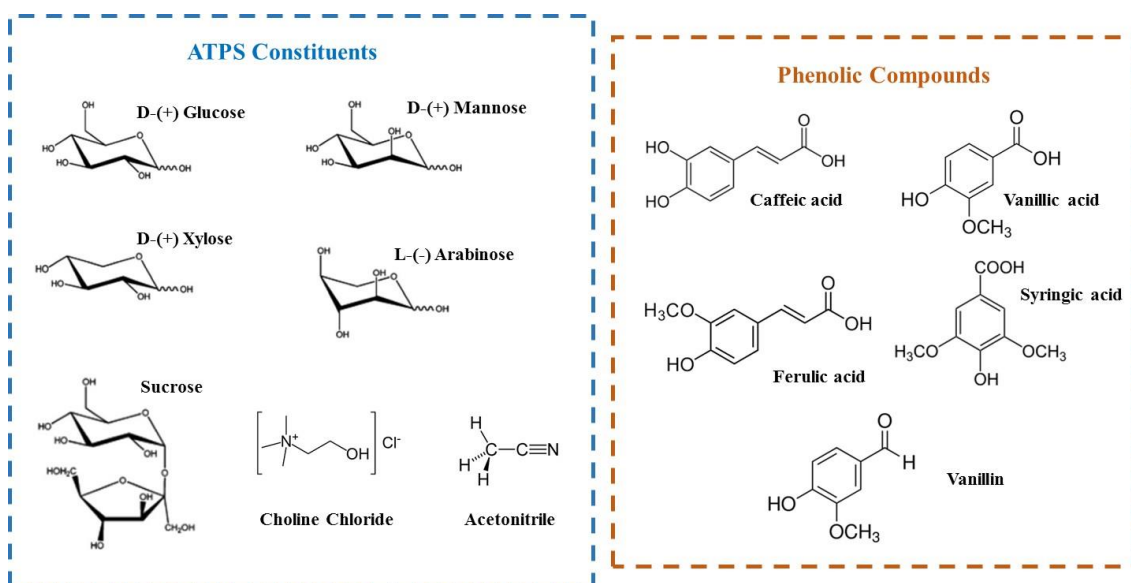


with individual component (Jhong et al., 2009). Usually, the quaternary ammonium salts are used as HBA (choline chloride, fitic acid, proline and betaine) (Dai et al., 2012) when metallic salts, alcohols and sugars are employed as HBD (Abbott et al., 2003; Garcia et al., 2015). The solvents thus formed have advantages such as a wide range of possible combination, water compatibility, low vapor pressure, non-flammability, biocompatibility and biodegradability (Florindo et al., 2014).

## Material and Methods

### Materials

The ATPS constituent were composed of monosaccharides such as D-(+)- glucose (> 99 wt%), D(+)- mannose (> 98 wt%), D-(+)- xylose (> 98 wt%), L-(+)- Arabinose (> 99 wt%), disaccharides (sucrose, > 98 wt%), ionic liquid (Choline Chloride, > 98 wt%) and acetonitrile (> 99 wt%). The target biomolecules were caffeic acid (> 98 wt%), syringic acid (> 98 wt%), vanillic acid (> 98 wt%), ferulic acid (> 99 wt%) and vanillin (> 99 wt%). All chemical compounds such as were purchased by Sigma-Aldrich (Figure 1) and ultrapure water was employed in all experiments (Ultrapure LTRAPURE type 1, water Direct-Q3<sup>®</sup>UV).



**Figure 1.** Chemical structure of ATPS constituents and phenolic compounds used in this work.

## **Preparation of Deep Eutectic Solvent**

Three molar ratio (1:1, 1:2 and 2:1) of choline chloride (hydrogen bond acceptor) and carbohydrates (hydrogen bond donors) were used for preparing DESs such as D-(+)glucose-choline chloride (GCH), D-(+)mannose-choline chloride (MCH), D-(+)xylose-choline chloride (XCH), L-(+)arabinose-choline chloride (ACH) and sucrose-choline chloride (SuCH), through heating method proposed by Dai et al. (2012) with modifications. Briefly, the two-component mixture and a known and sufficient amount water content for dissolution were added in a round-bottle flask with a stirring bar and closed with a cap. The set was heated in a water bath until the components dissolution and obtaining a clear liquid (70 – 100 °C) under vigorous agitation (180 min). DES structure were confirmed by FT-IR (Xu et al., 2015).

## **Binodal curve**

Liquid-liquid equilibrium diagram was built using the cloud-point (Albertsson, 1990) method different combination of constituents (ACN + Mixture of [CH]Cl and carbohydrates + water; and ACN + DES + water) at 25 °C at 0.10 mPa. Stocking solution of DES (80 wt%) and ACN (80 wt%) was previously prepared and used for the binodal curve determination. The ACN aqueous solution were repetitive drop-wise to the DES aqueous solution, under constant magnetic stirring (Tecnal TE-085), until the visual detection of a cloudy solution (biphasic region), followed by drop-wise addition of ultrapure water until to observe a clear and limpid solution (monophasic area). The procedure was repeated several times in order to obtain enough points for the binodal curve, which was determined gravimetrically (deviation  $\pm 10^{-4}$  g).

Binodal curve of systems based on ACN + [CH]Cl + water and ACN + carbohydrates + water at 25 °C and 0.10 mPa were obtained in the literature (Santos et al., 2016 and Cardoso et al., 2013, respectively).

## Partitioning of phenolic compounds

A common mixing point for all studied ATPSs was chosen directly from the biphasic area of the different binodal curves (ACN - 30 wt%, DES/Carbohydrate/[CH]Cl/Mixture – 30 wt% and water) and applied to phenolic compound partitioning. The ATPS was prepared in centrifuge tube (15 mL) weighting the suitable amount of each constituent of system and the phenolic compounds (23 mg.L<sup>-1</sup>). The system was vigorously stirred and then centrifuged at 3000 rpm and 25°C for 10 min. In order to reach the thermodynamic equilibrium, the tubes were left in a thermostatic bath at 25 °C for at least 12 h. The top and bottom phases were carefully withdrawn using a long needle syringe and a pipette, respectively. The volume of each phase was initially determined and the phenolic compounds concentration was measured. At least three independent replicates were made to determine the averages and standard deviations of each parameter.

The phenolic compounds concentrations were measured in each phase using a spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio UV-Vis) at 317 nm (caffeic acid), 271 nm (syringic acid), 316 nm (ferulic acid), 257 nm (vanillic acid) and 280 nm (vanillin). A standard curve was previously established using different concentrations of target biomolecules (Claudio et al., 2010).

The partition coefficient (K) was determined as a ratio between the concentration of biomolecule in top and bottom phase (equation 1).

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (1)$$

where: C represent the phenolic compounds concentration and the subscript T and B represent the top and the bottom phase, respectively.

The phenolic compounds recovery in the top phase was calculated by equation 2:

$$R_T = \frac{100}{1 + 1/(K \times R_V)} \quad (2)$$

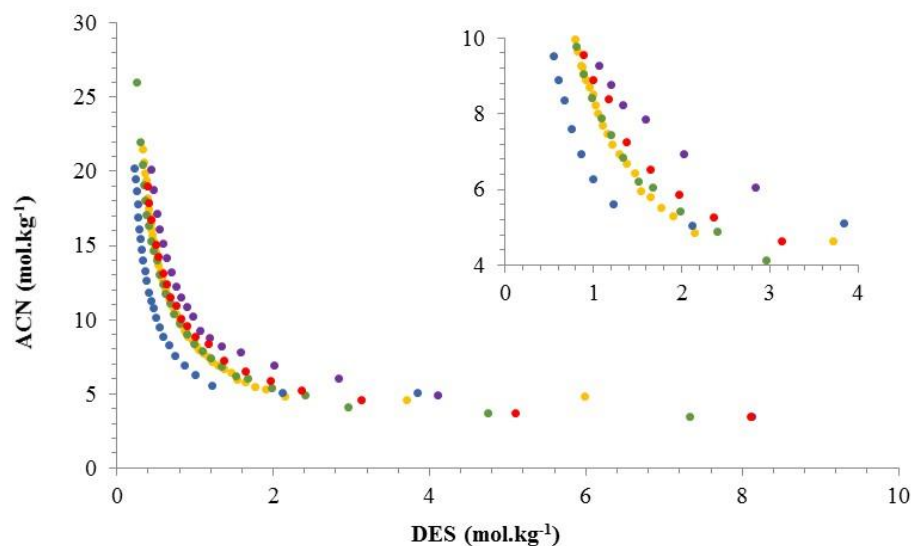
where  $R_V$  is the volumetric ration between volume of top and bottom phase.

## Results and Discussion

### Binodal Curves

The phase formation capability for ATPS composed of ACN + [Ch]Cl or ACN + carbohydrates (glucose, mannose, arabinose, xylose and sucrose) has been reported in the literature (Santos et al., 2016; Cardoso et al., 2013), moreover it is known that these compounds are able to prepare DES (Paiva et al., 2014; Florindo et al., 2014). Some DEPs has been used as constituents in ATPS (Li et al., 2016; Farias et al., 2017), however the literature is scarce in information about ATPS based on DES and ACN.

Firstly, it was evaluated the effect of hydrogen-bond donor of DES in phase formation capability. The Figure 2 depicts the bimodal curve of ATPS based on ACN + DES (molar ratio - 1:1) + water at 25 °C and 0.1 mPa. In order to eliminate misunderstandings arising from the different molecular weight of the constituents, the bimodal curves are present in molality. In all ATPSs reported in this work, the top phase is rich in ACN, while the bottom phase is rich in DES.



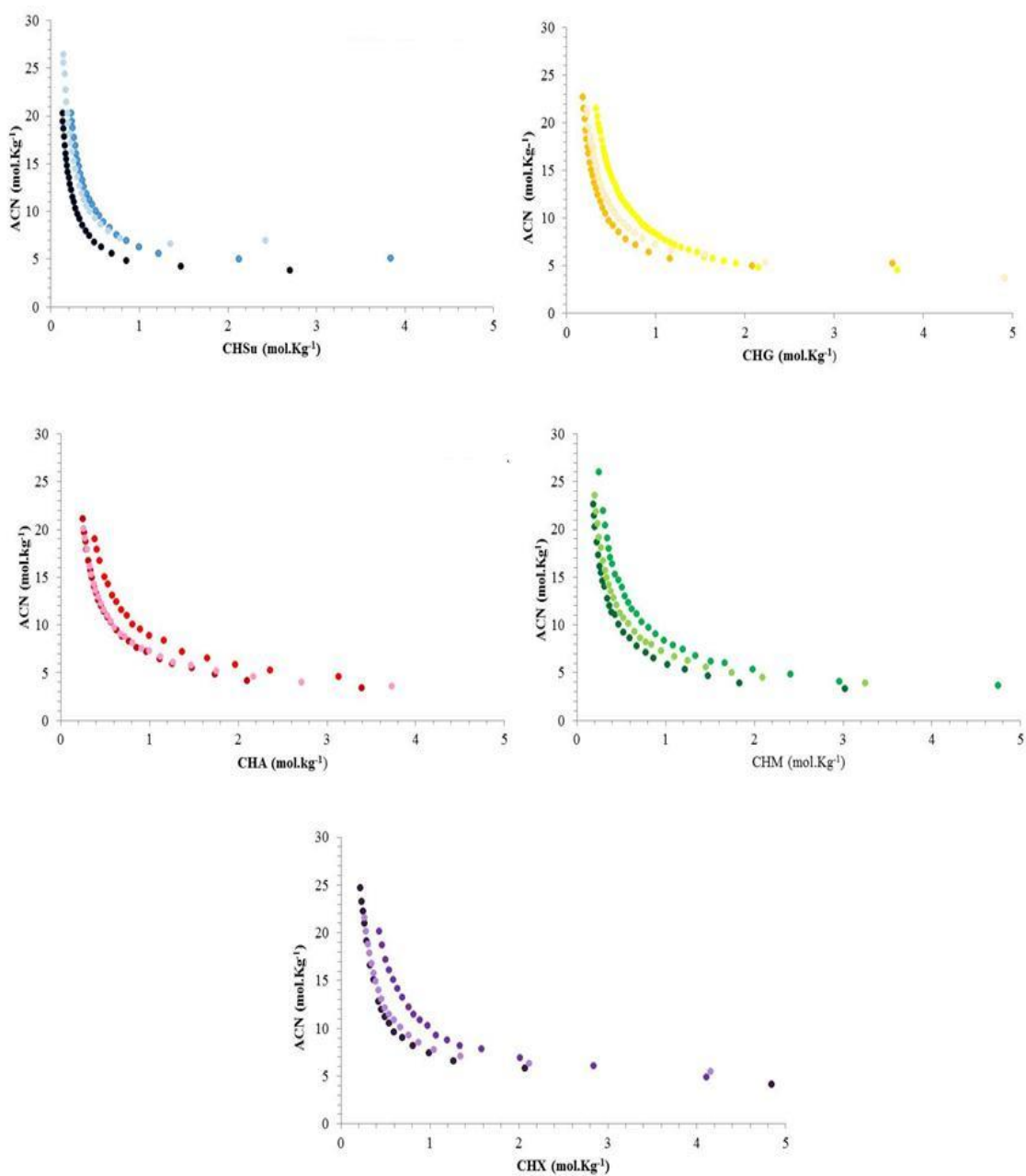
**Figure 2:** Binodal curves of ATPS based on ACN + DES (molar ratio 1:1) + water at 25 °C and 0.1 mPa. DES: (●) CHSu, (●) CHG, (●) CHA, (●) CHM and (●) CHX.

The ease biphasic system using DES ( $\text{CHSu} > \text{CHG} \approx \text{CHM} > \text{CHA} > \text{CHX}$ ) formed followed the same order that those ATPSs based on carbohydrates and ionic liquids (Freire et al., 2011), ACN (Cardoso et al., 2013) or tetrahydrofuran (Sousa et al., 2017). The DES employed in the study differ only by the carbohydrate used as a hydrogen-bond donor, therefore the hydroxyl group present in disaccharide (sucrose) of SuCH is higher than in monosaccharaides of CHG, CHM and CHX, allowing the higher affinity and ability to form hydrogen bonds between these compounds and water, and consequently to promote more intensely the effect sugaring-out and separation of phases (Freire et al., 2011; Cardoso et al., 2014). The aldo-hexoses (5 hydroxyl groups) such as glucose and mannose are more favorable at forming hydrogen bonds and encourage more easier the phase separation than aldo-pentoses (4 hydroxyl groups) namely arabinose and xylose (Sousa et al., 2017). The difference in the ease of phase formation for DES based on monosaccharides with an equal number of hydroxyls is related to the number of equatorial hydroxyls (Ne-OH): glucose (4.6), xylose (3.5), mannose

(3.3) and arabinose (2.6) (Uedaria et al., 1989; Lii et al., 1998). Ne-OH has a highest hydration capability, which stabilizes the water structure (Uedaria et al., 1990; Galema et al., 1990).

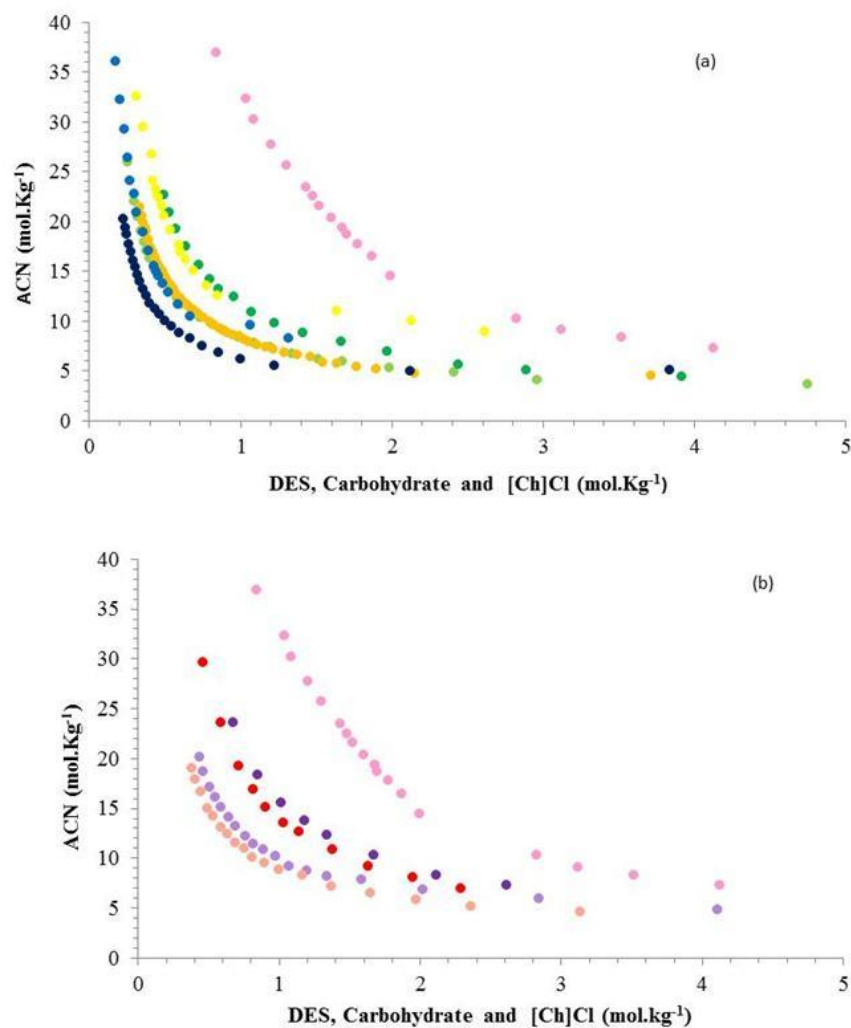
The effect of molar ratio between HBD and HBA compounds of DES preparation was evaluated in the ATPS formation (Figure 3).

The increasing order of ease ATPS formation is 1:1 < 2:1 < 2.2 for all DES, and it is in accordance with the increase of DES molecular weight. Cardoso et al. (2014a) also observed the correlation between molecular weight of compounds and ease phase formation. In DES preparation, electrons are shared between the compounds, therefore there is no loss of atoms and the molecular weight is the stoichiometric sum of the molecular weight of the DES-forming compounds (Florindo et al., 2014). The carbohydrates has higher molecular weight than [CH]Cl, for this reason, carbohydrate influence overcomes those promoted for choline chloride.



**Figure 3:** Binodal curves of ATPS based on ACN + DES + water at 25 °C and 0.1 mPa. CHSu: (● – 1:1; ● – 1:2 and ● – 2:1), CHG (● – 1:1; ● – 1:2 and ● – 2:1), CHA (● – 1:1; ● – 1:2 and ● – 2:1), CHM (● – 1:1; ● – 1:2 and ● – 2:1), CHX (● – 1:1; ● – 1:2 and ● – 2:1).

In order to compare the ATPS based on ACN + DES with those based on ACN + carbohydrates and ACN + [CH]Cl, it was observed the biphasic area in binodal curves of each systems (Figure 4).



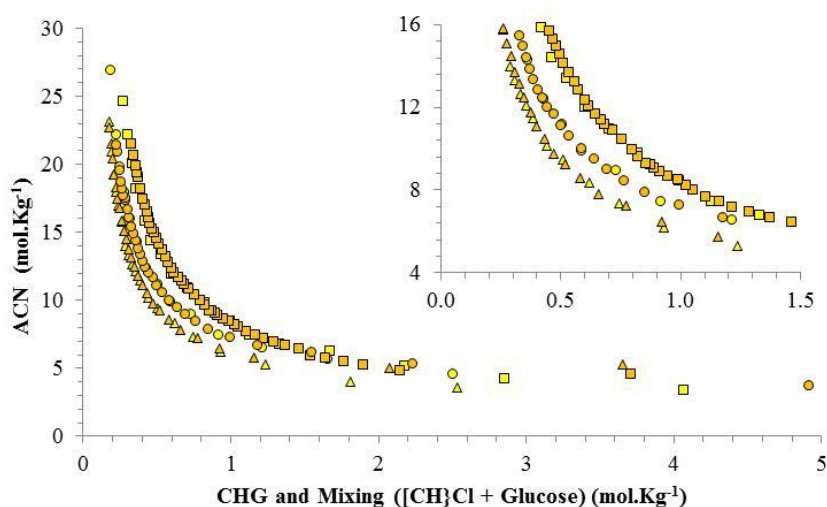
**Figure 4:** Binodal curves of ATPS based on ACN + (DES, Carbohydrates or [CH]Cl) + water at 25 °C and 0.1 mPa. Ionic liquid (Santos et al., 2016): [CH]Cl (●); Carbohydrates (Cardoso et al., 2013): saccharose (●), glucose (●), mannose (●), arabinose (●) and xylose (●); and, DES: CHSu – (●), CHG – (●), CHM (●), CHA (●) and CHX (●).

The biphasic area increase in follows order [Ch]Cl < carbohydrates < DES, demonstrating the potential of DES in the formation of ATPS. According to Passos et al. (2017), the high water amount in the ATPS breaks the hydrogen-bonds between the HBD and HBA compounds, therefore the compounds are free in the ATPS, which becomes a true quaternary system. However, Farias et al. (2017) working with ATPS based on  $K_2HPO_4$  + DES ([Ch]Cl-carbohydrates) + water at 25 °C, observed that in specific conditions such as constituents



concentration in mixing point, and molar ratio between HBD and HBA compounds of DES the system could be considered as a pseudo-ternary.

For this reason, we study the effect of DES (CHG) and simple mixing of DES compounds (Glucose + [CH]Cl) in molar ratio 1:1 to form ATPS. The result is shown in Figure 5.



**Figure 5:** Binodal curves of ATPS based on ACN + DES (CHG) + water (—) and ACN + Mixing Compounds (Glucose + [CH]Cl) + water (—) at 25 °C and 0.1 mPa. Molar ratio: 1:1 (□); 1:2 (△) and 2:1 (○).

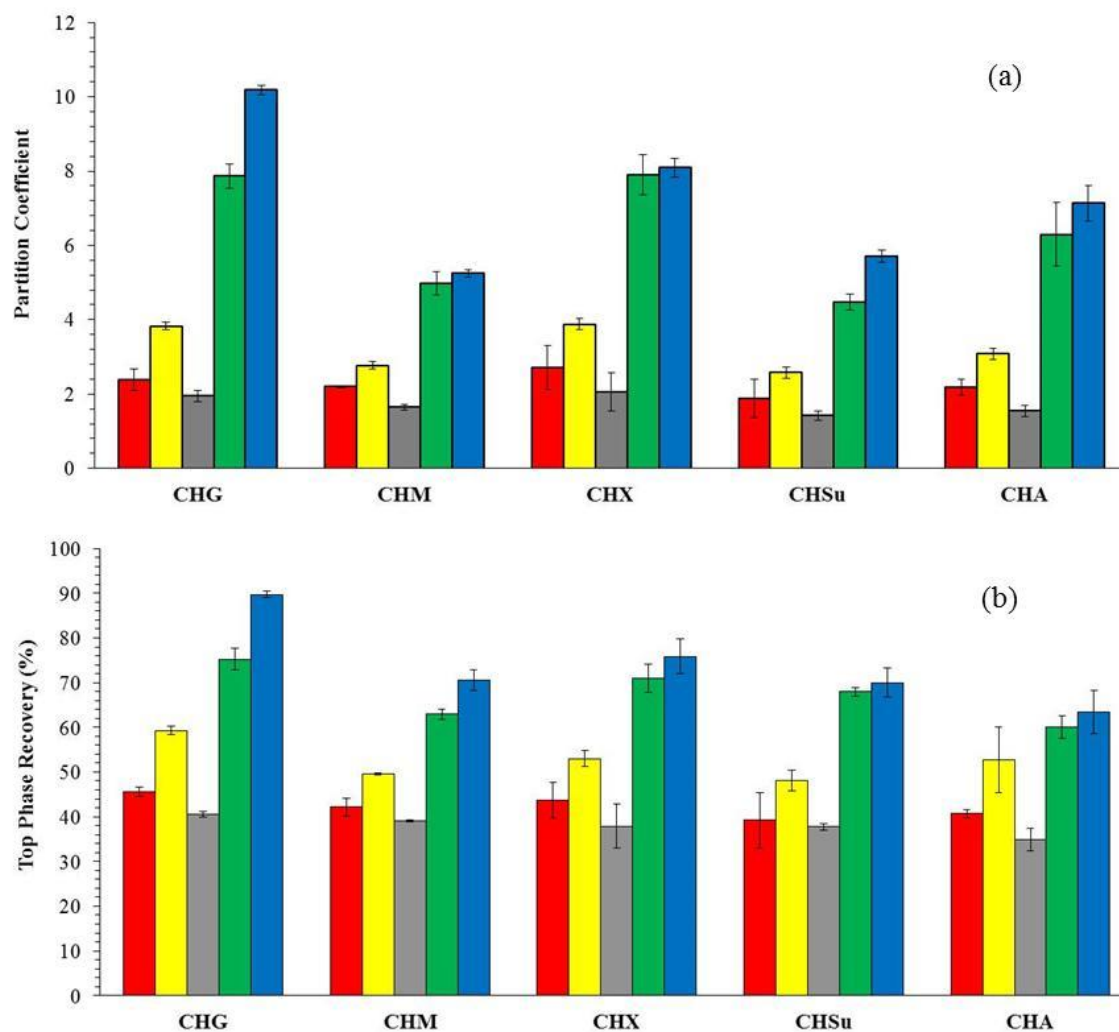
DES (CHG) was prepared according to heating method proposed by Dai et al. (2012) with modifications, described in topic Material and Methods. On the other hand, the mixtures of the compounds used in the preparation of the DEs were carried out with the dissolution of the choline chlorine and then added to glucose. The amounts of the components in the blend obeyed the same DES molar ratios (1: 1, 1: 2 and 2: 1). No difference between the binodal curves obtained with DES and the component mixtures were observed, which leads us to

suppose that the ATPS behave as quaternary mixtures as proposed by Passos et al. (2017) or the hydrogen-bond of DES does not change the capability to ATPS formed.

### **Phenolic Compounds Partitioning**

The application of the studied ATPS was investigated through the partitioning study of phenolic compounds such as caffeic acid (Log  $K_{ow}$  = 1.424), feluric acid (Log  $K_{ow}$  = 1.671), vanillic acid (Log  $K_{ow}$  = 1.324), syringic acid (Log  $K_{ow}$  = 1.129) and vanillin (Log  $K_{ow}$  = 1.19) (PubChem - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>). The Figure 6 showed the  $K$  and  $R_T$ .

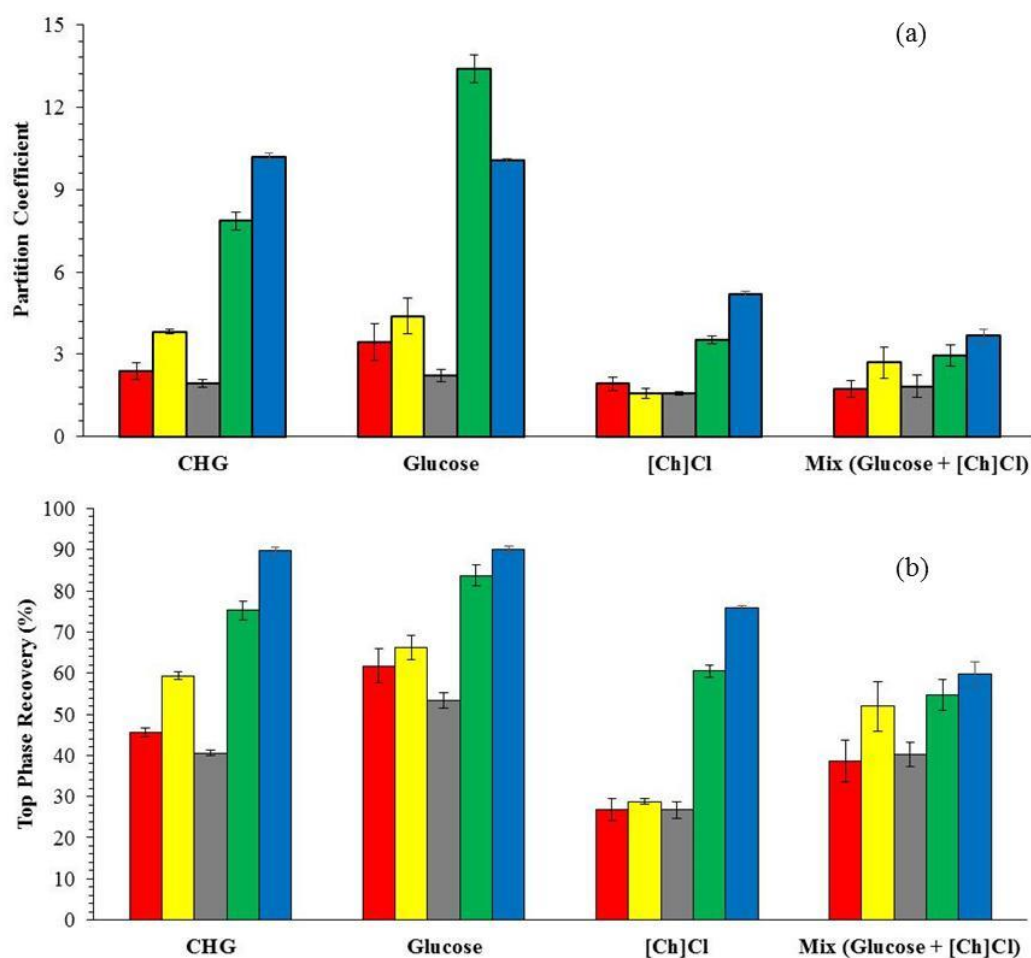
For all systems, the phenolic compounds migrated to top phase or ACN-rich phase ( $K \gg 1$ ), due to the hydrophobis nature of all used biomolecules (Log  $K_{ow} > 0$ ), which are more compatible with ACN (log  $K_{ow}$  = -0,17) than carbohydrates used sucrose (log  $K_{ow}$  = -4.53), glucose (log  $K_{ow}$  = -2.93), mannose (log  $K_{ow}$  = -2.93), arabinose (log  $K_{ow}$  = -2.94) and xilose (log  $K_{ow}$  = -2.30), as well as choline chloride (log  $K_{ow}$  = -4.66) (Chemspider - <http://www.chemspider.com>).



**Figure 6:** Partition coefficient (a) and recovery in top phase (b) for ATPS based on ACN + DES (molar ratio 1:1)+ water at 25 °C and 0.1 mPa. ■ - syringic acid, ■ - vanillic acid, ■ - caffeic acid, ■ - ferulic acid and ■ - vanillin.

In order to compare the different compounds partitioning, the Figure 7 depicted the partition coefficient and top phase recovery. It observed that system based on ACN + glucose present the highest  $K$  and  $R_T$ , and probably the effect of  $[Ch]Cl$  and its interaction with the biomolecules overcame the effect of glucose interaction, thus the phenolic compounds migrated more to ACN-rich phase and consequently the  $K$  and  $R_T$  is higher using ACN + CHG than ACN +  $[Ch]Cl$  and ACN + Mix (Glucose +  $[Ch]Cl$ ). On the other hand, system formed of CHG is

more effective in phenolic compounds partitioning than system based on mixture between glucose and [Ch]Cl. In this case, the interaction between [CH]Cl and glucose allowed less interaction between the systems constituents and target biomolecules, which migrated to top phase.



**Figure 7:** Partition coefficient (a) and recovery in top phase (b) for ATPS based on ACN + (CHG - molar ratio 1:1, glucose [Ch]Cl and mix: glucose + [Ch]Cl)+ water at 25 °C and 0.1 mPa. ■ - syringic acid, ■ - vanillic acid, ■ - caffeic acid, ■ - ferulic acid and ■ - vanillin.

## Conclusions

The bimodal curve formed of ACN and DES were influenced by the number of hydroxyl groups of carbohydrate (disaccharides > monosaccharides ) and the number of equatorial hydroxyls groups present in monosaccharides with similar number of hydroxyl groups (glucose and mannose; arabinose and xylose). The molecular weight of DES has higher effect in the phase formation, for this reason molar ration 2:1 and 1:2 were more effective to produced ATPS than molar ration 1:1 (all cases). In this way, ATPS formed of DES has largest biphasic area than those constituted of carbohydrate and [Ch]Cl. Comparing system based on DES and mixture of its constituents (glucose and [Ch]Cl) present no difference in the biphasic area size. All target biomolecules (syringic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid and vanillin) migrated preferentially to acetonitrile-rich phase due to the hydrophobic;hydrophilic characteristics, and CHG present the highest K and  $R_T$ , however lower than ATPS based on Glucose.

## Aknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC for financial support and scholarship of I.N. Souza.

## References

- Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1, 70–71, 2003.
- Albertsson, P.A.; Tjerneld, F. Aqueous two-phase separations. *Sep. Proces. In Biotech.* 287-327, 1990.
- Almeida, M. R. ; Passos, H. ; Pereira, M.M.; Lima, A.S.; Coutinho, J.A.P.; Freire, M.G. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology.* 128: 1-10, 2014.

- Campos-Pinto, I.; Espitia-Saloma, E.; Rosa, S.A.S.L.; Rito-Palomares, M.; Aguilar, O.; Arévalo-Rodríguez, M.; Aires-Barros, M.R.; Azevedo, A.M. Integration of cell harvest with affinity-enhanced purification of monoclonal antibodies using aqueous two-phase systems with a dual tag ligand. *Separation and Purification Technology*. 173: 129-134, 2017.
- Cardoso, G. B.; Mourão, T.; Pereira, F. M.; Freire, M. G.; Fricks, A. T.; Soares, C. M. F.; Lima, Á. S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. *Separation and Purification Technology*. 104: 106–113, 2013.
- Cardoso, G.B.; Souza, I.N.; 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*. 124: 54-60, 2014.
- Cardoso, G.B.; Souza, I.N.; Pereira, M.M.; Freire, M.G.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile. *Separation and Purification Technology*. 136: 74-80, 2014a.
- Cen, S. L.; Ramanan, R. N.; Tey, B. T.; Tan, W. S.; Show, P. L.; Ling, T. C.; Ooi, C. W. Purification of the recombinant enhanced green fluorescent protein from *Escherichia coli* using alcohol + salt aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *192*, 130–139.
- Chen, Y.; Meng, Y.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yang, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 55: 3612–3616, 2010.
- 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: 39–47, 2010.
- Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 362-372, 1999.
- Dahmoune, F.; Spigno, G.; Moussi, K.; Remini, H.; Cherbal, A.; Madani, K. *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*. 61: 31-40, 2014.
- Dai, Y.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*. 85: 6272–6278, 2013.
- Dai, Y.; Van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Natural deep eutectic solvents as new potential for green technology. *Analytical Chimica Acta*. 766: 61-68, 2013.

Diamond, A.D.; Hsu, J.T. Protein partitioning in PEG/dextran aqueous two-phase systems. *AIChE Journal*. 36: 1017-1024, 1990.

Fan, D.; Jia, L.; Xiang, H.; Peng, M.; Li, H.; Shi, S. Synthesis and characterization of hollow porous molecular imprinted polymers for the selective extraction and determination of caffeic acid in fruit samples. *Food Chemistry*. 224: 32-36, 2017.

Farias, F. O.; Sosa, F. H. B.; Igarashi-Mafra, L.; Coutinho, J. A. P.; Mafra, M. R. Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars)+  $K_2HPO_4$ + water. *Fluid Phase Equilibria*. 448: 143–151, 2017.

Florindo, C.; Oliveira, F. S.; Rebelo, L. P. N.; Fernandes, A. M.; Marrucho, I. M. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on choline chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable and Chemical Engineering*. 2: 2416–2425, 2014.

Freire, M. G.; Louros, C. L. S.; Rebelo, L. P. N.; Coutinho, J. A. P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. *Green Chemistry*. 13: 1536-1545, 2011.

Galema, S.A.; Blandamer, M.J.; Engberts, J.B.F.N. Stereochemical aspects of the hydration of carbohydrates, Kinetic medium effects of monosaccharides on a water catalyzed hydrolysis reaction, *Journal of the American Chemistry Society*. 112 (1990) 9666–9668

García, G.; Aparicio, S.; Ullah, R.; Atilhan, M. Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. *Energy & Fuels*. 29: 2616–2644, 2015.

Garza-Madrid, M.; Rito-Palomares, M.; Serna-Saldívar, S. O.; Benavides, J. Potential of Aqueous Two-Phase Systems constructed on flexible devices: Human serum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*. 45: 1082–1087, 2010.

Gutowski, K.E.; Broker, G.A.; Willauer, H.D.; Huddleston, J.G.; Swatloski, R.P.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of the American Chemical Society*. 125: 6632–6633, 2003.

He, F.; Li, D.; Wang, D.; Deng, M. Extraction and purification of quercitrin, hyperoside, rutin, and afzelin from *Zanthoxylum Bungeanum* maxim leaves using an aqueous two-phase system. *Journal of Food Science*. 7: C1593-C1602, 2016.

Jeszka-Skowron, M.; Krawczyk, M.; Zgoła-Grześkowiak, A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *Journal of Food Composition and Analysis*. 40: 70-77, 2015.

Jhong, H. R.; Wong, D. S. H.; Wan, C. C.; Wang, Y. Y.; Wei, T. C. A novel deep eutectic solvent-based ionic liquid used as electrolyte for dye-sensitized solar cells. *Electrochem. commun.* **2009**, *11* (1), 209–211.

Kang, J.; Thakali, K.M.; Jensen, G.S.; Wu, X. Phenolic acids of the two major blueberry species in the us market and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Plant Foods for Human Nutrition.* *70*: 56-62, 2015.

Kim, K.H.; Tsao, R.; Yang, R.; Cui, S.W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry.* *95*: 466–473, 2006.

Li, A. N.; Li, S.; Zhang, Y. J.; Xu, X. R.; Chen, Y. M.; Li, H. Bin. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* **2014**, *6* (12), 6020–6047.

Li, N.; Wang, Y.; Xu, K.; huang, Y.; Wen, Q.; Ding, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. *Talanta.* *152*: 23-32, 2016.

Lii, C.Y.; Lai, M.F.; Liu, K.F. Factors influencing the retrogradation of two rice starches in low-molecular-weight saccharide solutions, *J. Cereal Sci.* *28* (1998) 175–185.

Lima, A.S.; Soares, C.M.F.; Paltram, R.; Halbwirth, H.; Bica, K. Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria.* *451*: 68-78, 2017.

Michalkiewicz, A.; Biesaga, M.; Pyrzynska, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A.* *1187*: 18-24, 2008.

Milagros, A.L.; Argimiro, R.; Miguel, R.; Tangil, S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry.* *125*: 1104-1109, 2011.

Nemati-Kande, E.; Shekaari, H. Salting-out effect of sodium, potassium, carbonate, sulfite, tartrate and thiosulfate ions on aqueous mixtures of acetonitrile or 1-methyl-2-pyrrolidone: A liquid-liquid equilibrium study. *Fluid Phase Equilib.* **2013**, *360*, 357–366.

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 Biochem.* **2009**, *44* (10), 1083–1087.



- Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R.L.; Duarte, A.R.C. Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2: 1063–1071, 2014.
- Panas, P.; Lopes, C.; Cerri, M.O.; Ventura, S.P.M.; Santos-Ebinuma, V.C.; Pereira, J.F.B. Purification of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* via submerged fermentation using polyethylene glycol/cholinium chloride aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*. 450: 42-50, 2017.
- Passos, H.; Tavares, D. J. P.; Ferreira, A. M.; Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P. Are Aqueous Biphasic Systems Composed of Deep Eutectic Solvents Ternary or Quaternary Systems? *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, 4 (5), 2881–2886.
- Pinela, J.; Prieto, M.A.; Carvalho, A.M.; Barreiro, M.F.; Oliveira, M.B.P.P.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*. 164: 114-124, 2016.
- Placido, N.S.O.; Carlos, A.L.S.; Galvao, J.U.; Souza, R.L.; Soares, C.M.F.; Mattedi, S.; Fricks, A.T.; Lima, A.S. Protic ionic liquids as a constituent of biphasic systems based on acetonitrile: Phase diagram and alkaloid partitioning. *Separation and Purification Technology*. 200: 318-326, 2018.
- Reschke, T.; Brandenbusch, C.; Sadowski, G. Modeling aqueous two-phase systems: II. Inorganic salts and polyether homo- and copolymers as ATPS former. *Fluid Phase Equilib.* **2014**, 375, 306–315.
- Roleira, F.M.F.; Tavares-da-Silva, E.J.; Varela, C.L.; Costa, S.C.; Silva, T.; Garrido, J.; Borges, F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*. 183: 235-258, 2015.
- Santos, G. L. G.; Silva, C. S.; Cardoso, L. A. M. Acilação de friedel-crafts do 2-metoxinaftaleno usando o ácido dodecafosfotúngstico suportado em sílica (HPW/SiO<sub>2</sub>) como catalisador e acetonitrila como solvente. *Quim. Nova* **2010**, 33 (1), 57–64.
- Santos, P.L.; Santos, L.N.S.; Ventura, S.P.M.; Souza, R.L.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and cholinium-based ionic liquids; *Institution of Chemical Engineers*. 112: 103-112. 2016.
- Setyaningsih, W.; Saputro, I.E.; Palma, M.; Barroso, C.G. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. *Food Chemistry*. 192: 452-459, 2016.

Sousa, K. M.; Merlo, L. H. Z.; Marques, M. N.; Cavalcanti, E. B.; Souza, R. L.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. Partitioning of diuron in a novel aqueous two-phase system based on polyols and tetrahydrofuran. *Fluid Phase Equilib.* **2016**, *429*, 325–330.

Sousa, K.M.; Maciel, G.; Buarque, F.S.; Santos, A.J.; Marques, M.N.; Cavalcanti, E.B.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran + carbohydrates + water: Equilibrium data and partitioning experiments. *Fluid Phase Equilibria*, *433*, 1-9, 2017.

Souza, R.L.; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems. *Green Chemistry*. *17*: 3026-3024, 2015.

Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. *30*: 3268-3295, 2007.

Tan, Z.; Li, F.; Xu, X. Isolation and purification of aloe anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*. *98*: 150-157, 2012.

Uedaira, H.; Ikura, M.; Uedaira, H. Natural-abundance oxygen-17 magnetic relaxation in aqueous solutions of carbohydrates, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* *62* (1989) 1–4. 8

Uedaira, H.; Ishimura, M.; Tsuda, S.; Uedaira, H. Hydration of oligosaccharides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* *63* (1990) 3376–3379

Walters, M.; Ribeiro, A.P.L.; Hosseinian, F.; Tsopmo, A. Phenolic acids, avenanthramides, and antioxidant activity of oats defatted with hexane or supercritical fluid. *Journal of Cereal Science*. *79*: 21-26, 2018.

Xu, K.; Wang, Y.; Huang, Y.; Li, N.; Wen, Q. A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. *Analytica Chimica Acta*. *864*: 9-20, 2015.

Zafarani-Moattar, M. T.; Nasiri, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. *J. Chem. Thermodyn.* **2010**, *42* (9), 1071–1078.

Zeng, Q.; Wang, Y.; Huang, Y.; Ding, X.; Chen, J.; Xu, K. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *Analyst* **2014**, *139* (10), 2565.

Zhang, H.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Chen, J.; Wei, X.; Xu, P. Aqueous biphasic systems formed by deep eutectic solvent and new-type salts for the high-performance extraction of pigments. *Talanta* **2018**, *181*, 210–216.

Zhang, H.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Xu, K.; Li, N.; Wen, Q.; Yang, Q. Aqueous biphasic systems containing PEG-based deep eutectic solvents for high-performance partitioning of RNA. *Talanta* **2017**, *170* (February), 266–274.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANDARAMAN, S.; REINECCIUS, G.A. Stability of encapsulated orange peel oil. **Food Technoogy**, v. 40, p. 88-93, 1986.
- ABBOTT, A. P.; BARRON, J. C.; RYDER, K. S.; WILSON, D. Eutectic-Based Ionic Liquids with Metal-Containing Anions and Cations. **Chemical Engineering Journal**, v. 13, p. 6495–6501, 2007.
- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, p. 70 – 71, 2003.
- ABBOTT, A.P.; COLLINS, J.; DALRYMPLE, I.; HARRIS, R.C.; MISTRY, R.; QIU, F.; SCHEIRER, J.; WISE W.R. Processing of Electric Arc Furnace Dust using Deep Eutectic Solvents. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, p. 341-347, 2009.
- ABREU, A.C.; MCBAINB, A.J.; SIMÕES M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 1007–1021, 2012.
- AHMAD, M.; ALI, M.; NABI, F. Ionic liquids in supported liquid membrane technology. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 242–254, 2011.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell and macrocolecules. **Ed. Jonh Wiley**, p. 346. New York, 1986.
- ALDERLIESTEIN,L.; CASTENMILLER, W.A.; SCHOTEL, R.A.; VERSCHUREN, V.J. Low-fat spread. **European Patent** 0 596 546 A1, 1994.
- AMORATI, R.; PEDULLI, G.F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **J Agric Food Chemistry**, v. 54, p. 2932-2937, 2006.
- ANI, V.; VARADARAJ, M.C.; AKHILENDER-NAIDU, K. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 109-115, 2006.
- ANTONIOLLI, L.R.; BENEDETTI, B.C.; SOUZA FILHO, M.S.M.; BORGES, M.F. Avaliação da vanilina como agente antimicrobiano em abacaxi ‘Pérola’ minimamente processado. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 473-477, 2004.
- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; PISCO, A.M.M.O.; VRIES, J.; KORPORAAL, R.; VISSER, T.J.; AIRES-BARROS, M.R. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction, **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 31–39, 2009.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

- BOLOGNESE, B.; NERLI, B.; PICÓ, G. Application of the aqueous two-phase systems of ethylene and propylene oxide copolymer-maltodextrin for protein purification. **Journal of Chromatography B**, v. 814, p. 347-353, 2005.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v.19, n. 4, p. 256-265, 2013.
- BOYADZHIEV, L.; LAZAROVA, Z. Liquid membranes (liquid pertraction). **Membrane Separations Technology. Principles and Applications**, 1995.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.
- CARDOSO, G. B.; MOURÃO, T.; PEREIRA, F. M.; FREIRE, M. G.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 106–113, 2013.
- 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**, v. 124, p. 54–60, 2014a.
- CARDOSO, G.B.; SOUZA, I. N.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile, **Separation and Purification Technology**, v. 136, p. 74-80, 2014b.
- CARDOSO, G.B.; SOUZA, I. N.; PEREIRA, M. M.; COSTA, L. P.; FREIRE, M. G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 317–323, 2015.
- CASTRO, B. D.; AZNAR, M. Liquid–liquid equilibrium of water + PEG 8000 + magnesium sulphate or sodium sulphate aqueous two–phase systems at 35 °C: experimental determination and thermodynamic modelling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 463–470, 2005.
- CASTRO, N.; DURRIEU, V.; RAYNAUD, C.; ROUILLY, A. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. **Carbohydrate. Polymers**, v.144, p. 464–473, 2016.
- CHAO, P.C.; HSU, C.C.; YIN, M.C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v.6, n.33, p.1-8, 2009.
- Chemspider, The free chemical database, <http://www.chemspider.com/>. Accessed at 10-04-2017.
- Chemspider, The free chemical database, <http://www.chemspider.com/>. Accessed at 20-02-2017.
- CHEN, Y., MENG, Y., ZHANG, S., ZHANG, Y., LIU, X., YANG, J. Liquid–liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, p. 3612–3616, 2010.

- CHEN, Y.F.; TSAI H.Y.; WU, T.S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Médica**, v. 61, p. 2-8, 1995.
- CHENG J.T.; LIU, I.M.; TZENG, T.F.; CHEN, W.C.; HAYAKAWA, S.; YAMAMOTO, T. Release of beta-endorphin by caffeic acid to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Hormone and Metabolic Research**, vol. 35. p. 251-258, 2003.
- CHOI, Y. H.; VAN SPRONSEN, J.; DAI, Y.; VERBERNE, M.; HOLLMANN, F.; ARENDS, I.W.C. E.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R. Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology?. **Plant Physiology**., v. 156, p. 1701 – 1705, 2011.
- CHOO, WEE-SIM.; BIRCH, E. J. Radical Scavenging Activity of Lipophilized Products from Lipase-Catalyzed Transesterification of Triolein with Cinnamic and Ferulic Acids. **Lipids**, v. 44, p. 145–152, 2009.
- CHRONAKIS, I. S. On the Molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: a review. **Food Science & Nutrition**, v. 38, p. 599–637, 1998.
- CIVOLANI, C.; BARGHINI, P.; RONCETTI, A.R.; RUZZI, M.; SCHIESSER A. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2311–7, 2000.
- COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L.A.; MEIRELLES, A.J.A. Uso de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido. **Editora UFV, Viçosa**, 2003.
- CONN, E.; STUMPF, P. K. Introdução à Bioquímica. Tradução da terceira edição americana, supervisão José Reinaldo Magalhães. *Editora Edgard Blucher*, 1975.
- CRAVEIRO, R.; AROSO, I.; FLAMMIA, T.; CARVALHO, M.T.; VICIOSA, M.; DIONÍSIO, S.; BARREIROS, R.L.; REIS, A.R.C.; DUARTE, A. PAIVA. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 534–540, 2016.
- DHAMOLE, P. B.; MAHAJAN, P.; FENG, H. Phase separation conditions for sugaring-out in acetonitrile-water systems. **Journal Chemical Engineering**, v. 55, p. 3803-3806, 2010.
- DHANANJAYA, B.L.; NATARAJU, A.; RAGHAVENDRA GOWDA, C.D.; SHARATH, B.K.; D'SOUZA, C.J. Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 5'-nucleotidase: a pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. **Biochemistry**, v. 74, p. 1315–1319, 2009.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation. *Advances in Biochemical Engineering*, Fiechter, A. (ed.) **Springer-Verlag, Berlin**, v. 47, p. 89-135, 1992.
- DOMINGUES-PÉREZ, M.; TOMÉ, L.I.N.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M.; CABEZA, O.; COUTINHO, J.A.P. Extraction of biomolecules using aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids. **Separation and Purification Technology**, v. 72, p. 85-91, 2010.
- DU, L.; YU, P.; ROSSNAGEL, B. G.; CHRISTENSEN, D. A.; MCKINNON, J. J. Physicochemical Characteristics, Hydroxycinnamic Acids (Ferulic Acid, p-Coumaric Acid) and Their Ratio, and in

- Situ Biodegradability: Comparison of Genotypic Differences among Six Barley Varieties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4777-4783, 2009.
- DU, N.; CAO, S.; YU, Y. Research on the adsorption property of supported ionic liquids for ferulic acid, caffeic acid and salicylic acid. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1697-1703, 2011.
- DUBICK, M. A.; OMAYE, S. T. Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. **Handbook of Nutraceutical and Functional Food**, v. 14, p. 143-153, 2001.
- ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 427, p. 119-127, 2001.
- FERREIRA, L.A.; TEIXEIRA, J.A.; MIKHEEVA, L.M.; CHAIT, A. e ZASLAVSKY, B.Y. Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG\_sodium sulfate two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5031-5039, 2011.
- FERREIRA, V. F.; SILVA, F. C. PERRONE, C. C. Sacarose no Laboratório. *Química Orgânica*. **Química Nova**, v. 24, p. 6, 2001.
- FIGUEIREDO, M.; GOMES, C.; COSTA, R.; MARTINS, A.; PEREIRA, C.M.; SILVA, F. Differential capacity of a deep eutectic solvent based on choline chloride and glycerol on solid electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 54, p. 2630-2634, 2009.
- FLORINDO, C.; OLIVEIRA, F. S.; REBELO, L. P. N.; FERNANDES, A. M.; MARRUCHO, I. M. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, p. 2416–2425, 2014.
- FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, p. 3074–3085, 2013.
- FREIRE, M. G.; LOUROS, C.L.S.; REBELO, L.P.N.; COUTINHO J. A. P. Aqueous biphasic system composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1536-1545, 2011.
- FU, J.; CHENG, K.; ZHANG, Z.; FANG, R.; ZHU, H. Synthesis, structure and structure activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2638-2643, 2010.
- FUKUMOTO, K.; YOSHIZAWA, M.; OHNO, H. Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 2398- 444 2399, 2005.
- GARC, G.; APARICIO, S.; ULLAH, R.; ATILHAN, M. Deep Eutectic Solvents : Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. **Energy Fuels**, v. 29, p. 2616–2644, 2015.
- GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human serum albumin as proof of concept. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1082-1087, 2010.

- GIADA, M. L. R. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZALEZ, J. A. Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants. **Rijeka: InTech**, p. 87–112, 2013.
- GÓMEZ-ALONSO, S.; SALVADOR, M.D.; FREGAPANE, G. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6812-6817, 2002.
- GORE, S.; BASKARAN, S.; KOENIG, B. Efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones in low melting tartaric acid–urea mixtures. **Green Chemistry**, v. 13, p. 1009-1013, 2011.
- GORKE, J.T.; SRIENC, F.; KAZLAUSKAS, R.J.. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. **Chemical Communications**, v. 10, p. 1235-1237, 2008.
- GRUZ, J.; AYAZ, F.A.; TORUN, H.; STRNAD, M. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, v.124, p. 271–277, 2011.
- GUIMARAES CM, GIAO MS, MARTINEZ SS, INTADO AI, PINTADO ME, BENTO LS. Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 39–43, 2007.
- GULCIN I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**. v. 217, p. 13-20, 2006.
- HANSON, A.T.; SAMANI, Z.; DWYER, B.; JACQUEZ, R. Heap leaching as a solvent extraction technique for remediation of metals-contaminated soils. In: Sabatini, D.A., Knox, R.C. (Eds.), Transport and Remediation of Subsurface Contaminants. ACS Symposium Series. **American Chemical Society**, p. 108-121. 1992.
- HARBORNE, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). **Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics**, p. 1–28, 1989.
- HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. (Eds.). Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants (2nd ed.). **London: Taylor & Francis**, 1999.
- HARRIS, R. C. Physical Properties of Alcohol-Based Deep Eutectic Solvents, Ph.d. Thesis, University of Leicester, 2009.
- HAYYAN, M.; ALI, M.; AL-SAAD, M. A.; HAYYAN, A.; ALNASHEF, I. M.; MIRGHANI, M. E. S. Chemosphere Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. **Chemosphere**, v. 93, p. 455–459, 2013.
- HODGE, J. E.; OSMAN, E. M. Carbohydrates, In: Fennema OR, editor. Principles of food science. Part I. **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, p. 41-138, 1976.
- HUANG, S.M.; CHUANG, H.C.; WU, C.H.; YEN, G.C. Cytoprotective effects of phenolic acids on methylglyoxal-induced apoptosis in Neuro-2<sup>a</sup> cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 940–949, 2008.
- HUSTEDT, H.; KRONER, K.H.; KULA, M.R. Applications of phase partition in biotechnology, p. 529-584, 1985. In Walter, H., Brooks, D. E. and Fisher, D. (eds.), Partitioning in Aqueous Two-phase



- Systems; Theory, Methods, Uses and Application in Biotechnology. **Academic Press Book**. Orlando, FL. U.S.A.
- HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, M. The kinetics and mechanisms of reactions of Iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.
- ILGEN, F.; KONIG, B. Organic reactions in low melting mixtures based on carbohydrates and L-carnitine a comparison. **Green Chemistry**, v. 11, p. 848-854, 2009.
- IMPERATO, G.; EIBLER, E.; NIEDERMAIER, J.; KONIG, B. Low-melting sugar-urea-salt mixtures as solvents for Diels-Alder reactions. **Chemical Communications**, v. 425, p. 1170-1172, 2005.
- INSTITUTE OF MEDICINE. Chapter 12 – Choline. In *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. DC: **The National Academies Press**, p. 390-422. Washington. 1998.
- ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; NAKATA, C.; SAITO, Y.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. **Food Chemistry**, v. 114, p. 466-471, 2009.
- ITOH A, ISODA K, KONDOH M. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A-induced liver injury. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1215–1219, 2009.
- JHONG, H.; WONG, D. S.; WAN, C.; WANG, Y.; WEI, T. Electrochemistry Communications A novel deep eutectic solvent-based ionic liquid used as electrolyte for dyesensitized solar cells. **Electrochemistry Communications**, v. 11, p. 209–211, 2009.
- JUNG, U.J.; LEE, M.K.; PARK, Y.B.; JEON, S.M.; CHOI, M.S. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, p.476-483, 2006.
- KAMPA G, ALEXAKI AP, NIFLI A, NISTIKAKI A, HATZOGLOU E, BAKOGEORGOU E. Antiproliferative and Apoptotic effect of selective phenolic acid on T47D human breast cancer Cells potential mechanisms of action. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 63–74, 2004.
- KANG, N.J.; LEE, K.W.; SHIN, B.J.; JUNG, S.K.; HWANG, M.K.; BODE, A.M. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. **Carcinogenesis**, v. 30 p. 321-30, 2009.
- KENNEDY, J.F.; KNILL, C.J.; TAYLOR, D.W. Maltodextrins. In: Kearsley, M.W.; Dziejczak, S.Z. (ed.). *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives*. **Glasgow: Blackie Academic**, p. 65-82, 1995.
- KHAN, I.; KURNIA, K. A.; SINTRA, T. E.; SARAIVA, J. A.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Assessing the activity coefficients of water in cholinium-based ionic liquids: Experimental measurements and COSMO-RS modeling, **Fluid Phase Equilibria**, v. 361, p. 16-22, 2014.
- KHAN, M.K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33 p. 85–104, 2014.

- KIM, M.C.; KIM, S.J.; KIM, D.S.; JEON, Y.D.; PARK, S.J.; LEE, H.S.; UM, J.Y.; HONG, S.H. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. **Immunopharmacol. Immunotoxicol**, v. 33, p. 525–532, 2011.
- KIM, S.J.; KIM, M.C.; UM, J.Y.; HONG, S.H. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. **Molecules**, v.15, p. 7208–7217, 2010.
- KUENZIG, W.; CHAU, J.; NORKUS, E.; HOLOWASCHENKO, H.; NEWMARK, H.; MERGENS, W.; CONNEY, A.H. Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. **Carcinogenesis**, v.5, p. 309-313, 1984.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th ed. New York: Worth Publishers, 2006.
- LESAGE-MEESSEN, L.; DELATTRE, M.; HAON, M.; THIBAUT, J.F.; CECCALDI, B.C.; BRUNERIE, P.; ASTHER, M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 107–113, 1996.
- LI, A.-N. LI, S.; ZHANG, L.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, p. 6020-6047, 2014.
- LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. **Talanta**, v.152, p. 23–32, 2016.
- LICANDRO-SERAUT, H.; ROUSSEL, C.; PERPETUINI, G.; GERVAIS, P.; CAVIN, J. Sensitivity to vinyl phenol derivatives produced by phenolic acid decarboxylase activity in *Escherichia coli* and several food-borne Gram-negative species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7853–7864. 2013.
- LIU Y, FANG J, LEI T, WANG W, LIU A. Anti-endotoxic effect of syringic acid of *Radix isatisidis*. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical**, v. 23, p. 206–508, 2003.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1432-1436, 2010.
- 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**, p. 65, v. 40–45, 2009.
- MAURYA, D.K.; ADHIKARI, S.; NAIR, C.K. K.; DEVASAGAYAN, T.P.A. DNA protective properties of vanillin against  $\gamma$ -radiation under different conditions: possible mechanisms. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 643, p. 69-80, 2007.
- MAZZERA, D.; HAYES, T.; LOWENTHAL, D.; ZIELINSKA, B. Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil at McMurdo Station, Antarctica. **The Science of the Total Environment**, v. 229, p. 65-71. 1999.

- MERLIN, J. P. J.; PRASAD, N. R.; SHIBLI, S. M. A.; SEBEELA, M. Ferulic acid loaded Poly-d,l-lactide-co-glycolide nanoparticles: Systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 69-76, 2012.
- MONTEIRO FILHO, E. S. Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma Alternativa para Purificação de Biomoléculas e Simulação de Sistemas Líquidos Complexos. **Ciência & Tecnologia**, v. 1, p. 33-41, 2010.
- MORRISON, H. G.; SUN, C. C.; NEERVANNAN, S. Characterization of ternary behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, p. 136–139, 2009.
- MUKHOPADHYAY, S.; MUKHERJEE, S.; ADNAN, N.F.; HAYYAN, A.; HAYYAN, M.; HASHIM, M.A.; GUPTA, B.S. Ammonium-based deep eutectic solvents as novel soil washing agents for lead removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 294, p. 316–322, 2016.
- NASER, J.; MJALLI, F. S.; GANO, Z. S. Molar Heat Capacity of Selected Type III Deep Eutectic Solvents. **Journal Chemical and Engineering Data**, v. 61, p. 1608–1615, 2016.
- NEMATIKANDE, E.; SHEKAARI, H. Salting-out effect of sodium, potassium, carbonate, sulfite, tartrate, and thiosulfate ions on aqueous mixtures of acetonitrile or 1-methyl-2-pyrrolidone: A liquid-liquid equilibrium study, **Fluid Phase Equilibria**, v. 360, p. 357-366, 2013.
- NKUKU, C.A.; LESUER, R.J. Electrochemistry in deep eutectic solvents. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, p. 13271-13277, 2007.
- NOUBIGH, A.; MGAIDI, A.; ABDERRABBA, M. Temperature effect on the distribution of some phenolic compounds: an experimental measurement of 1-octanol/water partition coefficients. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, p. 488-491, 2010.
- OKANO, T.; QIAO, K.; BAO, Q.; TOMIDA, D.; HAGIWARA, H.; YOKOYAMA, C. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in an aqueous acetonitrile biphasic system in the presence of acidic ionic liquids, **Applied Catalysis A: General**, v. 451, p. 1– 5, 2013.
- PAZ, M., GULLON, P., BARROSO, M. F., CARVALHO, A. P., DOMINGUES, V. F., GOMES, A. M., DELERUE-MATOS, C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462–468, 2015).
- PEI, Y.; LI, Z.; LIU, L.; WANG, J. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems formed by imidazolium ionic liquid and dipotassium hydrogen phosphate. **Journal of Chromatography A**, v. 1231, p. 2-7, 2012.
- PEREIRA, J. F. B.; LIMA, A. S.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1661–1669, 2010.
- PETKOVIC, M.; FERGUSON, J. L.; NIMAL GUNARATNE, H. Q.; FERREIRA, R.; LEITÃO, M. C.; SEDDON, K. R.; REBELO, L. P. N.; PEREIRA, C. S. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquid – toxicity and biodegradability, **Green Chemistry**, v. 12, p. 643-649, 2010.

- POLETTI, L.; CHIAPPE, C.; LAY, L.; PIERACCINI, D.; POLITO, L.; RUSSO, G. Glucose-derived ionic liquids: Exploring low-cost sources for novel chiral solvents. **Green Chemistry**, v. 446, p. 337-341, 2007.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Carboidratos. **Ciencia Hoje**, v. 39, p. 24-31, 2006.
- PRASAD, N.R.; KARTHIKEYAN, A.; KARTHIKEYAN, S.; REDDY, B.V. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 349, p. 11–19 2011.
- PREETHA, P.; DEVI, V.G.; RAJAMOHAN, T. Effects of coconut water on carbohydrate metabolism and pancreatic pathology of alloxan-induced diabetic rats. **European Journal of Internal Medicine**, v. 5, p. 234–40, 2013.
- PubChem, The free chemical database, <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed at 20-02-2017.
- RADOŠEVIĆ, K.; BUBALO, C. B.; SRČEK, G. V.; GRGAS, D.; DRAGIČEVIĆ, T. L.; REDOVNIKović, I. R. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.112, p. 46–53, 2015.
- RAI, R.P.; MAURYA, M.S..Synthesis and evaluation of antibacterial activity of vanillin derivatives. **Journal of Science and Technology**, v. 4, p. 275–276, 1966.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.
- RAO, P.V.; GAN, S.H. Cinnamon: a multifaceted medicinal plant. Evid. **Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 642942, 2014.
- REIS, I. A. O.; SANTOS, S. B.; SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2453-2461, 2012.
- RITO-PALOMARES, M. The Practical Application of Aqueous Two-Phase Processes for the Recovery of Biological Products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2002, v. 12, p. 535-543, 2002.
- RODRIGUES, L. R.; VENANCIO, A.; TEIXEIRA, J. A. Partitioning and separation of alactalbumin and b-lactoglobulin in polyethylene glycol/ammonium sulphate aqueous two phase systems. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1893–1897, 2001.
- ROGERS, R. D.; BOND, A. H.; BAUER, C. B.; ZHANG, J.; GRIFFIN S. T. Metal ion separation in polyethylene glycolbased aqueous biphasic systems: Correlation of partitioning behaviour with available thermodynamic hydration data. **Journal of Chromatography A**, v. 680, p. 221-229, 1996.
- ROGERS, R.D.; WILLAUER, H. D.; GRIFFIN, S.T.; HUDDLESTON, J.G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, p. 711, p. 255–263, 1998.

- ROLEIRA, F. M.; SIQUET, C.; ORRÙ, E; GARRIDO, M.; GARRIDO, J.; MILHAZES, N.; PODDA, G.; PAIVA-MARTINS, F.; REIS, S.; CARVALHO, R. A.; SILVA, E.J.T.; BORGES, F. Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 5816–5825, 2010.
- SADEK, P. C. The HPLC solvent guide, 2<sup>o</sup> ed., **John Wiley and Sons, Inc.**, Publications, 2002.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39–47, 2000.
- SANTOS, G. L. G.; SILVA, C. S.; CARDOSO, L. A. M. Acilação de friedel-crafts do 2-metoxinaftaleno usando o ácido dodecafosfotúngstico suportado em sílica (HPW/SiO<sub>2</sub>) como catalisador e acetoneitrila como solvent. **Química Nova**, v. 33, p. 57-64, 2010.
- SANTOS, P. L.; SANTOS, L. N. S.; VENTURA, S. P. M.; SOUZA, R. L.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and cholinium-based ionic liquids. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 112, p. 103–112, 2016.
- SCALIA, S.; MEZZENA, M. Incorporation of quercetin in lipid microparticles: Effect on photo- and chemical – stability. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 90-94, 2009.
- SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. Redefinition of working aqueous two-phase systems: A generic description for prediction of the effective phase chemical composition for process control and biorecovery. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 878, p. 1784–1790, 2010.
- SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 77, p. 12-21, 2015.
- SIDDARAJU, M.N.; DHARMESH, S.M.; 2007. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and *Helicobacter pylori* growth by phenolic antioxidants of *Zingiber officinale*. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 324-332, 2007.
- SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. G.; TEIXEIRA, J. A. C. Partitioning of glycomacropéptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1213–1216, 2009.
- SILVA, F. A.; SIOPA, F.; FIGUEIREDO, B. F. H. T.; GONÇALVES, A. M. M.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, G.; COUTINHO, J. A. P. Sustainable design for environmentfriendly mono and dicationic cholinium-based ionic liquids, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 108, p. 302-310, 2014.
- SILVA, L. H.M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, p.1345-1351, 2006.
- SILVA, L.H.M.; MEIRELLES, A.J.A. Bovine serum albumin, alfa-lactoalbumin and beta-lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems, **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 279–282, 2000.

- SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropylene glycol. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 267–274, 2001.
- SINGH, B. S.; LOBO, H. R.; SHANKARLING, G. S. Choline chloride based eutectic solvents: Magical catalytic system for carbon – carbon bond formation in the rapid synthesis of  $\beta$ -hydroxy functionalized derivatives. **Catalysis Communications**, v. 24, p. 70–74, 2012.
- SINGH, J. C. H.; KAKALIJ, R. M.; KSHIRSAGAR, R. P.; KUMAR, B. H.; KOMAKULA, S. S. B.; DIWAN P.V. Cognitive effects of vanillic acid against streptozotocin-induced neurodegeneration in mice, **Pharmaceutical Biology**, v.53, p. 630–636, 2015.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Organic Chemistry**, second ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.
- SONG, Y.; WU, T.; YANG, Q.; CHEN, X.; WANG, M.; WANG, Y.; PENG, X.; OU, S. Ferulic acid alleviates the symptoms of diabetes in obese rats. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 141–147, 2014.
- SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, p. 579:200–213, 2005.
- SOUSA, K. M.; MERLO, L. H. Z.; MARQUES, M. N.; CAVALCANTI, E. B.; SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Partitioning of diuron in a novel aqueous two-phase system based on polyols and tetrahydrofuran. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 325–330, 2016.
- SOUZA, R.L.; BARBOSA, J.M.P.; ZANIN, G.M.; LOBAO, M.W.N.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 16, p. 288-300, 2010.
- SREEDHAR, R.V.; ROOHIE, K.; VENKATACHALAM, L.; NARAYAN, M.S.; BHAGYALAKSHMI, N. Specific pretreatments reduce curing period of vanilla (*Vanilla planifolia*) beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2947– 2955, 2007.
- STANELY MAINZEN PRINCE, P.; DHANASEKA, K.; RAJAKUMAR, S. Protective effect of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p.233–240, 2011.
- STANFORTH, V.; HUANG, W-C.; ARAVINDARAN, K.; YANG, N-S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 443-451, 2012.
- SWISŁOCKA, R.; PIEKUT, J.; LEWANDOWSKI, W. The relationship between molecular structure and biological activity of alkali metal salts of vanillic acid: spectroscopic, theoretical and microbiological studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 100, p. 31–40, 2013.

- SZLAG, D. C., GIULIANO, K. A., & SNYDER, S. M. Downstream processing and bioseparation. **Journal of the American Chemical Society**, p. 115–119, 1990.
- TAI, A.; SAWANO, T.; ITO, H. Antioxidant properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, p. 314–318, 2012.
- TAKAMUKU, T.; TABATA, M.; YAMAGUCHI, A.; NISHIMOTO, J.; KUMAMOTO, M.; WAKITA, H.; YAMAGUCHI, T. Liquid structure of acetonitrile-water by X-ray diffraction and infrared spectroscopy, **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, p. 8880-8888, 1998.
- TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmacy Research**, v.7 n. 3, p. 1089-1099, 2008.
- TELLO, J.; VIGUERA, M.; e CALVO, L. Extraction of caffeine from. Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta) husks using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 53 – 60, 2011.
- TSUDA, H.; UEHARA, N.; IWAHORI, Y.; ASAMOTO, M.; LIGO, M.; NAGAO, M. Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazol [4, 5] quinoline in the rat. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 85, p. 1214–1219, 1994.
- VAQUERO, M.J. R.; NADRA, M.C.M. Growth Parameter and Viability Modifications of *Escherichia coli* by Phenolic Compounds and Argentine Wine Extracts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 342–352, 2008.
- VARMA, R.S.; SHUKLA, A.; CHATTERJEE, R.K. Evaluation of vanillic acid analogues as a new class of antifilarial agents. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, p. 819–821, 1993.
- VENTURA, S. P. M.; SILVA, F. A.; GONÇALVES, A. M. M.; PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F.; COUTINHO, J. A. P. Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to *Vibrio fischeri* Marine Bacteria, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, p. 48-54, 2014.
- VETRANO, A.M.; HECK, D.E.; MARIANO, T.M.; MISHIN, V.; LASKIN, D.L.; LASKIN, J.D. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 35372–35381, 2005.
- VINOTHIYA, K.; ASHOKKUMAR, N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 640–652, 2017.
- WALTON, N.; MAUER, M. J.; NARBAD, A. Molecules of interest vanillin. **Phytochemistry**, v. 63, p. 505-515, 2003.
- WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Characterisation of inclusion complex of trans-ferulic and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Food Chemistry**, v.124, p. 1069-1075, 2011.
- 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.

- WANG, Y.; LIU, Y.; HAN, J.; HU, S. Application of water-miscible alcohol-based aqueous two-phase systems for extraction of dyes. **Separation Science and Technology**, v. 46, p. 1283-1288, 2011.
- WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. **Fluid Phase Equilib**, v. 205, p. 275-290. 2003.
- WU, B.; ZHANG, Y.; WANG, H. Phase behavior for ternary system composed of ionic liquid + saccharides + water. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p. 6426-6429, 2008.
- WU, R.; MA, F.; ZHANG, L.; LI, P.; LI, G.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; WANG, X. Simultaneous determination of phenolic compounds in sesame oil using LC-MS/MS combined with magnetic carboxylated multi-walled carbon nanotubes. **Food Chemistry**, v. 204, p. 334-342, 2016.
- XU, K.; WANG, Y.; HUANG, Y.; LI, N.; WEN, Q. A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting. **Analytica Chimica Acta**, v. 864, p. 9–20, 2015.
- YAMADA, J.; TOMITA, Y. Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 328-329, 1996.
- YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 40-46. 2010.
- YEMİŞ, G.P.; PAGOTTO, F.; BACH, S.; DELAQUIS, P. Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of Cronobacter species. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 2062–2069, 2011.
- YU, D.G.; YANG, J.M.; BRANFORD-WHITE, C.; LU, P.; ZHANG, L.; ZHU, L-M. Third generation solid dispersions of ferulic acid in electrospun composite nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.400, p. 158-164, 2010.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; NASIRI, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. **Journal Chemical Thermodynamics**, v. 42, p. 1071-1078, 2010.
- ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and bioanalytical. **Marcel Dekker, Inc., New York**, 1995.
- ZEIZEL, S. H.; COSTA, K-A. da. Choline: an essential nutrient for public health, **Nutrition Reviews**, 67, p. 615-623, 2009.
- ZENG, Q.; WANG, Y.; HUANG, Y.; DING, X.; CHEN, J.; XU, K. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. **The Analyst**, v. 139, p. 2565, 2014.
- ZHANG, D.; ZHANG, Y.; WEN, Y.; HOU, K.; ZHAO, J. Intrinsic kinetics for the synthesis of acetonitrile from ethanol and ammonia over Co-Ni/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst. **Chemistry Engineering Res. Des**, v. 89, p. 2147-2152, 2011.
- ZHANG, Q.; VIGIER, K. D. O.; ROYER, S.; JÉRÔME, F. Deep eutectic solvents: syntheses properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 7108–7146, 2012.



ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691–702, 2008.

ZUPFER, J. M.; CHURCHILL, K. E.; RASMUSSEN, D. C.; FULCHER, R. G. Variation in ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1350-1354, 1998.

## APÊNDICE A

Neste apêndice encontra-se as figuras e ilustrações utilizadas no artigo já publicado no periódico Fluid Phase Equilibria intitulado como: Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies.

### Figure Caption

**Figure 1.** Chemical structure of ATPS phase-forming constituents: (a) maltodextrin and (b) acetonitrile; and target extracted biomolecule: (c) vanillin.

**Figure 2:** Binodal curves of ternary systems constituted by ACN + water + carbohydrates at 298.15 K and 0.10 MPa. ■ – D-glucose and ■ – sucrose [37]; ■ - dextran 6,000 and ■ dextran 100,000 [38]; ■ - maltodextrin DE 13-17 and ■ - maltodextrin DE 16.5-19.5.

**Figure 3:** Effect of dextrose equivalent of maltodextrin in the vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin (25 wt%) + water (40 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa. ■- recovery in the top phase and ■- partition coefficient.

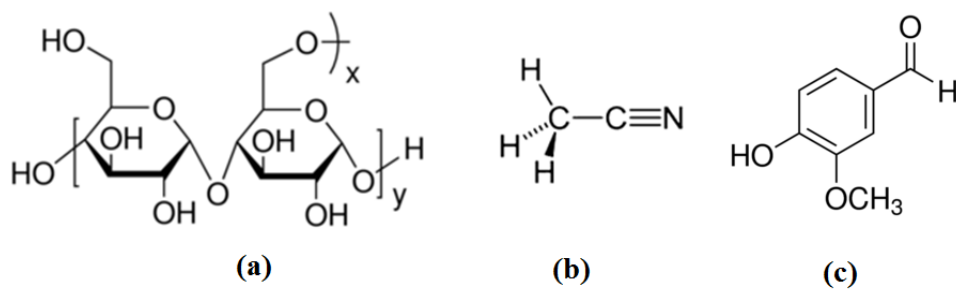
**Figure 4:** Effect of maltodextrin concentration (DE 16.5 – 19.5) in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa. ■- recovery in top phase and ■- partition coefficient.

**Figure 5:** Effect of acetonitrile concentration in vanillin partitioning using ATPS based on maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa. ■- recovery in top phase and ■- partition coefficient.

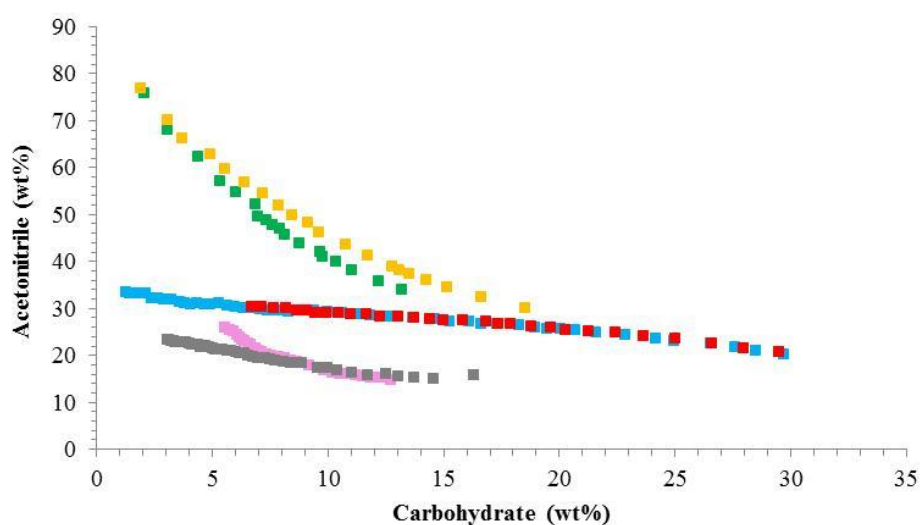
**Figure 6:** Effect of temperature (278.15 – 308.15 K) in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 0.10 MPa. ■- recovery in top phase and ■- partition coefficient.

**Figure 7:** Partition coefficient and recovery of vanillin in the top phase (ACN-rich phase) in different ATPS based on acetonitrile and different carbohydrates (dextran [38]); glucose and sucrose [37]; maltodextrin – this work) at 298.15 K and 0.10 MPa.

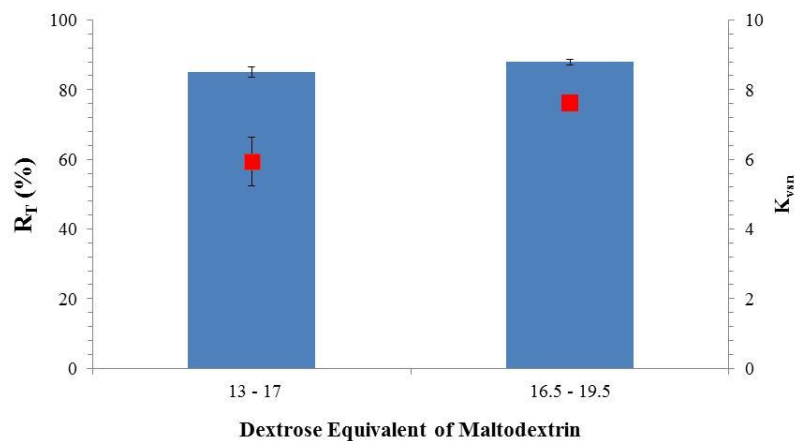
**Figure 8:** Viscosity (a) and density (b) of the coexisting phases of the ATPS formed by ACN (35 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (35 wt%) + water (30 wt%) at 283.15 – 243.15 K and 0.10 MPa: ● - top phase and ● - bottom phase. Dashed line is the adjusted equation.



**Figure 1.** Chemical structure of ATPS phase-forming constituents: (a) maltodextrin and (b) acetonitrile; and target extracted biomolecule: (c) vanillin.

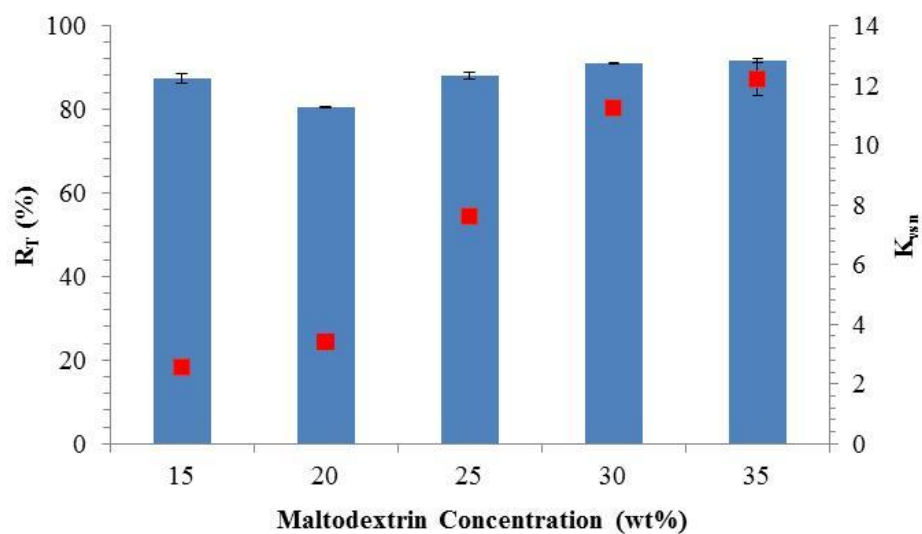


**Figure 2:** Binodal curves of ternary systems constituted by ACN + water + carbohydrates at 298.15 K and 0.10 MPa. ■ – D-glucose and ■ – sucrose [37]; ■ - dextran 6,000 and ■ dextran 100,000 [38]; ■ - maltodextrin DE 13-17 and ■ - maltodextrin DE 16.5-19.5.

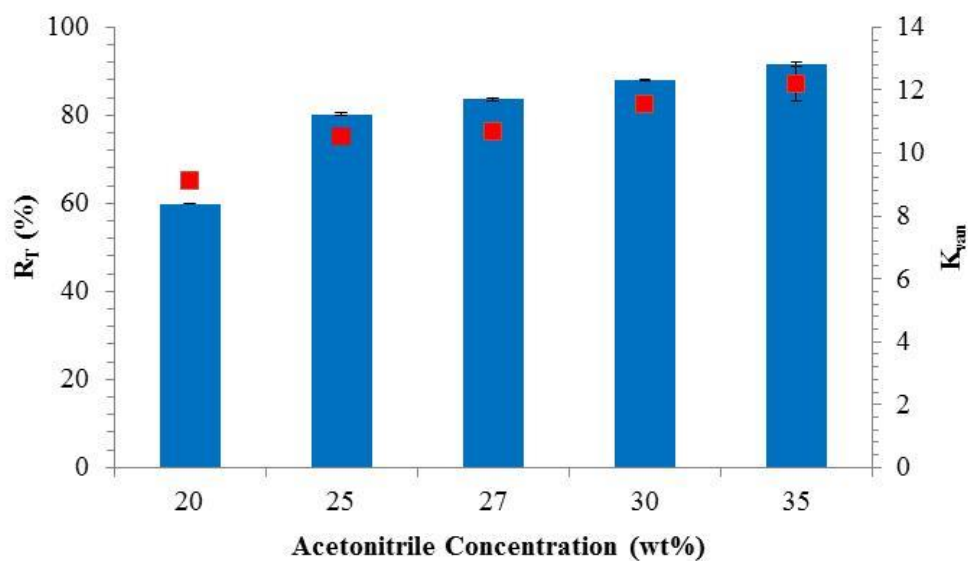


**Figure 3:** Effect of dextrose equivalent of maltodextrin in the vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin (25 wt%) + water (40 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa.

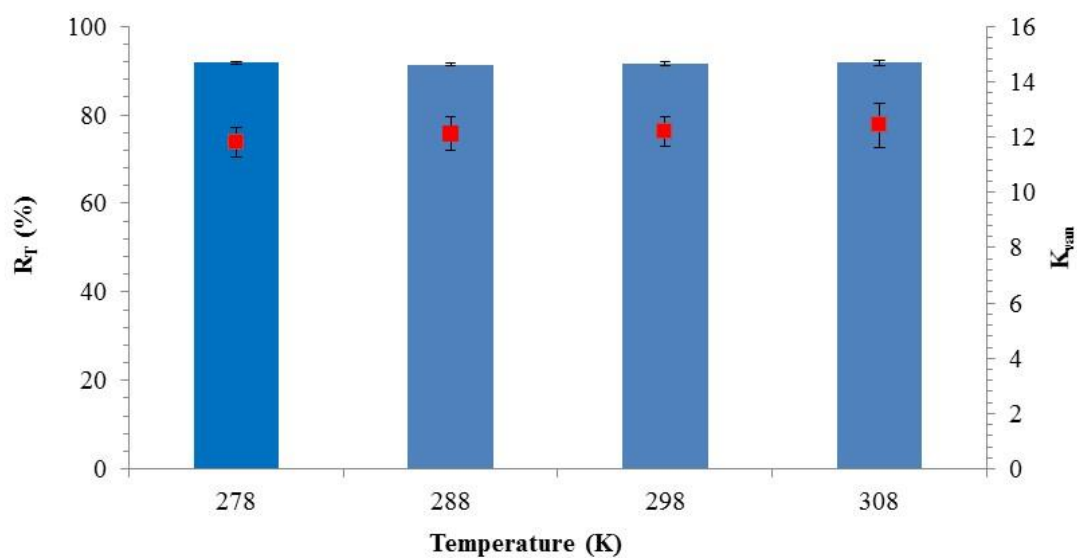
■ - recovery in the top phase and ■ - partition coefficient.



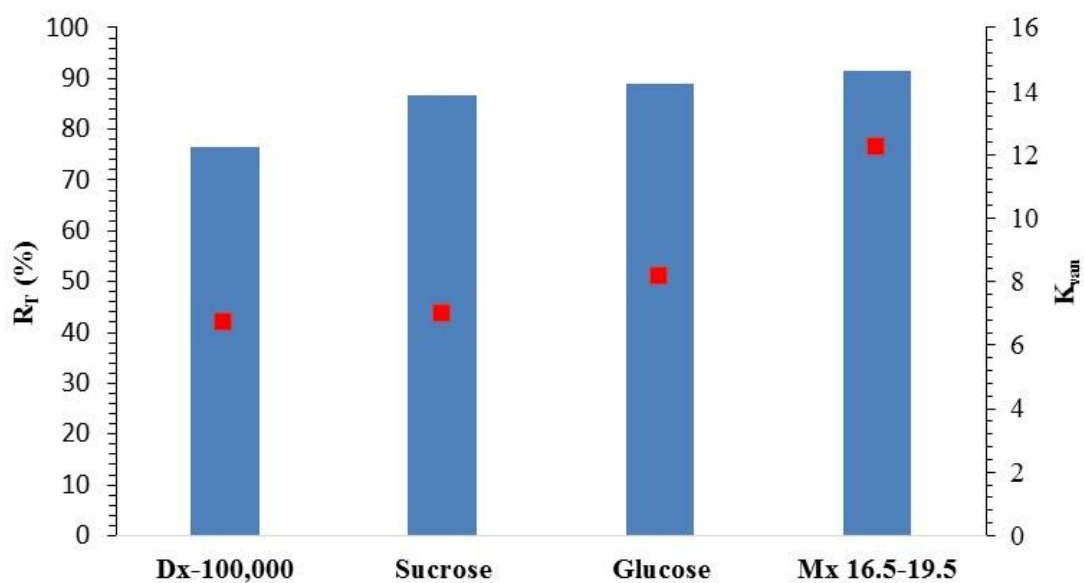
**Figure 4:** Effect of maltodextrin concentration (DE 16.5 – 19.5) in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa. ■ - recovery in top phase and ■ - partition coefficient.



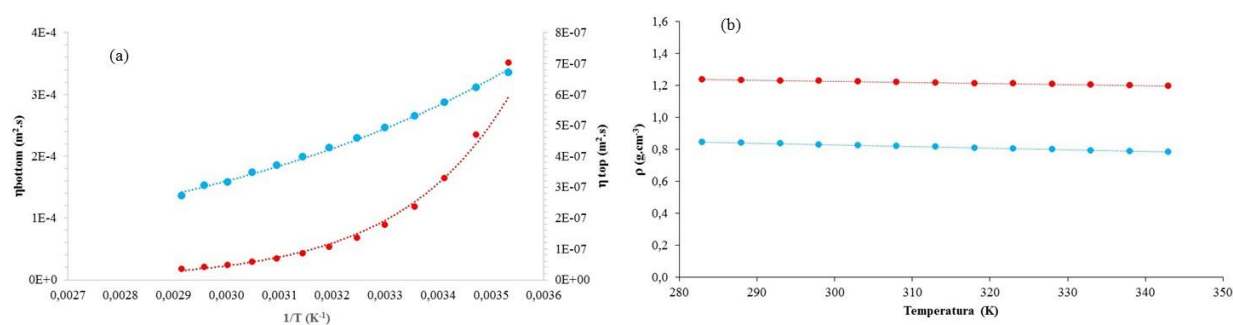
**Figure 5:** Effect of acetonitrile concentration in vanillin partitioning using ATPS based on maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa. ■- recovery in top phase and ■- partition coefficient.



**Figure 6:** Effect of temperature (278.15 – 308.15 K) in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 0.10 MPa. ■- recovery in top phase and ■- partition coefficient.



**Figure 7:** Partition coefficient and recovery of vanillin in the top phase (ACN-rich phase) in different ATPS based on acetonitrile and different carbohydrates (dextran [38]); glucose and sucrose [37]; maltodextrin – this work) at 298.15 K and 0.10 MPa.



**Figure 8:** Viscosity (a) and density (b) of the coexisting phases of the ATPS formed by ACN (35 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (35 wt%) + water (30 wt%) at 283.15 – 243.15 K and 0.10 MPa: ● - top phase and ● - bottom phase. Dashed line is the adjusted equation.

**Table 1.** Correlation parameters of Eq. (1) used to described the experimental binodal data for system based on acetonitrile and maltodextrins at 298.15 K and 0.1 MPa<sup>a</sup>, and respective standard deviation ( $\sigma$ ) and regression coefficient ( $R^2$ ).

DE of Maltodextrin	Parameters and Regression Coefficient			$R^2$
	$A \pm \sigma$	$B \pm \sigma$	$C \pm \sigma$	
13-17	$35.5 \pm 0.2$	$-0.059 \pm 0.002$	$8.2 (\pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.9944
16.5-19.5	$34.5 \pm 0.3$	$-0.048 \pm 0.003$	$9.1 (\pm 0.4) \times 10^{-6}$	0.9972

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 1$  K, and  $u(P) = 10$  kPa.

**Table 2.** Correlation parameters of Eq. (5) and Eq (6) used to described the temperature dependence of density and viscosity for each phase for system based on ACN (35 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (35 wt%) + water (30 wt%) at 283.15 – 243.15 K and 0.10 MPa<sup>a</sup>, and respective and regression coefficient ( $R^2$ ).

Parameters and Regression Coefficient	Top Phase	Bottom Phase
Density		
a	1.14	1.42
b	-0.001	-0.0007
$R^2$	0.999	0.999
Viscosity		
$A_1$	$4 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-11}$
$E_a$	1,421	40,029
$R^2$	0.9969	0.9922

## DATA IN BRIEF

### **Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies**

Isabela N. Souza<sup>a</sup>, Cleide M. F. Soares<sup>a,b</sup>, Ranyere L. Souza<sup>a,b</sup>, Mara G. Freire<sup>c</sup>, Álvaro Silva Lima<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brazil

<sup>c</sup>CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro, Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

\*corresponding author

E-mail: alvaro\_lima@itp.org.br; Phone: +55 7932182115; Fax: +55 7932182190.



## Abstract

This paper contains the experimental data related to the research paper entitled “Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies”, namely data of phase equilibria and partition coefficients of vanillin.

## Specifications Table

Subject area	<i>Chemical Engineering</i>
More specific subject area	<i>Separation Science.</i>
Type of data	<i>Table and figure</i>
How data was acquired	<i>Liquid-liquid equilibrium data were determined gravimetrically at <math>298.15 \pm 1.00</math> K and <math>0.10 \pm 0.01</math> MPa using the cloud point method</i>
Data format	<i>Raw (Tables DB1, DB2, DB3, DB4, DB5, DB6, DB7 and DB8; Figure DB2 and DB3)</i>
Experimental factors	<i>Calculations performed by mass balance</i>
Experimental features	<i>Mass balance</i>
Data source location	<i>Aracaju-Sergipe, Brazil</i>
Data accessibility	<i>With this article.</i>
Related research article	<i>Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: phase diagrams and partitioning studies</i>

## **Value of the Data**

- The liquid-liquid equilibrium data for the proposed systems are not yet presented in the literature.
- The data can help in the choice of mixture compositions to carry out extraction/separation experiments.
- The data of partition coefficients allow the address the potential of the proposed systems to act as separation platforms.
- Data for the viscosity and density of the coexisting phases are essential to address the scale-up potentiality of the studied systems.

## **Data**

Table DB1 describes the reagents used and their purity. Table DB2 provides the equilibrium data for systems formed by maltodextrin (1), acetonitrile – ACN (2) and H<sub>2</sub>O (3), obtained at 298.15 K and 0.1 MPa, while Figure DB2 presents the binodal curves of the ternary systems in an orthogonal representation. Tables DB3-DB7 show the partition coefficients and recovery values of vanillin in the top phase of the systems studied at different operating conditions. Table DB8 provides the density and viscosity of the ATPS coexisting phases for a given mixture composition: Maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) + ACN (35 wt%) + H<sub>2</sub>O (30 wt%) at 298.15 K and 0.1 MPa.

Figure DB1 depicts the correlation between the molecular weight and dextrose equivalent value of maltodextrin from different matrices. Figure DB2 shows the phase diagrams of the ternary systems formed by maltodextrin + acetonitrile + water. Figure DB3 shows the van't Hoff plot.

**Table DB1:** Description of chemical reagents

Chemical Name	Source	Initial Mass Fraction Purity	Purification Method
Maltodextrin 13-17 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich	Commercial	none
Maltodextrin 16.5-19.5 <sup>a</sup>	Sigma-Aldrich	Commercial	none
Acetonitrile	Sigma-Aldrich	99.9	none
Vanillin	Sigma-Aldrich	> 99	none

<sup>a</sup> Maltodextrins were commercially acquired from Sigma-Aldrich (products catalogue numbers 419680 and 419699).

**Table DB2.** Experimental binodal mass fraction percentage data for the system composed of Maltodextrin (1) + acetonitrile (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.<sup>a</sup>

Maltodextrin 13-17			Maltodextrin 16.5-19.5		
Mx (100w <sub>1</sub> )	ACN (100w <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O (100w <sub>3</sub> )	Mx (100w <sub>1</sub> )	ACN (100w <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O (100w <sub>3</sub> )
29.67	20.43	49.90	29.48	20.81	49.70
28.48	21.07	50.45	27.93	21.60	50.47
27.58	21.93	50.49	26.59	22.70	50.71
26.50	22.54	50.96	25.00	23.60	51.40
24.94	23.24	51.82	23.60	24.18	52.22
24.17	23.82	52.01	22.43	24.99	52.58
22.81	24.49	52.69	21.23	25.31	53.46
21.56	25.02	53.41	20.23	25.64	54.13
20.66	25.45	53.90	19.62	26.02	54.36
20.06	25.70	54.24	18.77	26.41	54.82
19.44	25.82	54.74	17.89	26.76	55.34
18.92	26.12	54.96	17.32	26.84	55.84
18.22	26.56	55.22	16.82	27.33	55.85
17.30	26.69	56.01	15.82	27.51	56.67
16.62	26.91	56.46	14.95	27.61	57.44
16.07	27.22	56.71	14.39	27.90	57.71
15.23	27.44	57.33	13.72	28.16	58.12
14.61	27.73	57.66	13.04	28.30	58.66
13.66	28.15	58.19	12.25	28.46	59.29
12.58	28.33	59.09	11.65	28.79	59.56
11.81	28.72	59.47	10.96	29.01	60.03
11.21	28.81	59.98	10.40	29.06	60.53
10.58	29.09	60.33	9.90	29.24	60.86
9.94	29.35	60.71	9.44	29.25	61.30
9.37	29.58	61.05	9.08	29.64	61.28
8.77	29.67	61.56	8.61	29.73	61.66
8.24	29.51	62.25	8.16	30.07	61.78

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u([Mx], [ACN] \text{ or } [H_2O]) = 0.01$ ,  $u(T) = 1 \text{ K}$ , and  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ .

**Table DB2 cont.:** Experimental binodal mass fraction percentage data for the system composed of Maltodextrin (1) + acetonitrile (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.<sup>a</sup>

Maltodextrin 13-17			Maltodextrin 16.5-19.5		
Mx (100w <sub>1</sub> )	ACN (100w <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O (100w <sub>3</sub> )	Mx (100w <sub>1</sub> )	ACN (100w <sub>2</sub> )	H <sub>2</sub> O (100w <sub>3</sub> )
7.82	29.75	62.44	7.62	30.32	62.06
7.360	29.740	62.91	7.09	30.35	62.56
7.03	29.98	63.00	6.67	30.45	62.87
6.68	30.22	63.10			
6.32	30.18	63.50			
5.96	30.36	63.68			
5.62	30.74	63.63			
5.24	31.11	63.64			
4.89	30.88	64.23			
4.61	30.94	64.45			
4.32	31.19	64.49			
4.04	31.02	64.94			
3.77	31.20	65.03			
3.55	31.41	65.04			
3.22	31.92	64.85			
2.91	32.04	65.05			
2.64	32.20	65.16			
2.35	32.38	65.26			
2.08	33.21	64.71			
1.79	33.30	64.90			
1.58	33.38	65.05			
1.40	33.43	65.16			
1.27	33.48	65.25			

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u([Mx], [ACN] \text{ or } [H_2O]) = 0.01$ ,  $u(T) = 1 \text{ K}$ , and  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ .

**Table DB3.** Effect of dextrose equivalent of maltodextrin in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin (25 wt%) + water (40 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa.<sup>a</sup>

DE	$K_{van} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$
13 - 17	$5.9 \pm 0.7$	$85 \pm 1$
16.5 - 19.5	$7.6 \pm 0.1$	$87.8 \pm 0.8$

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 0.02 \text{ K}$ , and  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ .

**Table DB4.** Effect of maltodextrin concentration (DE 16.5 – 19.5) in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa.<sup>a</sup>

Mx (wt%)	$K_{van} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$
15	$2.58 \pm 0.06$	$87 \pm 1$
20	$3.4 \pm 0.1$	$80.45 \pm 0.04$
25	$7.7 \pm 0.1$	$87.9 \pm 0.8$
30	$11.22 \pm 0.07$	$91.0 \pm 0.1$
35	$12.2 \pm 0.5$	$91.6 \pm 0.1$

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 0.02 \text{ K}$ , and  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ .

**Table DB5.** Effect of acetonitrile concentration in vanillin partitioning using ATPS based on maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa<sup>a</sup>.

ACN (wt%)	$K_{van} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$
20	$9.1 \pm 0.3$	$59.81 \pm 0.01$
25	$10.5 \pm 0.2$	$80.3 \pm 0.2$
27	$10.670 \pm 0.001$	$83.6 \pm 0.3$
30	$11.6 \pm 0.2$	$88.0 \pm 0.3$
35	$12.2 \pm 0.5$	$91.6 \pm 0.5$

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 0.02$  K, and  $u(P) = 10$  kPa.

**Table DB6.** Effect of temperature in vanillin partitioning using ATPS based on ACN (35 wt%) + maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 0.10 MPa<sup>a</sup>.

T (K)	$K_{van} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$
278.15	$11.8 \pm 0.5$	$91.7 \pm 0.2$
288.15	$12.1 \pm 0.6$	$91.4 \pm 0.3$
298.15	$12.2 \pm 0.5$	$91.6 \pm 0.5$
308.15	$12.4 \pm 0.8$	$91.8 \pm 0.6$

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 0.02$  K, and  $u(P) = 10$  kPa.

**Table DB7.** Vanillin partitioning using different ATPS at 298.15 K and 0.10 MPa<sup>a</sup>.

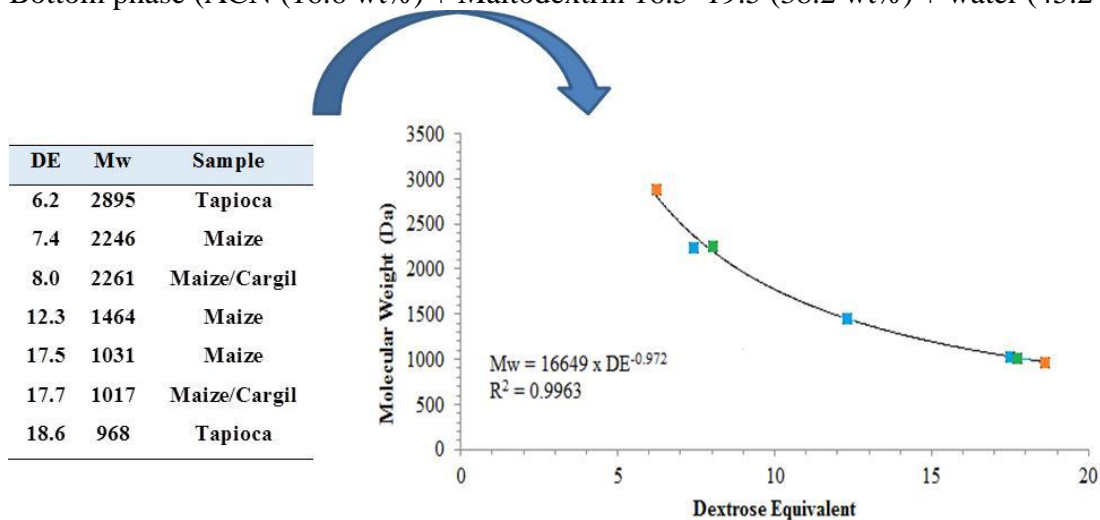
ACN (wt%)	Constituent (wt%)	$K_{van} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$
30	Dx-100,000 (18 wt%) <sup>b</sup>	$6.7 \pm 0.2$	$76.6 \pm 0.2$
40	Sucrose (20 wt%) <sup>c</sup>	$6.95 \pm 0.03$	$86.83 \pm 0.04$
40	Glucose (20 wt%) <sup>c</sup>	$8.15 \pm 0.01$	$89.07 \pm 0.02$
35	Mx 16.5 – 19.5 (35 wt%)	$12.2 \pm 0.5$	$91.6 \pm 0.5$

<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(T) = 0.02$  K, and  $u(P) = 10$  kPa; <sup>b</sup> [1] and <sup>c</sup> [2]

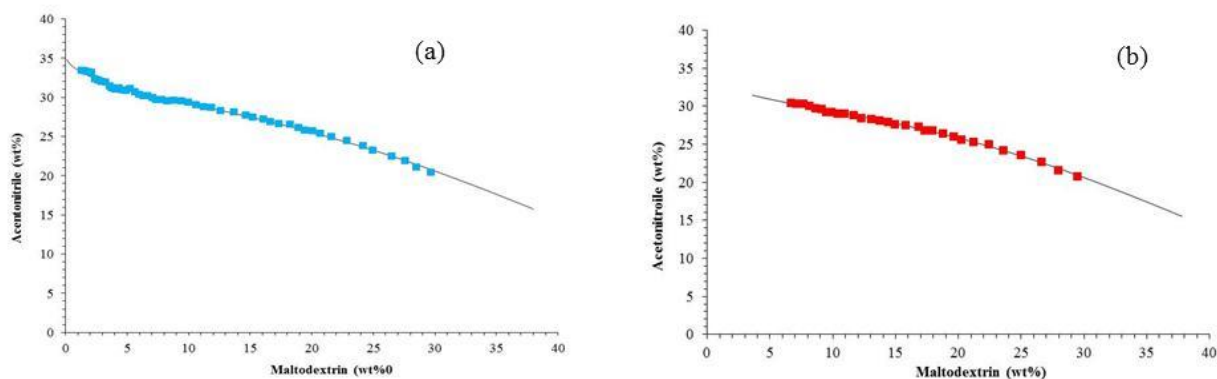
**Table DB8.** Experimental density ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) and kinematic viscosity ( $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) of the coexisting phases of the ATPS based on ACN (35 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (35 wt%) + water (30 wt%) at 298.15 K and 0.10 MPa<sup>a</sup>.

Temperature K	Density / $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$		Viscosity / $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$	
	Top Phase	Bottom Phase	Top Phase	Bottom Phase
283	0.8444	1.2361	$6.70 \times 10^{-7}$	$3.51 \times 10^{-4}$
288	0.8394	1.2331	$6.22 \times 10^{-7}$	$2.34 \times 10^{-4}$
293	0.8344	1.2302	$5.74 \times 10^{-7}$	$1.65 \times 10^{-4}$
298	0.8295	1.2271	$5.31 \times 10^{-7}$	$1.18 \times 10^{-4}$
303	0.8245	1.2240	$4.93 \times 10^{-7}$	$8.83 \times 10^{-5}$
308	0.8195	1.2208	$4.58 \times 10^{-7}$	$6.79 \times 10^{-5}$
313	0.8143	1.2175	$4.26 \times 10^{-7}$	$5.33 \times 10^{-5}$
318	0.8092	1.2142	$3.97 \times 10^{-7}$	$4.26 \times 10^{-5}$
323	0.8040	1.2108	$3.70 \times 10^{-7}$	$3.45 \times 10^{-5}$
328	0.7988	1.2073	$3.47 \times 10^{-7}$	$2.84 \times 10^{-5}$
333	0.7934	1.2038	$3.17 \times 10^{-7}$	$2.37 \times 10^{-5}$
338	0.7880	1.2002	$3.06 \times 10^{-7}$	$2.00 \times 10^{-5}$
343	0.7826	1.1965	$2.72 \times 10^{-7}$	$1.71 \times 10^{-5}$

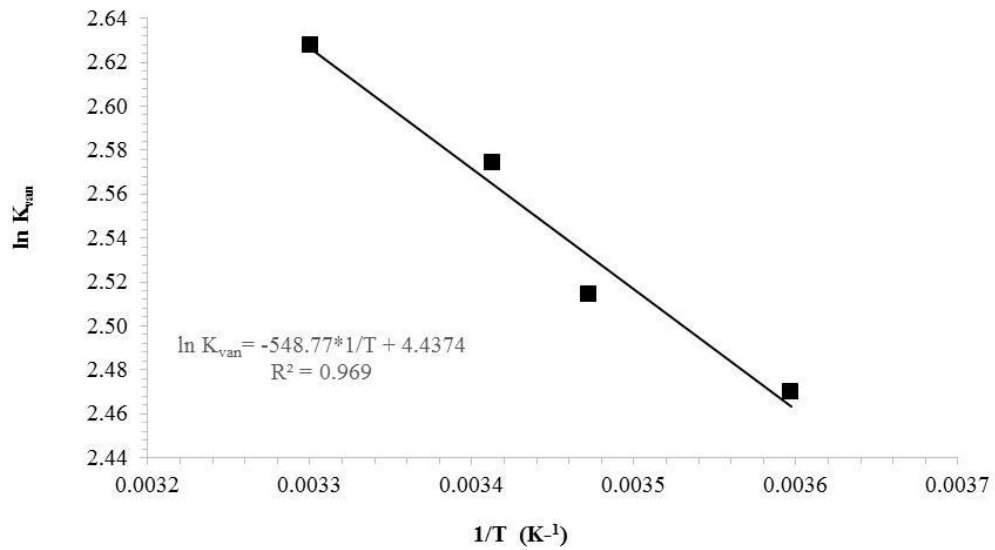
<sup>a</sup> Standard uncertainties:  $u(\rho) = 5 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ,  $u(\eta) = 0.35\%$ ,  $u(T) = 0.02 \text{ K}$ , and  $u(P) = 10 \text{ kPa}$ . Top phase (ACN (65.2 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (29.8 wt%) + water (5.0 wt%)). Bottom phase (ACN (16.6 wt%) + Maltodextrin 16.5–19.5 (38.2 wt%) + water (45.2 wt%))



**Figure DB1.** Correlation between molecular weight and dextrose equivalent values of maltodextrin from different matrices. ■ - Tapioca; ■ - Maize and ■ - maize from Cargil. [3]



**Figure DB2.** Binodal curves fitting by equation (1) of the ATPS constituted by ACN + water + maltodextrin at 298.15 K and 0.10 MPa. (a) maltodextrin DE 13-1 (■) and (b) maltodextrin DE 16.5-19.5 (■).



**Figure DB3.** Van't Hoff plot for vanillin partition in ATPS constituted by ACN (35 wt%) + maltodextrin 16.5-19.5 (35 wt%) at 0.10 MPa.

## References

- [3] Y. Rong, M. Sillick, C.M. Gregson, Determination of dextrose equivalent value and number average molecular weight of maltodextrin by osmometry, *J. Food Sci.* 74 (2009) C33-C40.