

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ATIVOS DA
CASCA DA FRUTA JABUTICABA UTILIZANDO SISTEMAS
ORGÂNICOS BIFÁSICOS**

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ATIVOS DA
CASCA DA FRUTA JABUTICABA UTILIZANDO SISTEMAS
ORGÂNICOS BIFÁSICOS**

Autor: Msc. Bruno Sales de Oliveira

Orientadores: Dr. Álvaro Silva Lima.

Dr^a. Cleide Mara Faria Soares.

Dr. Ranyere Lucena de Souza

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ATIVOS DA CASCA DA FRUTA
JABUTICABA UTILIZANDO SISTEMAS ORGÂNICOS BIFÁSICOS

Bruno Sales de Oliveira

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

Aprovada por:


Prof. Dr. Alvaro Silva Lima (Orientador PEP/UNIT)


Prof.ª Dr.ª Cleide Maria Faria Soares (Orientadora PEP/UNIT)


Prof. Dr. Ranyere Lucena de Souza (Co-Orientador PEP/UNIT)


Prof.ª Dr.ª Odélsia Leonor Sanchez de Alsina (Examinadora Interna PEP/UNIT)


Prof.ª Dr.ª Isadora Monteiro Andrade Barreto (Examinadora Interna PEP/PNPD)


Prof.ª Dr.ª Adriana Karla de Lima (Examinadora Externa UNIT)


Prof. Dr. Antônio Manoel da Cruz Rodriguez (Examinador Externo UFPA)

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Bruno Sales de

O48e Extração e purificação de biocompostos ativos da casca da fruta jabuticaba utilizando sistemas orgânicos bifásicos / Bruno Sales de Oliveira; orientação [de] Prof.º Dr.º Álvaro Silva Lima, Prof.ª Dr.ª Cleide Mara Faria Soares, Prof.º Dr.º Ranyere Lucena de Souza – Aracaju: UNIT, 2018.

129 f. il.: 30cm

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) Universidade Tiradentes 2018

1. Jabuticaba. 2. Antocianinas. 3 Extração. 4. Purificação. 5. Sistema orgânico bifásico I. Oliveira, Bruno Sales de. II. Lima, Álvaro Silva. (orient.) III. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.) IV. Souza, Ranyere Lucena de. (orient.) V. Universidade Tiradentes. VI. Título.

CDU 606:582.883

“Lutar sempre, vencer talvez, desistir jamais”
(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me guiar, iluminar meu caminho, me proteger e me conceder força, paciência e sabedoria diante das inúmeras dificuldades hoje superados e assim merecer o título de Doutor. Obrigado Senhor por cada dia de trabalho intenso no laboratório, foram quatro anos que me renderam experiência não somente profissional, mas também pessoal.

Aos meus pais, Gleuse e em especial ao meu querido pai Moisés, exemplo de homem em que me espelho e que hoje se encontra no mundo espiritual. Aos meus irmãos, Patrícia e Fábio. A minha querida esposa Wecsilane pela paciência nos momentos de ausência em casa e por ter cuidado do meu amado filho Gustavo. Por fim, agradeço por todo amor, sabedoria, apoio incondicional que me transmitiram durante toda esta jornada e por me mostrar durante os momentos de dificuldade que eu era capaz de superá-los. Vocês são meu porto seguro, minha vida. Amo vocês!

À minha família acadêmica, Rita, Acenine, Nilmara e Gilderlan, agradeço a Deus por ter tido a honra e oportunidade de poder conviver com vocês. Levarei para sempre comigo nossa amizade, a paciência, lição de otimismo e ensinamentos que me transmitiram ao longo de minha vida acadêmica (doutorado). Jamais esquecerei: Amo vocês!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, em especial, meus orientadores o professor Álvaro Silva Lima, a professora Cleide Mara Faria Soares e o professor Ranyere Lucena de Souza, agradeço pela orientação, paciência e por sempre me darem força nos momentos de fraqueza.

À equipe do Instituto de Pesquisa e Tecnologia, do laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA), agradeço pela convivência diária, momentos de descontração e troca de conhecimento. Em especial, Acenini, Felipe, Nilmara, Gilderlan e Anderson, enfim a todos que compõem o LPA sintam-se homenageados.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e considerações.

À UNIT pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigado a todos!

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

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS ATIVOS DA CASCA DA FRUTA JABUTICABA UTILIZANDO SISTEMAS ORGÂNICOS BIFÁSICOS

Bruno Sales de Oliveira

Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) é um fruto encontrado em várias regiões do Brasil, rico em compostos fenólicos como antocianinas (ANT), as quais pertencem ao grupo dos flavonoides. Estes compostos são encontrados em maiores quantidades na casca de frutas e apresentam propriedades antioxidantes de uso terapêutico e industrial. Portanto, é importante estudar e desenvolver técnicas de extração e purificação destes biocompostos que sejam rápidas e com alta eficiência. Este trabalho teve o objetivo de extrair e purificar as ANT da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), utilizando métodos de extração convencionais e não convencionais, seguido de processo de purificação utilizando sistemas orgânicos bifásicos (SOB) formado por acetonitrila (ACN), água e polivinilpirrolidona (PVP) de diferentes massas moleculares. As extrações foram realizadas utilizando ACN como solvente extrator a frio e a quente por meio de método convencional em banho maria com agitação e não convencionais assistidos por ultrassom e por micro-ondas, para os quais as condições operacionais dos métodos foram otimizadas. Na etapa de purificação por SOB, foram construídos os diagramas de fases a 25°C e avaliados os efeitos do tipo e concentração dos componentes dos sistemas orgânicos bifásicos sobre a partição dos compostos fenólicos em especial as antocianinas. O método assistido por ultrassom foi considerado a melhor técnica de extração das ANT extraindo 2,6 mg de cianidina-3-glicosídeo/g de casca de jabuticaba. Os estudos com SOB mostraram que as ANT migram preferencialmente para a fase de topo (rica em acetonitrila) e que os contaminantes para a fase de fundo (rica em PVP). O sistema formado por PVP de massa molecular 10.000 g/mol foi o sistema mais seletivo ($S = 3,12$; $K_{ANT} = 1,56$; $R_T = 75,67\%$) em separar e purificar as antocianinas a partir de sua fonte natural a jabuticaba.

Palavras-chave: Jabuticaba, antocianinas, extração, purificação, sistema orgânico bifásico.

Abstract of the thesis presented to the Post-Graduation Program in Process Engineering of Tiradentes University as part of the requirements for the Doctor degree in Engineering Processes.

EXTRACTION AND PURIFICATION OF ACTIVE BIOCOMPOSTS OF THE FRUIT JABUTICABA PEEL USING ORGANIC TWO-PHASE SYSTEMS

Bruno Sales de Oliveira

Jaboticaba is a fruit found in several regions of Brazil rich in anthocyanins (ANT) that are phenolic compounds belonging to the group of flavonoids, which are found in larger quantities in the peel, which have antioxidant properties for therapeutic and industrial use. Thus, it is important to study and develop techniques for extracting and purifying these biocomposites that are fast and with high efficiency. The objective of this work was to extract and purify the ANT of the peel of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*), using conventional and non-conventional extraction methods, followed by a purification process using organic two-phase system (OTPS) formed by acetonitrile (ACN) and polyvinylpyrrolidone (PVP) of different molecular weights. The extractions were carried out using ACN as cold and hot extractive solvent by means of conventional method in agitation and unconventional, ultrasonic and microwave assisted mixing where the operating conditions of the methods were optimized and for the purification step by SOB, the phase diagrams were constructed at 25 °C and the effects of the type and concentration of the components of the two-phase systems on the partitioning of phenolic compounds, in particular anthocyanins, were evaluated. The ultrasound-assisted method was considered the best technique for extraction of ANT by extracting 2.6 mg of cyanidin-3-glucoside.g⁻¹ of jaboticaba peel. The OTPS studies showed that the ANT preferentially migrate to the top phase (rich in acetonitrile) and that the contaminants to the bottom phase (PVP rich) where the system formed by PVP of molecular weight 10.000 g.mol⁻¹ was the most selective system ($S = 3.12$; $K_{ANT} = 1.56$; $R_T = 75.67\%$) was used to separate and purify the anthocyanins from their natural source to jaboticaba.

Keywords: Jaboticaba, anthocyanins, extraction, purification, organic two-phase system.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE SIGLAS.....	xv
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS.....	3
2.1. GERAL.....	3
2.2. ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO III	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 JABUTICABA	4
3.2 FLAVONÓIDES	6
3.2.1 Antocianinas.....	8
3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.....	11
3.3.1 Métodos Convencionais.....	14
3.3.2 Métodos Não Convencionais.....	15
3.3.2.1 Extração Assistida por Ultrassom (EAU).....	16
3.3.2.2 Extração Assistida por Micro-Ondas (EAM).....	18
3.3.3 Sistema Aquoso Bifásico.....	21
CAPÍTULO IV	
ARTIGO I.....	30
ORGANIC TWO-PHASE SYSTEM BASED ON ACETONITRILE + WATER + POLYVINILPIRROLIDONE: A NOVEL CONCEPT OF LIQUID-LIQUID EQUILIBRIUM: PHASE DIAGRAMS AND PHENOLIC COMPOUNDS PARTITIONING.....	30
ARTIGO II.....	61
SEQUENTIAL EXTRACTION OF ANTHOCYANINS FROM JABUTICABA (MYRCIARIA CAULIFLORA) USING NON-CONVENTIONAL PROTOCOLS FOLLOWED BY PURIFICATION BASED ON ORGANIC TWO-PHASE SYSTEM.....	61
CAPÍTULO V	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
TRABALHOS APRESENTADOS.....	100
TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

Figura 3.1: Aspectos dos frutos da <i>Myrciaria cauliflora</i>	5
Figura 3.2: Estrutura química básica de um flavonoide, sendo composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).....	7
Figura 3.3: Estruturas químicas dos principais flavonoides.....	7
Figura 3.4: Estruturas químicas de flavonoides na forma livre e glicosiladas.....	8
Figura 3.5: Estrutura química do cátion flavílico.....	9
Figura 3.6: Biossíntese das antocianinas.....	9
Figura 3.7: Antocianinas relatadas em <i>Myrciaria cauliflora</i>	11
Figura 3.8: Representação esquemática dos efeitos do processo de extração assistida por ultrassom sobre a matriz vegetal.....	17
Figura 3.9: Configurações típicas de extratores.....	18
Figura 3.10: Espectro eletromagnético.....	19
Figura 3.11: Esquema de aquecimento de amostra através do método convencional por condução (a) e do não-convencional por micro-ondas (b).....	19
Figura 3.12: Estrutura química da ACN.....	23
Figura 3.13: Estrutura química do PVP.....	24
Figura 3.14: Diagrama de fases para sistema aquoso bifásico, expresso em coordenada retangular.....	24

CAPÍTULO IV

ARTIGO I

Figure 1: Structure of OTPS' constituents and target biomolecules.....	33
Figure 2: Binodal curves for ternary systems composed of acetonitrile + PVP + H ₂ O at 298 ± 1 K and 0.1 ± 0.01MPa. ■ - PVP 10.000 gmol ⁻¹ ; ■ - PVP 29.000 gmol ⁻¹ ; ■ - PVP 40.000 gmol ⁻¹	37
Figure 3: Experimental density (a and b) and viscosity (c and d) for different organic two-phase system at different temperatures (283.15 – 338.15 K) and 0.10 ± 0.01 MPa. ■ - system A, ■ - system B, and ■ - system C -.....	41

Figure 4: Partition coefficient (a) and extraction efficiency (b) of cyanidin-3-glucoside (0.2 mg/L), quercetin (100 mg/L) and gallic acid (600 mg/L) in a system formed by + acetonitrile + water at 298 ± 1 K) and 0.10 ± 0.01 MPa.. (■) - PVP $10.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (System A); (■) - PVP $29.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (Systema B), and (■) - PVP $40.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (System C).....42

ARTIGO I - DATA IN BRIEF

Figure DB1: Phase diagrams for ternary systems composed of acetonitrile + PVP + water at 298.15 K and 0.1 MPa. (a) PVP 10.000 gmol^{-1} ; (b) PVP 29.000 gmol^{-1} ; (c) PVP 40.000 gmol^{-1} 57

Figure DB2: Chemical structure of cyanidin-3-O-glucoside at different pH values.....58

Figure DB3: Chemical structure of gallic acid at different pH values.....59

Figure DB4: Chemical structure of quercetin at different pH values.....60

ARTIGO II

Figure 1: Chemical structures of anthocyanins reported in jabuticaba.....64

Figure 2: Extraction of phenolic compounds from the peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) using water bath agitation. (a) effect of the solvent concentration: S/L of 100 mg.mL^{-1} , temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and time 120 minutes; (b) effect of S/L: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and time 120 minutes; (c) effect of temperature: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} and time 120 minutes; (d) effect of time: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} and temperature $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).....74

Figure 3: Extraction of phenolic compounds from the peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) using ultrasound. (a) effect of the power of the equipment: acetonitrile at 60% (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , temperature $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and time 120 minutes; (b) temperature effect: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and time 120 minutes; (c) effect of time: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and $35 \text{ }^\circ\text{C}$ temperature. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).....76

Figure 4: Extraction of phenolic compounds from the peel of jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) using microwave. a) effect of the power of the equipment: acetonitrile at 60% (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and time 5 minutes; (b) effect of temperature: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and time 5 minutes; (c) time effect: acetonitrile at 60% (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).....78

Figure 5: Acetonitrile extractive capacity against other organic solvents in extracting phenolic compounds from the jaboticaba peel using ultrasonic assisted extraction. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).....80

ARTIGO II - SUPPORTING INFORMATION

Figure S1: Identification and quantification of anthocyanins from extracts obtained by the ultrasound-assisted extraction method (UAE). Chromatographic conditions: isocratic method; mobile phase: water/acetic acid/acetonitrile (90:5:5) v/v; column C18; column temperature at 35 °C; injection volume 20 microlitres/min; running time 40 min.....97

Figure S2: Confirmation of the extract anthocyanins obtained by the ultrasound-assisted extraction method (UAE). (a) Cyanidin-3-O-glucoside chloride standard added to the extract; (b) Delphinidin-3-O-glucoside chloride standard added to the extract. Chromatographic conditions: isocratic method; mobile phase: water/acetic acid/acetonitrile (90:5:5) v/v; column C18; column temperature at 35 °C; injection volume 20 microlitres/min; running time 40 min.....98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 3.1: Composição nutricional da *Myrciaria culiflora* por 100 g de fruta.....6

Tabela 3.2: Métodos e parâmetros de extrações convencionais e não convencionais de antocianinas.....13

Tabela 3.3: Exemplos de tipos e composição do sistema aquoso bifásico.....22

CAPÍTULO IV

ARTIGO I

Table 1: Regression parameters (A, B and C) and corresponding standard deviation (σ), obtained by Merchuk's equation and correlation coefficients (R^2), for the ternary systems composed of PVP + ACN + water at 298.15 K and 0.1 MPa.....38

Table 2: Mass fraction composition for the tie-lines (TLs) and respective tie-line lengths (TLLs), and critical points (Pc) for ATPS composed of ACN + PVP of different molecular weights (10.000, 29.000 and 40.000 g.mol⁻¹) + H₂O at 298.15 K and 0.1 MPa.....39

Table 3: Parameter values of fitting parameters of Othomer-Tobias and Bancroft equation for the system composed of acetonitrile + PVP + water and correlation coefficients (R^2) at 298.15 K and 0.1 MPa.....40

Table 4: pH values of phase of water (top) and polyvinylpyrrolidone (bottom) at 298.15 K and 0.1 MPa.....43

Table 5: Selectivity of separation of cyanidin-3-O-glycoside using organic two-phase system in system content gallic acid and quercetin at 298.15 K and 0.1 MPa.....45

ARTIGO I – DATA IN BRIEF

Table DB1: Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP 10.000 g.mol⁻¹ (1) + acetonitrile (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.....50

Table DB2: Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP 29.000 g.mol⁻¹ (1) + acetonitrile (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.....51

Table DB3: Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP 40.000 g.mol⁻¹ (1) + acetonitrile (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.....52

Table DB4: Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System A consists of 12.05 wt% PVP ($10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 62.05 wt% ACN + 25.90 wt% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.....53

Table DB5: Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System B consists of 9.02 wt% PVP ($29.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 59.02 wt% ACN + 31.96 wt% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.....54

Table DB6: Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System C consists of 8.89% PVP ($29.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 58.89% ACN + 32.22% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.....55

Table DB7: Partitioning coefficient and extraction efficiency of biocompounds at 298.15 K and 0.1 MPa.....56

ARTIGO II

Table 1: Energy consumption (kwh) and extraction yield (%) in each method.....79

Table 2: Effect of PVP concentration on the separation and purification of anthocyanins using OTPS formed of ACN (64 wt%) and water at 25 °C and 0.1 MPa.^a.....82

Table 3: Effect of water content on the separation and purification of anthocyanins using OTPS formed of PVP (6 wt%) and ACN at 25 °C and 0.1 MPa.^a.....82

Table 4: Selectivity of the separation of anthocyanins using organic two-phase system with 6% PVP, 64% acetonitrile at different temperatures and 0.1 MPa^a.....83

ARTIGO II - SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Effect of operational condition in the stirring in water bath extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel.....93

Table S2: Effect of operational condition in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by ultrasound.....94

Table S3: Effect of operational condition in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by microwave).....95

Table S4: Effect of different solvents in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by ultrasound.....96

LISTA DE SIGLAS

[PVP]: Polivinilpirrolidona

[ACN]: Acetonitrila

[ANT]: Antocianinas

A, B, C, a, b, c, d, e, f: Constante de correlação das equações empíricas

SAB/ATPS: Sistema aquoso bifásico

SOB/OTPS: Sistema orgânico bifásico

C_T ou F: Concentração na fase de topo ou fundo (g/L)

CIA/CYA: Cianidina 3-glicosídeo

CF: Compostos fenólicos

EE: Eficiência de extração (%)

R_T : Recuperação para a fase de topo (%)

K: Coeficiente de partição (adimensional)

K_{ow} : Coeficiente de partição octanol-água

TL: Linha de amarração

TLL: Tie Line Length

T: Temperatura (°C)

V_T : Volume de topo (mL)

V_F : Volume de fundo (mL)

X: Porcentagem mássica no fundo

Y: Porcentagem mássica no topo

R_v : razão volumétrica (adimensional)

PT/TPC: Polifenóis Totais/ Total phenol compounds

EAB/SWB: extração com agitação em banho maria/ Stirring in water bath

EAU/UAE: Extração assistida por ultrassom/ Ultrasound assisted extraction

EAM/MAE: Extração assistida por micro-ondas/ Microwave assisted extraction

G_m° : Energia livre de Gibbs (kJ/mol)

H_m° : Entalpia molar (kJ/mol)

ΔG , ΔH e ΔS : Variação da Energia de Gibbs, da Entalpia e da Entropia (KJ/mol)

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A jabuticaba é uma fruta exótica nativa do Brasil que pertence à família Myrtaceae sendo encontrada espontaneamente do Pará ao Rio Grande do Sul (Cavalcanti et al., 2011). Conhecida como "uva brasileira", têm um sabor doce e agradável com pouca acidez, podendo ser consumida na forma *in natura* ou usada em preparações como suco, geléias, licores e vinhos (WU et al., 2012).

No Brasil a comercialização da jabuticaba é efetuada principalmente na forma “*in natura*” às margens de rodovias, por famílias carentes que coletam os frutos de plantas nativas (sistema extrativista). Desta forma, essa atividade informal reveste-se de importância econômico-social, pois proporciona renda adicional a essas famílias durante o período de colheita (CITADIN et al., 2010).

Uma alternativa que vem crescendo nos últimos anos consiste no aproveitamento de resíduos (principalmente cascas) de certos frutos, como matéria prima para a produção de alimentos, perfeitamente passíveis de serem incluídos na alimentação humana. Trata-se de uma proposta plausível, concreta, visto que esses resíduos representam extraordinária fonte de materiais considerados estratégicos para algumas indústrias brasileiras (OLIVEIRA et al., 2002; FERREIRA, et al. 2012).

Os resíduos agroindustriais oriundos de cascas e bagaços, geralmente são ricos em fibras e compostos bioativos (PELIZER et al., 2007). Pelo alto teor nutricional presentes nos resíduos agroindustriais e os impactos ambientais que o descarte inapropriado dos mesmos pode causar, uma das estratégias para beneficiar a saúde da clientela consumidora e a melhoria do meio ambiente, seria a secagem dessas partes usualmente não comestíveis para a obtenção de farinhas, tornando-as adequadas para várias aplicações (DAMIANI et al., 2011).

As cascas e sementes da jabuticaba, geralmente desprezadas, representam juntas aproximadamente 50% do peso, sendo que um melhor aproveitamento dessas frações agregaria maior valor ao fruto (BOARI et al., 2008). É comum encontrar os compostos bioativos da jabuticaba em maiores quantidades na casca, em especial as antocianinas, que são antioxidantes obtidos por meio de extrações convencionais utilizando soluções hidroalcoólicas, que podem ser melhorados por meio da utilização de solventes de polaridade diferenciada, por aplicação de técnicas como ultrassom (PORTO et al., 2013) ou radiação

micro-ondas (BALLARD et al., 2010). Porém estes métodos de extração produzem extratos ricos em diversos biocompostos como as antocianinas, mas com elevado grau de impurezas e contaminantes o que sugere a necessidade de seu isolamento e posterior purificação para a aplicação em áreas como a cosmética, farmacêutica e alimentícia. Neste contexto, a extração líquido-líquido por meio de Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs), proposta na década de 50 por Albertsson (ALBERTSSON, 1958), vem se destacando pela simplicidade, rapidez e seletividade na extração e purificação de biocompostos (WU et al., 2011). Estes sistemas são frequentemente investigados devido à sua composição que proporciona um ambiente adequado para células e substâncias biologicamente ativas devido ao alto conteúdo de água das fases (FREIRE et al., 2012).

Nos últimos anos destacam-se os sistemas formados com acetonitrila (ACN) em conjunto com carboidratos (CARDOSO et al., 2013), com polióis (CARDOSO et al., 2014a), com dextrana (CARDOSO et al., 2014b) e com polivinilalcool (PVA) (CARDOSO et al., 2015), no entanto a literatura ainda não reportou um novo conceito de equilíbrio líquido-líquido, os sistemas orgânicos bifásicos (SOBs), formados por acetonitrila (ACN) e polivinilpirrolidona (PVP) o que reforça o caráter inovador dos sistemas propostos, dos dados apresentados e a importância da realização desta tese, que comparou métodos convencionais com não convencionais para extrair compostos fenólicos a partir da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), estudou a formação de SOBs compostos por acetonitrila e polivinilpirrolidona de diferentes massas moleculares, avaliou sua eficiência para separar e purificar as antocianinas a partir de sua fonte natural e assim, propôs um novo método para purificação destes biocompostos.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair compostos fenólicos da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando método de extração convencional em banho maria com agitação e não convencional (assistida por ultrassom e por micro-ondas), seguida de purificação utilizando sistemas orgânicos bifásicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir diagramas de fases para os sistemas formados por acetonitrila com polivinilpirrolidona de diferentes massas moleculares (10.000, 29.000 e 40.000 g/mol);
- Estudar e avaliar o efeito do tipo e concentração dos componentes dos sistemas orgânicos bifásicos sobre a partição de três compostos fenólicos puros, cloreto de cianinidina-3-O-glicosídeo, quercetina di-hidratada e ácido gálico, nos sistemas modelos;
- Determinar os parâmetros de extração (coeficiente de partição, eficiência de extração e seletividade) para cada sistema modelo utilizando três compostos fenólicos puros;
- Estudar e otimizar a extração de compostos fenólicos, principalmente antocianinas, presente na casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), por método de extração convencional em banho maria com agitação a frio e a quente;
- Estudar e otimizar os métodos de extração não convencionais assistidos por ultrassom e micro-ondas em diferentes temperaturas e tempos de extração;
- Purificar antocianinas a partir de um extrato natural da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) obtido do melhor método de extração, utilizando o sistema orgânico bifásico que apresentou as melhores condições operacionais no estudo dos sistemas modelos com os compostos fenólicos puros.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada informações sobre a jabuticaba e as antocianinas no tocante a suas propriedades, seguido do estado da arte referente à extração e purificação de antocianinas utilizando métodos convencionais e não convencionais e sua purificação por diferentes sistemas orgânicos bifásicos.

3.1 JABUTICABA

Pertencente à família Myrtaceae, a jabuticaba é uma árvore frutífera nativa da Mata Atlântica, principalmente da mata pluvial e das submatas de altitude. Comumente encontrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, frutifica duas vezes por ano, de janeiro a fevereiro e de novembro a dezembro. Dentre as espécies atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (DC) Berg (jabuticaba paulista ou jabuticaba assú) e a *Myrciaria jabuticaba* (Vell) (jabuticaba ‘Sabará’) que produzem frutos apropriados tanto para a indústria como para consumo “in natura” (DONADIO, 2000). As flores são carregadas diretamente nos troncos e nos ramos da árvore, e os frutos amadurecem rapidamente dentro de 40-60 dias. Quando maduros apresentam de 2,0-3,5 cm de diâmetro, contendo de 1-4 sementes, com uma cor de epicarpo que varia de vermelho a preto-escuro (LORENZI et al., 2000).

Em 2008 foram comercializados 1.849.735 kg de jabuticaba, na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), sendo 95,6% oriundo do próprio estado, principalmente dos municípios de Casa Branca e Avaí sendo os meses de setembro e outubro responsáveis por aproximadamente 60% da produção e comercialização anual. A comercialização de jabuticaba nas Centrais de Abastecimento S.A (CEASA) de outros estados no mesmo ano totalizou 488.972 kg, sendo mais expressivo em Vitória-ES, com 170.166 kg, em Belo Horizonte-MG, 126.126 kg e em Curitiba-PR, 108.609 kg (FANALE, 2008). Segundo a CEAGESP, a jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg) é 75º produto mais comercializado, sendo que em 2016 foram comercializadas 2.481 toneladas de jabuticaba, onde as principais cidades fornecedoras foram Guararema-SP (29%), Casa Branca-SP (24%) e Aguaí-SP (11%) (CEAGESP, 2016).

O potencial econômico dessa fruta é grande, devido às suas características sensoriais para consumo *in natura*, e a possibilidade de ser utilizada na fabricação de licores e geléias. Entretanto, por ser muito perecível, seu período de comercialização pós-colheita é curto. Os frutos negros (Figura 3.1) são bagas globosas cujo epicarpo varia de roxo-escuro a preto possuindo polpa macia, succulenta e de sabor ácido (CITADIN et al., 2005).

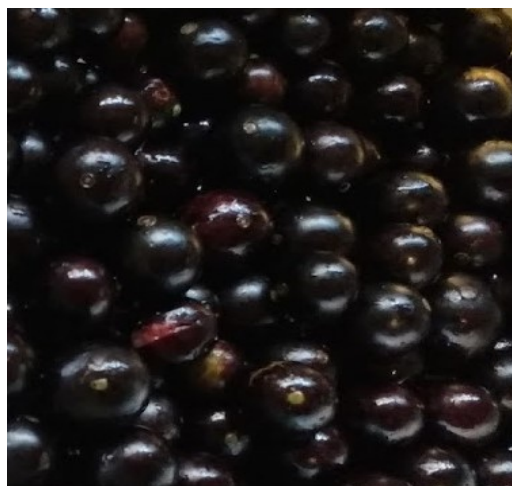


Figura 3.1: Aspectos dos frutos da *Myrciaria cauliflora*

No processamento da jabuticaba para a produção de suco e de outros produtos, as cascas, sementes e uma parte da celulose são descartados e conseqüentemente não são utilizados para outros fins produtivos embora eles conttenham compostos bioativos (BOARI et al., 2008; ALEZANDRO et al., 2013).

Os frutos frescos comestíveis possuem uma grande variedade de nutrientes clássicos, tais como carboidratos, sais, minerais, aminoácidos e vitaminas, e embora alguns deles estejam presentes em baixas concentrações no fruto, podem ter impacto significativo na saúde humana (LORENZI et al., 2000).

A composição nutricional dos frutos de jabuticaba é mostrada na Tabela 3.1. Os frutos comestíveis da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) possui uma boa fonte de minerais como cálcio, ferro e especialmente potássio e fósforo, contendo até 13,2 e 34,6 mg em 100 g de frutas frescas, respectivamente (LORENZI et al., 2000). A jabuticaba também contém níveis significativos de aminoácidos como o triptofano e lisina. As vitaminas B1 e B2 são encontradas como constituintes menores na fruta. O ácido ascórbico (vitamina C), importante nutriente antioxidante solúvel em água, foi encontrado em níveis de até 238 mg em 100 g de frutas frescas (RUFINO et al., 2011). Além dos nutrientes clássicos, as antocianinas totais em 100 g de jabuticaba fresca foram relatadas como sendo de 58,1-315 mg (RUFINO et al., 2011)

e foram encontrados polifenóis totais e carotenoides em 100 g de jabuticaba fresca de 460,9 e 0,32 mg, respectivamente (RUFINO et al., 2010, 2011).

Tabela 3.1. Composição nutricional da *Myrciaria culiflora* por 100 g de fruta.

Composição nutricional e calórica	Valores
Calorias	45,7-51,7 Kcal
Água	87,1 g
Proteína	0,11-0,32 g
Gordura	<0,01 g
Carboidratos	12,58 g
Cinzas	0,2 g
Cálcio	6,3-7,6 mg
Fósforo	9,2-34,6 mg
Ferro	0,49-0,87 mg
Potássio	13,2 mg
Vitamina B1	0,04 mg
Vitamina B2	0,09 mg
Niacina	1,3 mg
Fibra	0,08 mg
Riboflavina	0,02 mg
Triptofano	1,0 mg
Lisina	7,0 mg
Ácido ascórbico	17,7-238 mg
Antocianinas totais	58,1-315 mg
Fenólicos totais	460,9 mg
Carotenóides totais	0,32 mg

Fonte: Morton (1987); Lorenzi et al., 2000; Assis et al., 2009; Rufino et al., 2010; Rufino et al., 2011.

3.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides são uma classe importante de metabólitos secundários conhecidos como polifenóis, que ocorrem naturalmente nas plantas e que se encontram em grande parte nos alimentos como frutas, vegetais, cereais, chá, café e o vinho tinto (TAVEIRA et al., 2010). Estudos epidemiológicos e clínicos têm relatado que a maioria dos polifenóis exibem

propriedades antioxidantes e antimicrobianas, incluindo efeitos antifúngicos, antivirais e antibacterianos (YIGIT, et al., 2009). Os flavonoides apresentam diversas formas estruturais, a maioria de seus representantes possui 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, constituído por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 3.2).

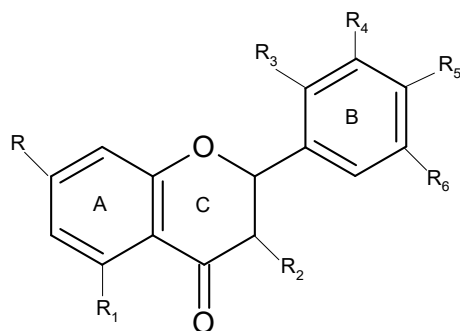


Figura 3.2. Estrutura química básica de um flavonoide, sendo composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).

Os flavonoides são subdivididos em 11 classes menores, sendo que as mais importantes são: flavanas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas, ilustradas na Figura 3.3. (HARBORNE, 1994; COOK, 1996).

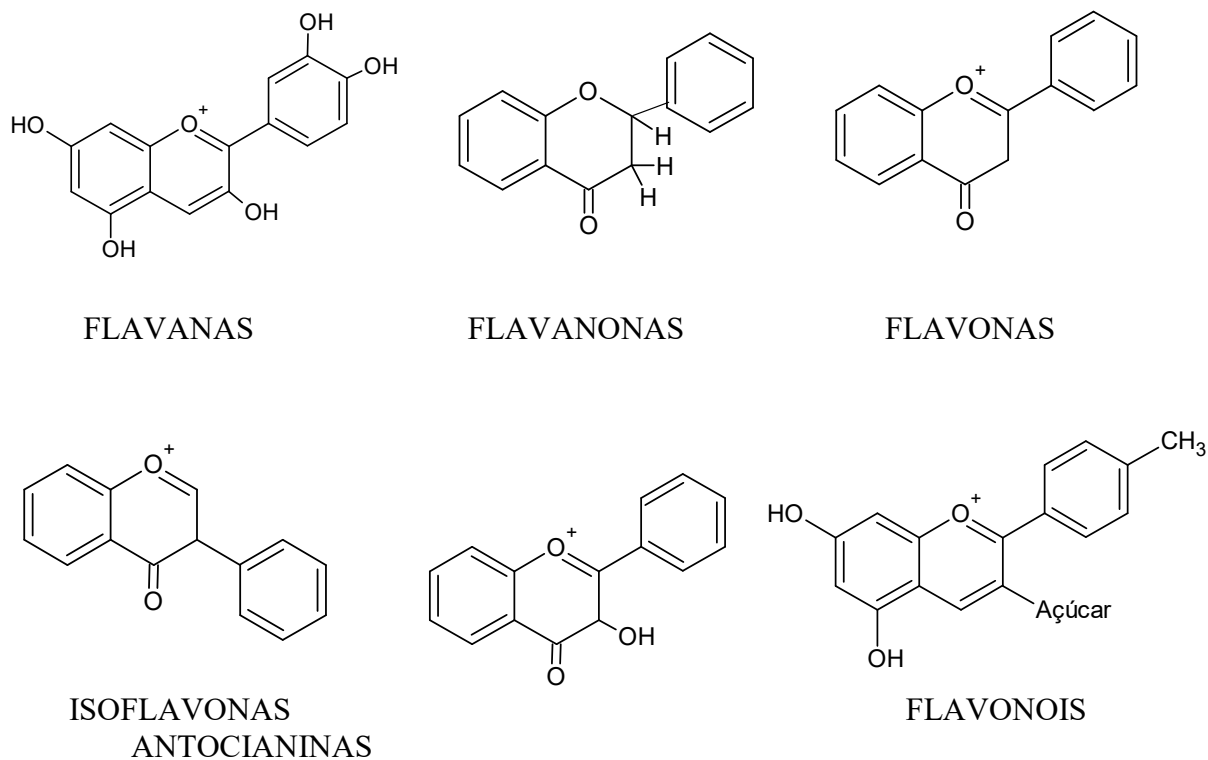


Figura 3.3. Estruturas químicas dos principais flavonoides.

Segundo Behling et al. (2004), os flavonoides podem ser encontrados na forma livre, como, por exemplo, a quercetina e miricetina, porém, é mais frequente encontrá-los na forma glicosilada, unidos a moléculas de açúcar como ramnose, rutinose (três moléculas de glicose) ou ainda em mistura de glicosídeos como ramno-glicosídeos, formando os derivados flavonoides glicosilados (Figura 3.4).

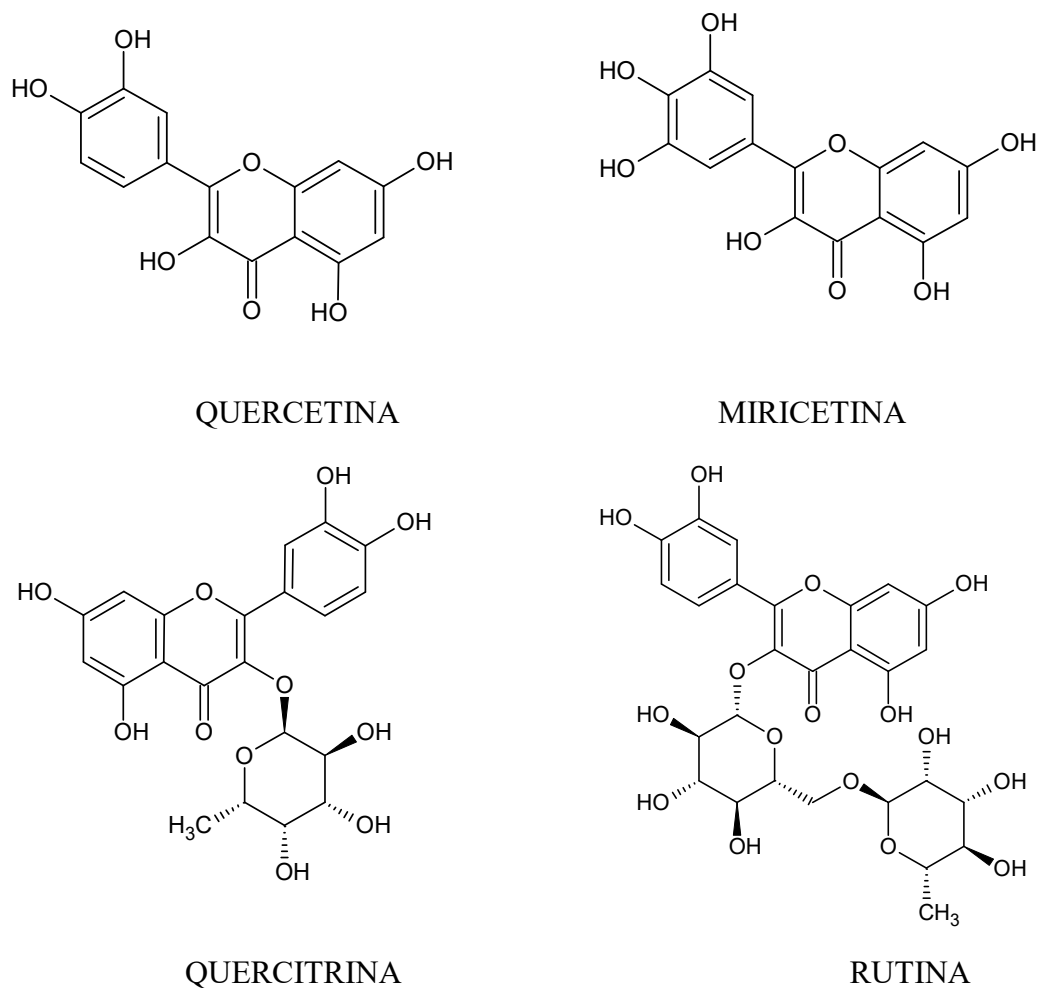


Figura 3.4. Estruturas químicas de flavonoides na forma livre e glicosilados.

3.2.1 Antocianinas

As antocianinas são uma classe de flavonoides com poderosas propriedades antioxidantes. Elas são amplamente dispersas em todo o reino vegetal, sendo particularmente evidente em frutas de cor escura, como o mirtilo (*Vaccinium myrtillum*), cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) e romã (*Punica granatum*), e em alguns tecidos de flores onde eles são responsáveis por cores vermelhas, roxas ou azuis (CROZIER et al., 2009).

As antocianinas ocorrem na natureza como glicosídeos de antocianidinas e podem ser aciladas com ácidos orgânicos ou alifáticos como, coumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzóico, acético, malônico, succínico, oxálico e ácidos málicos (TÜRKER e ERDOGDU, 2006; GRIS, et al., 2007). Sua estrutura geral é derivada do cátion flavílico (Figura 3.5).

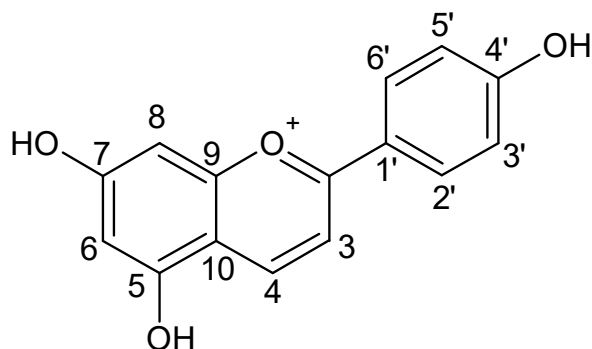


Figura 3.5. Estrutura química do cátion flavílico.

As antocianinas são obtidas a partir da biossíntese indicada na Figura 3.6, a qual também explica a presença da carga positiva na estrutura.

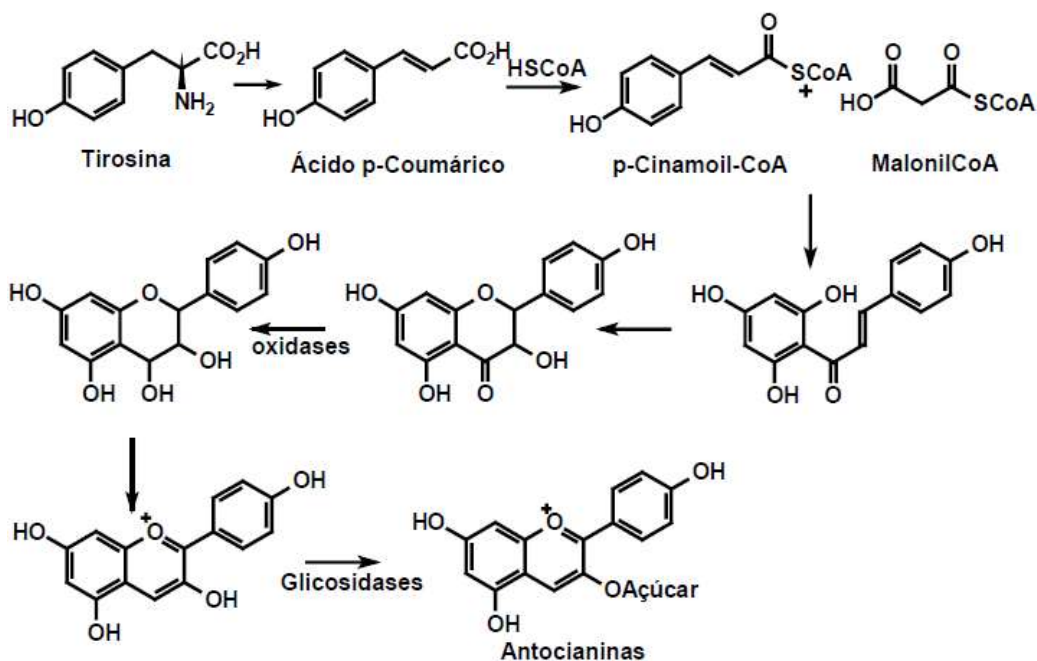


Figura 3.6. Biossíntese das antocianinas. Fonte: (Harborne, 1967; Harborne, 1994).

Antocianidinas livres são raramente encontradas em plantas, ocorrendo comumente glicosiladas com açúcares que estabilizam a molécula de antocianina (FRANCIS, 2000; HARBONE, 1994). A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição 3. O segundo açúcar, quando presente na molécula, encontra-se na posição 5, porém pode ocorrer glicosilações nas posições 7, 3', 4' e 5' (BROUILLARD, 1982). Glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose são açúcares mais comumente ligados às antocianidinas, ocorrendo como monoglicosídeos, diglicosídeos e triglicosídeos glicosilados diretamente na aglicona (FRANCIS, 1989).

A Figura 3.7 mostra as cinco antocianinas que foram isoladas e identificadas da jabuticaba sendo que a maioria destes pigmentos é encontrado na casca do fruto. A peonidina (Figura 3.7a) e a peonidina-3-O-glicosídeo (Figura 3.7b) foram primeiramente separadas e purificadas utilizando cromatografia em camada fina em 1972 (TREVISAN et al., 1972) e até 2004 não houve mais antocianinas reportadas a partir desta fruta. Em 2004, a cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 3.7c) foi detectada no extrato de MeOH dos frutos de jabuticaba (EINBOND et al., 2004). Em 2006, também foram isoladas e identificadas outras antocianinas como a cianidina-3-O-glicosídeo (Figura 3.7c), delphinidina-3-O-glicosídeo (Figura 3.7d), e piranocianina B (Figura 3.7e) de extrato MeOH de frutos de jabuticaba (REYNERTSON et al., 2006). Além disso, como uma importante fonte de antocianinas, a jabuticaba foi relatada possuir 58,1-315 mg antocianinas em 100 g de frutas frescas (Tabela 3.1) usando espectrofotometria ou outros métodos (RUFINO et al., 2011).

Publicações adicionais relataram a detecção ou isolamento de antocianinas de frutos de jabuticaba (SANTOS et al., 2010a; VEGGI et al., 2011; LEITE-LEGATTI et al., 2012; WU et al., 2012). Cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo são as duas antocianinas importantes relatadas em frutos da jabuticaba (SANTOS et al., 2010a; WU et al., 2012).

Leite-Legatti et al. (2012) despulpam o fruto antes da extração e descobriu que a casca seca de cor escura continha cerca de 4,5 a 7,8 vezes a mais de antocianinas do que os frutos inteiros, relatados por Reynertson et al. (2006). As quantidades exatas de cianidina-3-O-glicosídeo e delphinidina-3-O-glicosídeo encontradas foram 1963,57 e 634,75 mg/100g respectivamente, portanto estudos de extrações que propõem maximizar as quantidades de antocianinas extraídas devem utilizar as cascas do fruto (LEITE-LEGATTI et al., 2012).

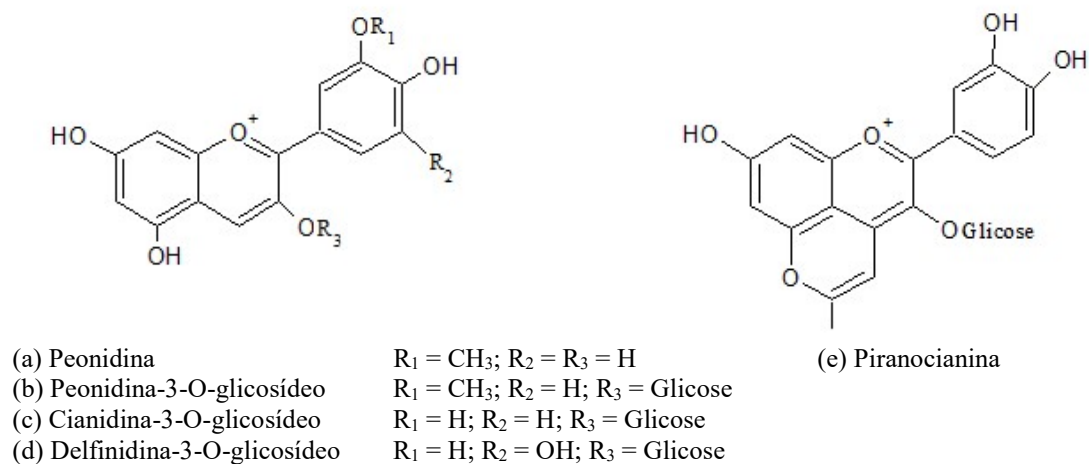


Figura 3.7. Antocianinas relacionadas em *Myrciaria cauliflora*.

As antocianinas como: cianidina, peonidina, delfinidina e a piranocianina, encontrados na jabuticaba, são antioxidantes obtidos por meio de extrações convencionais utilizando geralmente soluções hidro-alcólicas, no entanto os extratos obtidos são ricos em diversos biocompostos ativos, como as antocianinas, porém com elevado grau de impurezas e contaminantes o que sugere a necessidade de sua purificação para a utilização nas áreas cosméticas, farmacêuticas e alimentícias. Desta forma, a busca por técnicas de extração e purificação de biomoléculas alvo, a partir de sua fonte natural, de forma mais rápida e eficiente é necessária para agregar maior valor a biomassa, permitindo que as biomoléculas possam ser utilizadas pela indústria com maior grau de pureza (BALLARD et al., 2010; PORTO et al., 2013).

3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

A extração é um processo no qual um ou mais componentes são separados seletivamente, ou não, de uma matriz sólida ou líquida, portanto, resulta nas extrações sólido-líquido e líquido-líquido. A força motriz para a transferência da biomolécula da matriz para o solvente, é a solubilidade de cada componente, resultante assim em duas fases, uma enriquecida (extrato) e outra pobre (refinado) no componente a ser separado (DOUGHARI, 2012).

Existe uma grande variedade de métodos de extração de biomoléculas, que podem ser divididos em convencionais, que são métodos mais tradicionais e já consolidados na literatura como a extração com refluxo de solvente à quente utilizando o aparato de Soxhlet, e os não-convencionais, que requerem o uso de técnicas mais sofisticadas como micro-ondas, ultrassom, fluido supercrítico, entre outros. No entanto, apesar das diferenças quanto aos

princípios e procedimentos utilizados, todos os métodos possuem os mesmos objetivos que são: extrair biomoléculas a partir de amostras complexas como, por exemplo, as matrizes vegetais; ser seletivo e sensível ao analito de interesse; converter a biomolécula numa forma mais adequada para detecção e separação; ser rápido e eficiente (SMITH, 2002).

O isolamento das biomoléculas a partir de uma matriz sólida é um dos passos mais críticos no processo de extração. Os problemas surgem como a possibilidade de perda de substância ou contaminação durante a preparação da amostra. Além disso, é um processo que consome tempo e envolve o consumo elevado de solvente (PERALTA-JIMÉNEZ e CAÑIZARES-MACÍAS, 2013). Os procedimentos de recuperação usualmente aplicados a bioprodutos representam o maior custo associado à sua produção quando esta ocorre a partir de fontes naturais. Deste modo, atualmente busca-se a investigação sobre técnicas mais eficientes, menos nocivas ao ambiente e capazes de extrair biomoléculas em um único procedimento (LOUROS et al., 2010). A Tabela 3.2 apresenta alguns métodos para extrair antocianinas a partir de sua fonte natural disponíveis na literatura.

Para que a biomolécula possa ser utilizada pela indústria, primeiramente é necessário extraí-la de sua matriz. Portanto, é importante desenvolver técnicas para identificação, quantificação, isolamento, extração e purificação que apresentem maior viabilidade econômica. No entanto, estas alternativas normalmente requerem condições mais drásticas, isto é, altas temperaturas e pressões, além disso, também dependem de equipamentos mais sofisticados transformando a extração do analito em um processo caro e complexo. A fim de eliminar algumas destas desvantagens, o SAB que pode ser considerada uma técnica de extração líquido-líquido apresenta-se como uma alternativa de extração e purificação de biomoléculas por ser biocompatível (REIS et al., 2014).

Tabela 3.2. Métodos e parâmetros de extrações convencionais e não convencionais de antocianinas.

Método	Solvente	Tempo de extração (min)	Temperatura (°C)	[Antocianinas] (mg/g)	Referência
EAU*	Etanol	120	40	3,673	Santos et al., 2010a
Extração em shaker	Etanol	120	30	6,168	Santos et al., 2010a
Soxhlet.pH3	Etanol	480	-	5,416	Santos et al., 2010a
EAU* + Soxhlet	Etanol	120	30	5,339	Santos et al., 2010a
EAU*	Metanol	5	-	25,99	Leite et al., 2011
Estocagem em refrigeração	Etanol	720	4	7,32	Leite-Legatti et al., 2012
EAM**	Etanol	7	47,1	737,3	Zheng et al. 2013
EAU*	Etanol	120	30	4,8 mg/g	Rodrigues et al., 2015
Agitação magnética	Líquido iônico	60	35	3,58 mg/g	Lima et al., 2017

*EAU: Extração assistida por ultrassom; **EAM: Extração assistida por micro-ondas.

3.3.1 Métodos Convencionais

Biomoléculas obtidas a partir de fontes naturais são largamente utilizadas pela indústria farmacêutica, cosmética e indústrias alimentares como matérias-primas para um grande número de produtos industrializados. A preparação da amostra é o primeiro passo crucial na obtenção de bioativos, porque é necessário não somente extrair o componente químico desejado a partir dos materiais à base de produtos naturais, mas posteriormente, purificá-los e caracterizá-los (HUIE, 2002).

Tradicionalmente, a extração de biomoléculas é feita utilizando os métodos convencionais com solventes a frio ou a quente, pois são métodos já consolidados e, normalmente, são de fácil execução e custo baixo. Entretanto, fatores como a utilização de grande quantidade de solvente, a necessidade de longo tempo de contato e o baixo rendimento, contribuem para a redução da viabilidade destes métodos (YANG et al., 2008).

Os métodos convencionais consistem basicamente em submeter o material ao contato de um solvente, por certo tempo e temperatura, com ou sem agitação como, por exemplo, a extração utilizando o aparelho de Soxhlet, maceração, lixiviação, imersão, entre outros (CHAN et al., 2011 e AZMIR et al., 2013).

As antocianinas das frutas e vegetais estão localizadas nos vacúolos celulares. Os procedimentos de extração geralmente envolvem o uso de soluções acidificadas, que desnaturam as membranas celulares e simultaneamente solubilizam os pigmentos. O ácido tende a estabilizar as antocianinas, mas também pode mudar a forma nativa do pigmento no tecido pela quebra das associações com metais, co-pigmentos e/ou outros compostos (RODRIGUES-SAONA e WROLSTAD, 2001). Estas são moléculas polares, portanto as soluções mais comuns usadas nas extrações são misturas aquosas de etanol, metanol ou acetona (DAI et al., 2009). Fuleki e Francis (1968) sugerem que o uso de água adicionada ao solvente facilita a extração das antocianinas mais hidrofílicas devido ao aumento da polaridade do solvente extrator.

Lima et al. (2011) determinaram o conteúdo de antocianinas totais por meio da maceração da casca fruto com o uso de etanol acidificado com HCl 1.5 mol/L (85:15), promovendo uma melhor extração e estabilidade dos pigmentos. Os resultados mostraram que as cascas são ricas em pigmentos antociânicos, apresentando 15,9 e 20,6 mg/100g de matéria seca nas variedades Paulista e Sabará, respectivamente. Também determinaram por cromatografia líquida de alta eficiência as principais antocianinas na casca do fruto das mesmas variedades. Os resultados mostraram que o conteúdo de cianidina-3-glicosídeo praticamente foi

o mesmo 2,06 mg/100g, enquanto que a delphinidina 3-glicosídeo apresentou 3,09 e 2,71 mg/100g respectivamente nas variedades Paulista e Sabará.

Santos et al. (2010a) determinaram o conteúdo de antocianinas totais por meio de extração a frio e a quente. No primeiro tipo foi utilizado o etanol a 99,5% como solução extratora numa relação de massa/solvente de 1:10 a 25°C durante 2 horas em agitação usando shaker, apresentando um valor de 6,17 mg/100g de antocianinas. Na extração a quente foi feita por intermédio do aparato de Soxhlet utilizando 25 g da casca de jabuticaba com etanol a 99,5% como solvente durante 8 horas de extração, onde foi determinado 5,42 mg/100g de antocianinas (Tabela 3.2).

3.3.2 Métodos Não Convencionais

Em função dos problemas inerentes à utilização dos métodos convencionais para a extração de biomoléculas, existe a necessidade do desenvolvimento de técnicas que utilizem menor quantidade de solvente e energia. Neste contexto, métodos de extração não convencionais como a extração assistida por micro-ondas, fluido supercrítico, ultrassom e ultrafiltração, por exemplo, vêm despontando pela eficiência e menor custo de processo em comparação aos métodos convencionais (CHEMAT et al., 2011).

Dos métodos não convencionais, a extração assistida por micro-ondas e a extração assistida por ultrassom são duas técnicas promissoras, do ponto de vista econômico, e por serem procedimentos relativamente baratos, simples e eficientes. O ultrassom e micro-ondas são métodos que vem recebendo muita atenção e as pesquisas demonstraram um aumento significativo de taxas de rendimentos em extração seletiva de bioativos de plantas (JAITAK et al., 2009).

Os estudos de extração de compostos bioativos da jabuticaba, por intermédio dos métodos não convencionais, focaram na otimização das antocianinas a partir da casca da fruta (SANTOS et al., 2010a; CAVALCANTI et al., 2011; SANTOS et al., 2011a; SANTOS e MEIRELES, 2011b; SANTOS, VEGGI e MEIRELES, 2012). Foi relatado que os compostos bioativos presentes nas cascas das jabuticabas brasileiras foram mais efetivamente extraídos por extração assistida por dióxido de carbono (SANTOS e MEIRELES, 2011; CAVALCANTI et al., 2011) e extração por líquido pressurizado (SANTOS et al., 2012).

3.3.2.1 Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

Os avanços na preparação de amostras sólidas trouxeram um grande número de novas técnicas, como o método de extração assistida por ultrassom (EAU), que reduz as etapas do processo (da extração, da reação, de síntese, e de mistura) em comparação com outros métodos em que esta energia não é utilizada (PERALTA-JIMÉNEZ; CAÑIZARES-MACÍAS, 2013). Essa técnica é uma das mais amplamente exploradas em âmbitos laboratoriais e em escala industrial, devido a sua alta eficiência em extrair componentes, baixo consumo de solventes, operação simples e baixa poluição ao meio ambiente (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015; TAO e SUN, 2015).

A EAU é um sistema que utiliza a energia acústica e solvente para promover o processo de extração dos compostos alvos de diversas estruturas vegetais (MINJARES-FUENTES et al., 2014). O ultrassom é um tipo especial de onda sonora geralmente de 0,02 a 100 MHz, que criam compressão e expansão em um meio produzindo um fenômeno chamado de cavitação: produção, crescimento e colapso das bolhas. Uma grande quantidade de energia pode ser produzida a partir da conversão de energia cinética do movimento para aquecer o conteúdo da bolha (AZMIR, 2013).

O mecanismo de extração envolve o fenômeno de difusão, em que ocorre a formação das bolhas de cavitação que proporcionam um melhor rompimento celular por meio da formação de micro jatos perto da superfície sólida da célula do vegetal, permitindo a maior penetração do solvente na matriz celular aumentando assim a taxa de transferência de massa (CHEMAT et al., 2011). As ondas ultrassônicas causam o efeito de expansão e de compressão sobre a matéria. A expansão pode criar bolhas em um líquido e produzir pressão negativa, enquanto o colapso das bolhas formadas pode causar cavitação. O colapso das bolhas perto das paredes celulares produz rompimento celular, e como resultado, ocorre uma melhor penetração do solvente para o interior das células, e conseqüentemente um aumento da transferência de massa (ESCLAPEZ et al., 2011).

Vários fatores podem afetar o processo de extração assistida por ultrassom como por exemplo: a intensidade da onda sonora, o tempo de exposição à frequência sonora, a temperatura do processo e a granulometria da amostra (TAO et al., 2014). A EAU é utilizada para extração de uma vasta gama de compostos, tais como pigmentos, aromas, antioxidantes, tecidos e outros compostos orgânicos e minerais oriundos de diversas matrizes (CHEMAT et al., 2011).

Pode-se verificar na Figura 3.8 que, no primeiro estágio do processo de extração, ocorre a formação de bolhas (a); tais bolhas sofrem expansão e compressão (b) que ocasionarão o colapso ou implosão das mesmas (c). Eventualmente, caso esse colapso ocorra perto da interface da matriz vegetal, pode-se gerar ondas de choque que perturbarão a parede da matriz, consequentemente liberando o material intraparticular no solvente (d) (ESCLAPEZ et al., 2011).

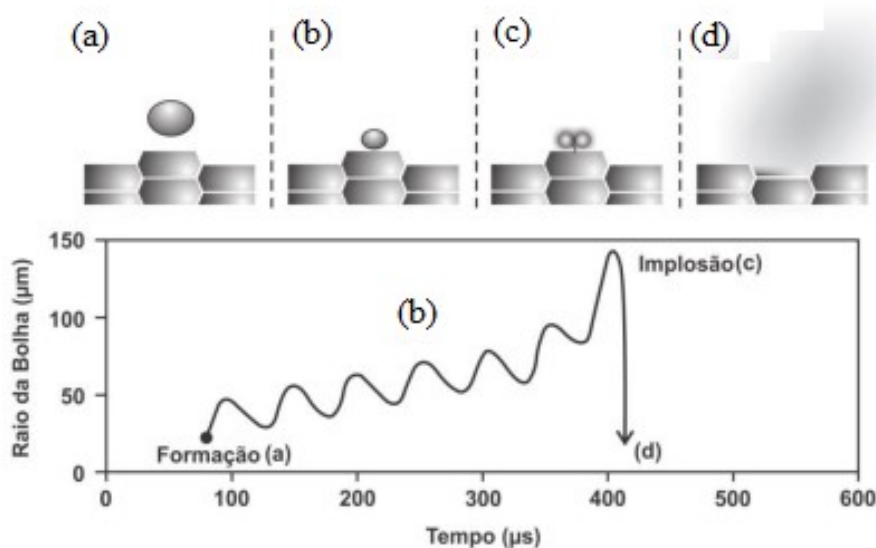


Figura 3.8: Representação esquemática dos efeitos do processo de extração assistida por ultrassom sobre a matriz vegetal. Fonte: adaptado de Esclapez et al., (2011)

Outro fator de extrema importância em extrações assistidas por ultrassom é a configuração do extrator, que pode ter o transdutor acoplado ao vaso de extração ou ter uma sonda ultrassônica imersa no meio solvente/matriz vegetal. A Figura 3.9 mostra esquematicamente algumas geometrias de extratores com ondas ultrassônicas.

Atualmente, os sistemas de extração mais utilizados em escala de laboratório são os banhos ultrassônicos ou a sonificação direta. Os banhos ultrassônicos consistem em um transdutor acoplado a um tanque contendo um líquido responsável por transferir as ondas ultrassônicas até um recipiente contendo a matriz extrativa, representado na Figura 3.9 (a). Uma das desvantagens dessa geometria é a falta de uniformidade de distribuição das ondas ultrassônicas. Assim, a sonificação direta surgiu como uma alternativa para melhorar a distribuição das ondas ultrassônicas através do meio de extração. Esse sistema consiste em inserir uma sonda ultrassônica diretamente na mistura solvente/matriz vegetal, demonstrado na Figura 3.9 (b) e (c) (ESCLAPEZ et al., 2011).

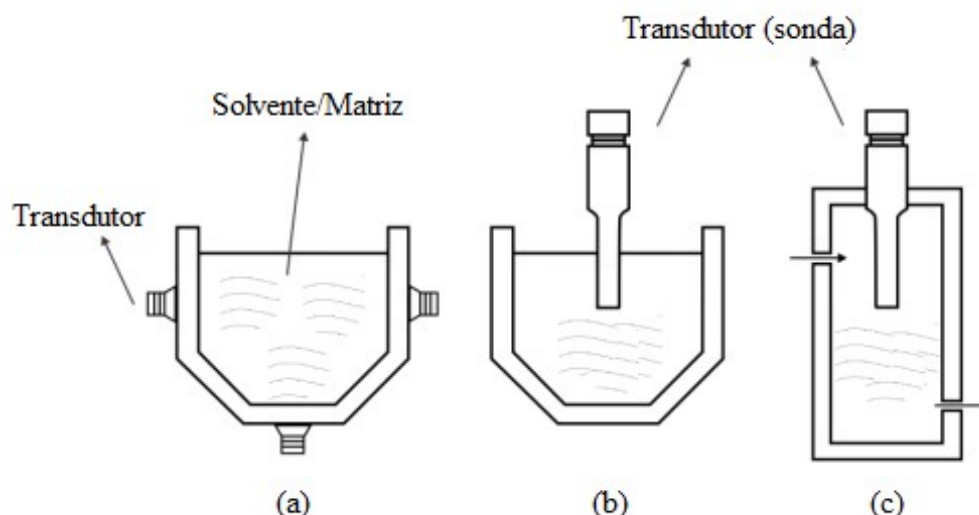


Figura 3.9: Configurações típicas de extratores: (a) transdutor acoplado a um vaso; transdutor (sonda) imerso no meio solvente/matriz vegetal, em batelada (b) e em modo contínuo (considerando o fluido/solvente) (c). Fonte: adaptado de Esclapez et al., 2011.

Santos et al., (2010a) determinaram o conteúdo de antocianinas totais por meio da extração assistida por ultrassom. A casca do fruto da jabuticaba foi misturada com diferentes volumes de etanol a 99,5% numa relação massa/volume de 1:10 e sonicadas em ultrassom de banho com uma frequência de 40 kHz (81W) à temperatura ambiente durante 2 h. Os resultados mostraram um valor de 3,70 mg/g de antocianinas totais. O mesmo autor também otimizou um método combinado de agitação em shaker junto com ultrassom, no qual extraiu 5,40 mg/g de antocianinas totais.

3.3.2.2 Extração Assistida por Micro-Ondas (EAM)

As micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes, que consistem em campos elétricos e magnéticos que oscila perpendicularmente uns aos outros nas bandas de frequência entre 0,3 e 300 GHz, variando entre 0,001 e 1 metro (ROUSSY e PEARCE, 1995; CHAN et al., 2011). Fortuny et al. (2008) dividiram a faixa de frequência eletromagnética em três bandas típicas: a frequência ultra alta (UHF – *ultra high frequency*, de 0,3 a 3GHz), frequência super alta (SHF – *super high frequency*, de 3 a 30GHz) e a frequência extremamente alta (EHF – *extremely high frequency*, de 30 a 300GHz). A Figura 3.10 ilustra a faixa das micro-ondas no espectro eletromagnético.

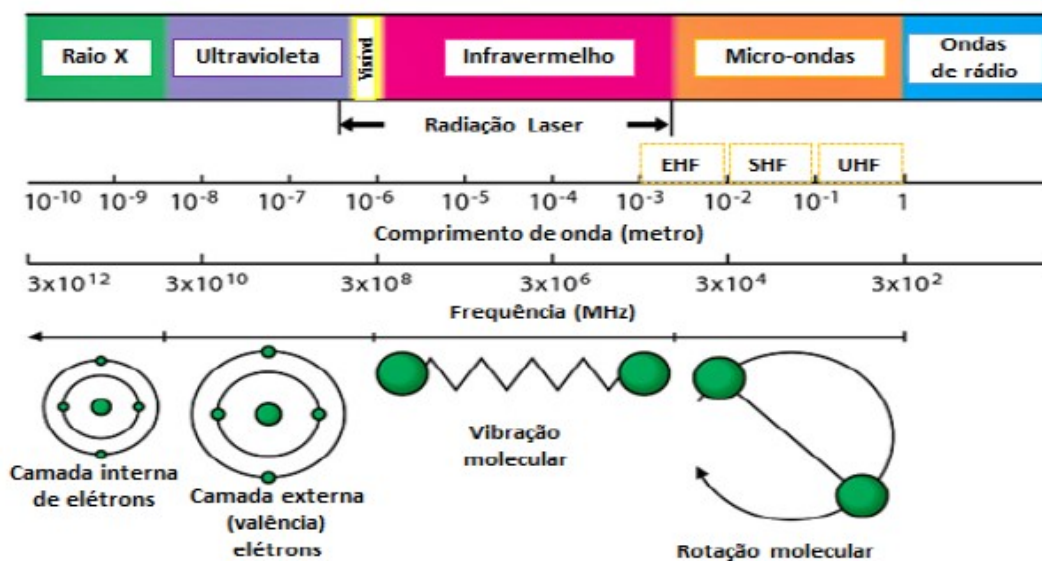


Figura 3.10: Espectro eletromagnético. Fonte: Adaptada de Hayes (2002) e Fortuny et al. (2008).

A Figura 3.11 mostra o esquema de aquecimento no método convencional por condução e no método por ondas eletromagnéticas. Nos métodos de extração convencionais que utilizam aquecimento, normalmente, a energia é transferida para o material por meio da condução, utilizando uma fonte externa que conduz o calor para o meio reacional através das paredes do recipiente, um processo que demanda longo tempo até atingir o equilíbrio térmico. Já no processo de aquecimento por micro-ondas, a energia é transferida diretamente ao material através de interações entre as moléculas e o campo eletromagnético e, desta forma, ao invés de transferência de calor, ocorre conversão de energia eletromagnética em térmica (HAYES, 2002; STICHER, 2008).

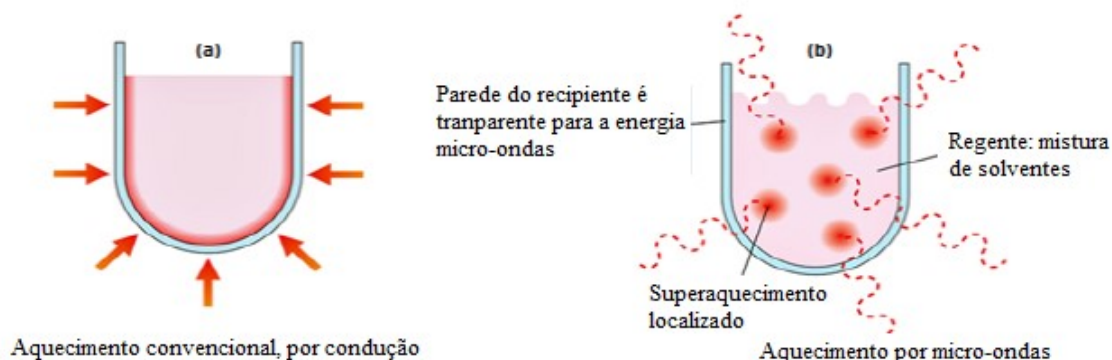


Figura 3.11: Esquema de aquecimento de amostra através do método convencional por condução (a) e do não-convencional por micro-ondas (b). Fonte: Adaptada de Hayes (2002).

Como o aquecimento por micro-ondas não depende da condutibilidade térmica dos materiais do equipamento, o aquecimento ocorre de modo mais rápido e forma regiões de superaquecimento localizado (HAYES, 2002). Esse aquecimento seletivo da matriz, resulta no aumento do volume celular até ocorrer a explosão das células, liberação da biomolécula para a fase líquida e absorção das micro-ondas na fase líquida, que promove o aumento da velocidade de difusão e uniformidade do calor em todo o material (ALUPULUI et al., 2009). Desta forma, a utilização de energia micro-ondas para a extração de biomoléculas resulta em sistemas de aquecimento mais eficaz, transferência de energia mais rápida, redução gradientes térmicos, aquecimento seletivo, melhor controle do processo de aquecimento, menor tempo de extração, alta eficiência, boa reprodutibilidade, e, além destes fatores, a utilização de reduzida quantidade de solvente orgânico, torna esse método favorável ao meio ambiente (CRAVOTTO et al., 2008; SPIGNO e FAVERI, 2009; ALUPULUI et al., 2009; ALUPULUI et al., 2012).

De acordo com Spigno e Faveri (2009), os fatores que influenciam no processo de extração assistido por micro-ondas são o tempo de irradiação, razão matriz/solvente, temperatura e tipo de solvente utilizado. Os autores destacam também outro fator importante e que interfere bastante na eficiência do processo é a taxa de aquecimento, que é influenciada pela constante dielétrica dos solventes utilizados no processo. Solvente com constante dielétrica (descreve a polarização de uma molécula num campo elétrico) elevada, aquece o meio submetido à radiação mais rapidamente e, por conta do valor dessa constante, a água é o melhor solvente para extração assistida por micro-ondas (EAM) e a sua adição em misturas de solventes costuma ser feita para aumentar o índice de polaridade da solução e assim melhorar a eficiência do processo.

Zheng et al. (2013) extraiu antocianinas de mirtilo (*Vaccinium myrtillum*) utilizando a EAM nas seguintes condições operacionais: tempo de 7 minutos, temperatura 47,1°C, concentração de etanol a 55,5% (v/v) e uma razão sólido líquido de 1:33,9 (g/mL). Sob estas condições foi obtido 737,3 mg/g de antocianinas (Tabela 3.2)

Liazid et al. (2011) extraiu antocianinas da casca de uva (*Vitis sp*) utilizando a EAM nas seguintes condições operacionais: 2 g de cascas de uva, concentração do metanol a 40% v/v em água como e temperatura de 100° C, 500W como potência do sistema, 25 mL como volume de extração e tempo de 5 minutos, extraindo nestas condições 1857,9 mg/kg de antocianinas.

3.3.3 Sistema Aquoso Bifásico

A escolha do processo de extração e purificação de algumas substâncias bioativas deve ser feita levando em consideração o grau de pureza exigido para a sua aplicação. Assim, em comparação as técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico (SAB) é uma alternativa bastante eficiente para a extração e purificação de biomoléculas, pois eles têm sido estudados desde o final do século XIX em escala piloto com sucesso na extração de várias biomoléculas. (ALBERTSSON,1990)

O SAB pode ser definido como sendo o sistema de extração/purificação de compostos, baseado no princípio da extração líquido-líquido, que utiliza líquidos imiscíveis que, quando atingem o equilíbrio termodinâmico, se separam em duas fases (uma fase de topo e outra de fundo) transportando o analito de interesse para a fase que este possui maior afinidade e os compostos considerados como contaminante, tendem a ir para a fase oposta. Podem ser formados por mistura de dois polímeros diferentes, por mistura de polímero com solução salina, mistura de álcool e sal, ou ainda utilizando líquidos iônicos, que são sais de baixo ponto de fusão que se encontram no estado líquido, quando em temperatura ambiente (WU et al., 2011).

O vasto leque de aplicações do SAB é justificado pela facilidade de aumento de escala do processo, e geralmente atinge elevada eficiência e rendimentos de extração (ALBERTSSON et al., 1990). A Tabela 3.3 apresenta exemplos de tipos e composição para sistemas aquosos bifásicos do SAB que foi proposta por Pessoa Júnior e Kilikian (2005), com ampliação de exemplos.

Os primeiros trabalhos publicados com SAB utilizavam sistema composto por polímero e sal (ALBERTSSON, 1958), no entanto, em função da viscosidade do polímero, ao longo dos anos diversos sistemas alternativos foram sendo desenvolvidos como, por exemplo, álcool – K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 (REIS et al., 2012; REIS et al., 2014; REIS et al., 2015), álcool – $(NH_4)SO_4$, NaH_2PO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 (TAN et al., 2014), líquido iônico – $C_6H_5K_3O_4 \cdot 5H_2O$ (PASSOS et al., 2014).

Tabela 3.3. Exemplos de tipos e composição do sistema aquoso bifásico.

Tipo de SAB	Exemplo de composição
Dois polímeros não iônicos	- Polietilenoglicol (PEG) + polissacarídeo - PEG + Dextrana - PEG + Polivinil Álcool - Polipropilenoglicol (PPG) + Dextrana - Metil celulose + Hidroxipropildextrana
Polieletrólito e polímero não iônico	- Sulfato Dextrana de Sódio + PPG - Carboximetilcelulose de Sódio + Metil Celulose
Dois polieletrólitos	- Sulfato Dextrana de Sódio + Carboximetildextrana de Sódio - Carboximetildextrana de Sódio + Carboximetilcelulose de Sódio
Polímero não iônico e composto de baixa massa molecular (Sal)	- PPG + Fosfato de Potássio - PEG + Fosfato de Potássio - Metoxipolietilenoglicol + Fosfato de Potássio - PPG + Glicose - PEG + Glicose - PEG + Sulfato de Magnésio - PEG + Citrato de Sódio
Líquido iônico e Sal	- Líquido Iônico + Fosfato de Potássio
Solventes orgânicos e Sal	- Alcoóis + Fosfato de Potássio
Líquido iônico e composto de alta massa molecular	- Líquido Iônico + Açúcares

Fonte: Adaptado de Pessoa Júnior e Kilikian (2005).

Na literatura já existem trabalhos com sistemas aquosos bifásicos formados por polímero-polímeros (GROßMANN et al., 1995) e polímeros-sais; PEG-tampão fosfato (BARBOSA et al., 2011), e mais recentemente destacam-se os sistemas formados com acetonitrila (ACN) em conjunto com carboidratos (CARDOSO et al., 2013), com polióis (CARDOSO et al., 2014a), com polivinilalcool (PVA) (CARDOSO et al., 2015) e com dextrana (CARDOSO et al., 2014b), no entanto a literatura ainda não reportou um novo conceito de equilíbrio líquido-líquido, os sistemas orgânicos bifásicos (SOBs), formados por acetonitrila (ACN) e polivinilpirrolidona (PVP). Neste contexto, o PVP surge como uma alternativa promissora e inovadora nos estudos de extração e purificação de antocianinas da jaboticaba.

A acetonitrila (ACN) também conhecida como cianeto de metila (Figura 3.12), é um solvente polar aprótico miscível em água em todas as proporções (MANDAL et al., 2011). As

moléculas de ACN não interagem entre si, mas fortemente com água através de ligação de hidrogênio. É também um subproduto da fabricação de acrilonitrila que é amplamente usado por indústria na produção de perfumes, produtos de borracha, pesticidas ou produtos farmacêuticos (ZHANG et al., 2011), ou como fase móvel em cromatografia de alta eficiência (HPLC) (TAHA et al., 2012; GU e SHIH, 2014).

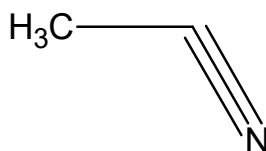


Figura 3.12. Estrutura química da ACN.

A recuperação da acetonitrila é importante para a redução de custos, pois é amplamente utilizada como solvente para a extração de produtos de alto valor devido as suas propriedades físico-químicas (DHAMOLE et al., 2010).

Apesar das nitrilas serem amplamente utilizadas na síntese de aminas, amidas, cetonas, aldeídos e uma variedade de outros compostos, a acetonitrila é usada principalmente como solvente em técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), graças as suas características únicas, como: baixa viscosidade, baixa absorção de luz ultravioleta e alta miscibilidade com solventes apolares e água (SADEK, 2002).

O uso em larga escala industrial da acetonitrila é devido a este solvente apresentar rendimentos similares ou superiores aos solventes tradicionais, sendo que do ponto de vista ambiental e da saúde humana é o mais recomendado (SANTOS et al., 2010b).

O polivinilpirrolidona (PVP) conhecido comercialmente por povidone é um homopolímero de *N*-vinil-2-pirrolidona obtido por polimerização via radical em água ou em álcool isopropílico, de natureza higroscópica e compatível com uma ampla faixa de resinas hidrofílicas e hidrofóbicas. O PVP é um pó branco, amorfo de fluxo livre que se solubiliza em água e em solventes orgânicos, tendo a capacidade de formar complexos estáveis com polímeros e surfactantes (ULLMANS, 1992).

Muito utilizado em tecnologia farmacêutica como agente ligante e desintegrante para comprimido e agente suspensor para formas farmacêuticas líquidas. A grande frequência de aplicações do PVP e seus copolímeros na medicina e nas indústrias farmacêuticas ocorrem devido as suas propriedades: solubilidade em água e em solventes orgânicos, estável, atóxico, possui capacidade de complexação com diversas substâncias quando em solução aquosa, capacidade de formar filmes e de interagir com outros polímeros (MANO, 1988; KIBBE, 2000).

A fórmula estrutural (Figura 3.13) lhe confere um caráter anfifílico, o que se deve à existência do grupo amida altamente polar com propriedades hidrofílicas, aos grupos metileno e metil presentes na cadeia principal com propriedades hidrofóbicas (KIBBE, 2000).

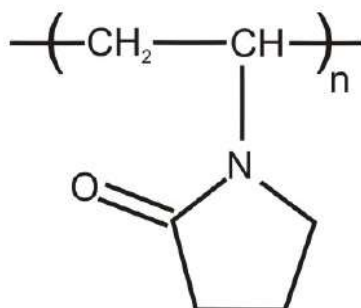


Figura 3.13. Estrutura química do PVP.

A ferramenta básica para o desenvolvimento dos estudos com SAB é o diagrama de equilíbrio de fases, que representa graficamente, em temperatura e pressão definidas, a composição em que as duas fases líquidas estão em equilíbrio termodinâmico. A Figura 3.14 apresenta o esquema representativo do diagrama de equilíbrio.

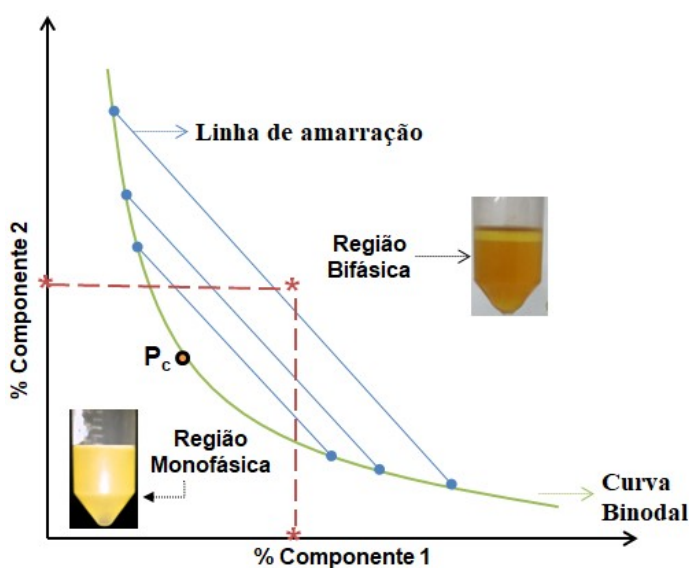


Figura 3.14. Diagrama de fases para sistema aquoso bifásico, expresso em coordenada retangular. Fonte: Adaptada de SILVA e LOH, 2006.

Utilizando os diagramas de fase, é possível obter informações sobre em quais composições globais o sistema encontra-se na região monofásica ou bifásica, sendo estas regiões delimitadas por uma linha chamada de Curva Binodal. Segundo Martins et al. (2009),

a posição da curva no diagrama pode variar de acordo com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, peso molecular e natureza química dos compostos, temperatura, pressão e pH do meio.

No diagrama de fase também são representadas as Linhas de Amarração (“*tie lines*” - TL), retas que ligam pontos no diagrama que representam as composições de equilíbrio. Qualquer conjunto de pontos que pertençam à região bifásica e que estejam sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases de topo e fundo com mesma composição, mas com diferente relação de volume entre as fases (SILVA e LOH, 2006). Ainda na curva binodal, está demarcado o Ponto Crítico (PC), neste as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986). O cálculo do comprimento da linha de amarração (frequentemente referido como TLL do inglês “*Tie Line Length*”) é um importante parâmetro termodinâmico e, geralmente, é usado como variável determinante do processo de partição. O aumento da TLL ocasiona redução do volume livre na fase de fundo do sistema, desta forma, a biomolécula tende a migrar para a fase de topo (MALPIEDI et al., 2009). Segundo Silva e Loh (2006), o TLL pode ser calculado por meio da equação (3.1):

$$TLL = \sqrt{(\Delta C_1)^2 - (\Delta C_2)^2} \quad (3.1)$$

onde, ΔC_1 e ΔC_2 correspondem à diferença de concentração na fase de topo pela concentração na fase de fundo, de cada componente.

O particionamento de uma molécula em SAB pode ser avaliado de duas formas, por meio do cálculo da eficiência que informa o quanto o sistema foi eficiente na transferência da biomolécula para a fase de topo, ou por meio do cálculo do coeficiente de partição (K), que relaciona a concentração da biomolécula que migrou para a fase de topo com a concentração que migrou para a fase de fundo, através da equação (3.2).

$$K = \left(\frac{C_T}{C_F}\right) \quad (3.2)$$

onde, C_T é a concentração da biomolécula na fase de topo e C_F na fase de fundo.

Vale ressaltar que:

- Se $k = 1$, a biomolécula está presente na fase de topo e de fundo em concentrações iguais.
- Se $k \gg 1$, a biomolécula está mais concentrada na fase de topo.
- Se $k \ll 1$, a biomolécula está mais concentrada na fase de fundo.

Diversas variáveis podem influenciar na partição das biomoléculas no SAB, estas podem ser próprias do sistema como, por exemplo, sua composição, massa molar e concentração dos componentes, pH e temperatura, ou ainda relacionadas a biomolécula como, por exemplo, a hidrofobicidade, ponto isoelétrico e solubilidade (SILVA e LOH, 2006). Desta forma, é importante ressaltar a necessidade de conhecer ao máximo as características da biomolécula a ser estudada e relacionar com as características do sistema para que se consiga atingir uma eficiência alta na extração.

Ao desenvolver um estudo com SAB, é importante avaliar alguns efeitos que podem ocorrer durante a formação e estabilização do sistema (CHAIWUT et al., 2010). Segundo Wang et al. (2010), esses efeitos influenciam não somente a formação do sistema, mas também a partição da biomolécula. Os principais efeitos relatados pelos autores estão destacados abaixo:

- Massa molar e concentração dos componentes: ao alterar a composição das fases de topo e fundo, pode ocorrer mudança na solubilidade da biomolécula que, a depender de seu caráter, sofrerá maior efeito *salting-out* ou *salting-in* e particionará, preferencialmente, para a fase mais hidrofóbica ou hidrofílica, respectivamente (BABU et al., 2008). Ao aumentar a concentração de um componente, pode ocorrer o efeito do volume de exclusão por ocupar os espaços intersticiais de uma fase, podendo resultar na redução da solubilidade e aumento da viscosidade na fase oposta (RAWDKUEN et al., 2011).
- pH: pode alterar a carga elétrica (positiva/neutra/negativa) e induzir processos de associação ou dissociação, estas alterações podem provocar mudanças na forma como a biomolécula interage com o sistema e modificar o comportamento da partição (SILVA e LOH, 2006; WANG et al., 2010).
- Temperatura: seu efeito varia de acordo com a composição do sistema e o tipo de biomolécula a ser particionada. Segundo Coimbra et al. (2003), sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente à região do ponto crítico. Alguns trabalhos

relatam aumento do coeficiente de partição com o aumento da temperatura (PESSOA-JUNIOR e KILIKIAN, 2005; REIS et al., 2014).

Segundo Cooper (1999), as propriedades termodinâmicas que melhor descrevem um sistema em equilíbrio é a entalpia (H), entropia (S) e a energia livre de Gibbs (G). Considerando a partição de uma biomolécula por SAB, os parâmetros termodinâmicos devem ser determinados de acordo com a teoria de Flory-Huggins, que descreve a energia necessária para a obtenção da energia livre de Gibbs na mistura (ΔG_m°) (COOPER, 1999; JOHANSSON et al., 2011). Assim, a função da energia livre à pressão constante e a nível molecular estão apresentadas nas equações 3.3 e 3.4.

$$\Delta G_m^\circ = \Delta H_m^\circ - T\Delta S_m^\circ \quad (3.3)$$

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H_m^\circ}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_m^\circ}{R} \quad (3.4)$$

onde R é a constante universal dos gases (8,314 J/mol.K), T é a temperatura (Kelvin) e K é o coeficiente de partição da biomolécula.

Considerando a Equação 3.4 observa-se que ΔG_m° possui contribuição de natureza entálpica (ΔH_m°) e entrópica. (ΔS_m°). No SAB, o valor de ΔG_m° nunca poderá ser zero porque sempre haverá contribuição e, desta forma, a ΔG_m° será função das interações resultantes presentes em solução, bem como das diferentes distribuições das moléculas na solução. Termodinamicamente, quando $\Delta G_m^\circ < 0$, a partição da biomolécula no sistema ocorre de forma espontânea, se $\Delta H_m^\circ < 0$ o processo é exotérmico e se $\Delta H_m^\circ > 0$ é endotérmico. Para saber qual tipo de força governa a migração da biomolécula, pode ser feita uma análise baseada na Equação 3.4 e, desta forma, se $T \times \Delta S_m^\circ > \Delta H_m^\circ$, o processo é governado por forças entrópicas, que tende a deslocar a biomolécula para a fase de topo do sistema, do contrário, as forças entálpicas governaram a partição e direcionam o analito para a fase de fundo (SILVA e LOH, 2006).

Reis et al. (2014) extraíram rutina a partir de resíduos de acerola (*Malpighia emarginata*) por SAB utilizando um sistema composto por álcool e sais de fosfato de potássio e observaram que os SABs estudados são versáteis, pois permitiram que a biomolécula seja recuperada tanto na fase de topo quanto na fase de fundo, ricas em álcool e sal, respectivamente. O maior coeficiente de partição (51,47) e eficiência de extração (98,64%) foram obtidos em SAB

consistindo de 1-propanol (40% em peso) + K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (20% em peso) + água (40% em peso) e 2,5 (% em peso) de NaCl à 298,15 K. A migração da rutina aconteceu de forma, termodinamicamente, espontânea, de forma endotérmica e governada por forças entrópicas.

Cardoso et al. (2014) estudaram a partição da vanilina pura utilizando SAB com composição inédita (polivinil álcool com acetonitrila) e obtiveram os melhores resultados ($K = 2,24$ e $RT = 79\%$) utilizando um sistema composto por 49% em peso de ACN + 9% em peso de PVA a 5°C. A vanilina migrou para a fase superior (rica em acetonitrila) de forma espontânea e num processo exotérmico.

Tan et al. (2014) separaram e purificaram ácido clorogênico (CGA), a partir da folha de rami (*Boehmeria nivea*), utilizando SAB composto por etanol e NaH_2PO_4 . Os resultados mostraram que o CGA migrou, preferencialmente, para a fase rica em álcool com um rendimento de 95,76% a 25 °C e pH 3,29 em um SAB composto por 15,2 % de etanol, 28,1 % de sal e 56,7 % de água. Os autores também destacaram a importância do estudo da termodinâmica junto com a cinética e propuseram um sistema de reciclagem das fases de forma fácil, ecológica, mais barata e viável para produção em larga escala.

Souza et al. (2015) desenvolveram um SAB composto por líquido iônico a base de colina e tetra-hidrofurano (THF) para purificar lipase. As condições ótimas para partição utilizaram 40% em peso de THF e 30% em peso de bitartarato de colina a 25°C, que resultaram num fator de purificação de $130,1 \pm 11,7$ vezes, rendimento de $90,0 \pm 0,7\%$ e um coeficiente de partição da enzima para a fase de fundo rica em colina igual a $0,11 \pm 0,01$ e proteína contaminantes para a fase rica em THF ($K = 1,16 \pm 0,1$). Termodinamicamente, o processo aconteceu de forma espontânea, endotérmica e governada por forças entrópicas.

Capítulo 4

INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO IV

O capítulo IV será apresentado dividido em forma de artigos científicos (ARTIGO I e II) os quais correspondem aos resultados referentes aos estudos da extração e purificação de compostos fenólicos a partir de sua fonte natural, a jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). Os artigos foram organizados de acordo com as normas propostas pelo periódico de publicação.

ARTIGO I – Organic two-phase system based on acetonitrile + water + polyvinilpirrolidone: A novel concept of liquid-liquid equilibrium: phase diagrams and phenolic compounds partitioning. Artigo submetido ao periódico Separation and Purification Technology.

ARTIGO II – Sequential extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) using non-conventional protocols followed by purification based on organic two-phase system. Artigo submetido ao periódico Food and Bioproducts Processing.

ARTIGO I

Organic two-phase system based on acetonitrile + water + polyvinylpyrrolidone, a novel concept of liquid-liquid equilibrium: phase diagrams and phenolic compounds partitioning

Bruno Sales Oliveira^a, Camila Maria de Souza D'Anzicourt^a, Cleide Mara Faria Soares^{a,b},
Ranyere Lucena de Souza^{a,b}, Álvaro Silva Lima^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

^bInstituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brazil

*To whom correspondence should be addressed: e-mail: alvaro_lima@unit.br. Phone: +55 7932182115. Fax: +55 7932182190.

Abstract

Novel binodal data for acetonitrile + polyvinylpyrrolidone PVP (10000, 29000 and 40000 g.mol⁻¹) + water were experimentally measured at 298 ± 1 K and 0.1 ± 0.01 MPa. The empirical Merchuck's equation was correlated with experimental binodal data, and the tie-lines and critical point to complete the phase diagrams were determined. The accuracy of the tie-lines was evaluated by Othmer-Tobias and Bancroft equations. The both phases in equilibrium had a high content of acetonitrile (> 50 wt%), and for this reason, the system formed was called organic two-phase system, a novel concept for liquid-liquid equilibrium. The top-phase is rich in water and the bottom phase is rich in PVP. The systems were used in the partitioning of three biomolecules, in this case cyanidin migrated preferentially to the top phase while gallic acid migrated to the PVP-rich phase. The system formed by ACN (62.05 wt%) + PVP-10000 (12.05 wt%)+ H₂O (25.90 wt%) was more selective for the separation of cyanidin-3-O-glycoside chloride of gallic acid ($S_{\text{CYA/AGA}} = 65.41$) and cyanidin of quercetin ($S_{\text{CYA/QUE}} = 42.77$).

Key words: phenolic compounds; organic two-phase system; partitioning.

1. Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPS) is a non-chromatographic kind of liquid-liquid extraction applied in the extraction, partition and purification of the target compound such as phenolic compounds [1], antioxidants [2], proteins and enzymes [3,4]. Albertsson [5] has reported these systems in the literature since 1950.

ATPSs are formed by a couple of constituents immiscible with each other and above a critical thermodynamic concentration. The literature has been prodigious to describe traditional ATPS based on polymers-polymers (polyethylene glycol + dextran [6]) and polymers-salts (polyethylene glycol + phosphate buffer [7]), as well as those formed by ionic liquids (IL) + salts (IL + ammonium citrate or sodium acetate [8]) and IL + carbohydrates (IL + sugars [9]).

This protocol is relatively simple and inexpensive, easily operated and scaled-up, has a high-resolution capacity and allows clarification, purification and concentration to be integrated in just one-step [10]. Other important advantage is their biocompatibility due to higher content of water in both cases (> 50 wt%). On the other hand, the high water content makes it difficult to isolate the biomolecules from the medium. For this reason, nowadays, ATPSs constituted by organic solvents such as alcohols, tetrahydrofuran (THF) and acetonitrile (ACN) have been reported more frequently. Among these systems, it can be highlighted ATPSs based on alcohols + salts [11,12], THF + carbohydrates [13], THF + IL [14], THF + salts [15], ACN + carbohydrates [16,17], ACN + natural polymers [18], and ACN + polyvinyl alcohol - PVA [19].

However, in this ATPS based on organic solvent the water content in one of the phases decrease (< 50 wt%), tending to decharacterize the system as aqueous. Therefore, this work addressed the development of system based on ACN + polyvinylpyrrolidone -PVP (with different molecular weight: 10.000, 29.000 and 40.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + water, in which the both phases present a high content of organic solvent content - ACN (> 50 wt%), while the water content is below this level, forming a phase rich in water and other rich in PVP. Thus, it is possible establish a novel kind of liquid-liquid extraction, that we called Organic Two-Phase System - OTPS. Therefore, phases diagrams were built and the system applied in the partition study of phenolic compounds, which are found in various fruits namely cyanidin-3-O-glycoside, quercetin and gallic acid.

PVP is amorphous polymer able to form stable complexes with polymers and surfactants [20]. They are widely used in the pharmaceutical industry, as a binder, tablet disintegrator and suspending agent for liquid formulations, because of their properties such as

solubility in water and organic solvents, chemical stability, very low toxicity, complexing ability with various substances and film formation. The amphiphilic character of the molecule is due to the presence of polar amide groups with hydrophilic properties, as well as groups with hydrophobic characteristics such as methylene, methyl and pyrrolidine ring [21].

The other constituent for ATPS in our case is ACN also known methyl cyanide, an aprotic organic solvent widely used in production of perfume, rubber and pharmaceutical products [22]. It was also employed in analytical procedures as mobile phase in high pressure liquid chromatography (HPLC) and extraction, separation and purification protocols [23,24]. ACN is miscible with water in all proportions and their molecules do not interact strongly with themselves but with water through hydrogen bonds [25].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The OTPS studied in this work were formed by acetonitrile (HPLC grade with a purity of 99.9 wt%) and polyvinylpyrrolidone (≥ 99 wt%) with different average molecular weights (10.000, 29.000 and 40.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) were acquired from Sigma-Aldrich. All others reagents were also purchased from Sigma-Aldrich: gallic acid (98 wt%), quercetin dihydrate (HPLC grade ≥ 98 wt%), cyanidin 3-O-glucoside chloride (HPLC grade ≥ 95 wt%). The chemical structures are depicted in Figure 1. In all experiments, ultrapure water (type 1 ultrapure water - Direct-Q 3UV) was used.

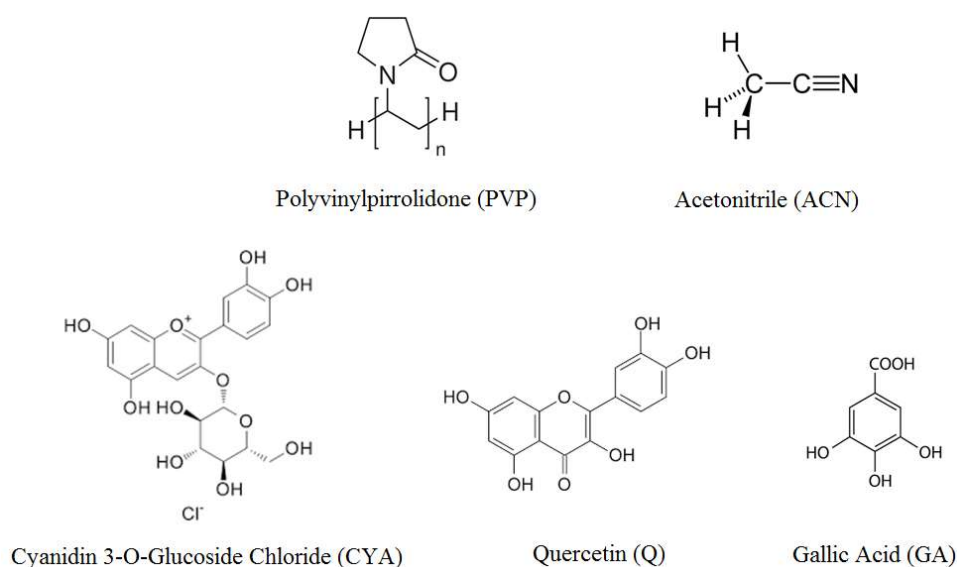


Figure 1: Structure of OTPS' constituents and target biomolecules.

2.2. Phase Diagrams

Aqueous solution of PVP (20 – 39 wt%) and ACN (80 wt%) were prepared and used for the binodal curve determination at 298.15 ± 1.00 K and 0.10 ± 0.01 MPa by cloud point method [27]. The experimental data were determined gravimetrically, within an uncertainty of $\pm 10^{-5}$ g (Shimadzu AUV220D, Philippines). PVP or ACN aqueous solutions were added drop-wise to each other until the visual detection of a cloudy solution (biphasic region). At this point water was drop-wised until the detection of a clear and limpid solution (monophasic region). This protocol was performed under constant magnetic stirring (Tecnal TE-085, Piracicaba-SP, Brazil) and was repeated several times in order to obtain enough points for the construction of a liquid-liquid equilibrium binodal curve. The experimental data of binodal curves were correlated using Merchuk et al. [27] (equation 1).

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

where [ACN] and [PVP] are respectively the percentages by weight of acetonitrile and polyvinylpyrrolidone, and A, B and C are constants obtained by regression.

A mixture point at the biphasic region of each ternary system was prepared, vigorously stirred, and allowed to reach equilibrium and phase separation, for a minimum of 12 h at 298.15 ± 1.00 K and 0.10 ± 0.01 MPa and used to build the tie-lines (TLs). After the equilibration step, the top and bottom phases were carefully separated and weighted within $\pm 10^{-5}$ g. Each individual TL was determined by the application of the lever-arm rule, which describes the relationship between the weight of the top phase and the overall system weight and composition. The determination of the TLs was then accomplished by solving the following system of four equations (equations 2 to 5) for the four unknown values of $[\text{ACN}]_T$, $[\text{ACN}]_B$, $[\text{PVP}]_T$ and $[\text{PVP}]_B$.

$$[\text{ACN}]_T = A \exp \{ B \times [\text{PVP}]_T^{0.5} - C \times [\text{PVP}]_T^3 \} \quad (2)$$

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

$$[\text{ACN}]_T = ([\text{ACN}]_M / \alpha) - ((1 - \alpha) / \alpha) [\text{ACN}]_B \quad (4)$$

$$[\text{PVP}]_T = ([\text{PVP}]_M / \alpha) - ((1 - \alpha) / \alpha) [\text{PVP}]_B \quad (5)$$

where the subscripts M, T and B correspond to the initial mixture, top and bottom phases, respectively. The value of α is the ratio between the mass of the top phase and the total weight of the mixture. The system solution results in the ACN and PVP concentration in the top and bottom phases, and thus, TLs can be simply represented.

The respective tie-line lengths (TLLs) were determined through the application of equation 6:

$$\text{TLL} = \sqrt{([\text{ACN}]_{\text{T}} - [\text{ACN}]_{\text{B}})^2 - ([\text{PVP}]_{\text{T}} - [\text{PVP}]_{\text{B}})^2} \quad (6)$$

The location of the critical point of the ternary systems was estimated by extrapolation of the TLs compositions applying equation 7 [28].

$$[\text{ACN}] = a + b[\text{PVP}] \quad (7)$$

where a and b are fitting parameters.

The consistency of the TLs for ATPS based on ACN and PVP was further checked using the Othmer-Tobias (equation 8) and Bancroft (equation 9):

$$\ln\left(\frac{100 - [\text{ACN}]_{\text{T}}}{[\text{ACN}]_{\text{T}}}\right) = c + d \times \ln\left(\frac{100 - [\text{PVP}]_{\text{B}}}{[\text{PVP}]_{\text{B}}}\right) \quad (8)$$

$$\ln\left(\frac{100 - [\text{H}_2\text{O}]_{\text{T}}}{[\text{ACN}]_{\text{T}}}\right) = e + f \times \ln\left(\frac{100 - [\text{H}_2\text{O}]_{\text{B}}}{[\text{PVP}]_{\text{B}}}\right) \quad (9)$$

where $[\text{H}_2\text{O}]$ is the percentages by weight of water, and c, d, e and f are constants obtained by regression.

2.3. Partitioning of Phenolic Compounds

The liquid-liquid systems for the partitioning of phenolic compounds were prepared in graduated centrifuge tubes (15 mL) by weighing the appropriate amounts of ACN and PVP (10.000 g.mol⁻¹, 29.000 g.mol⁻¹ and 40.000 g.mol⁻¹) until 10 g of system. Three mixing points in the two-phase region were chosen (System A: 12.05 wt% + 62.05 wt%; System B: 9.02 wt% + 59.02 wt%, and; System C: 8.89 wt% + 58.89 wt% for PVP + ACN, respectively). Each

systems individually contained 600 mg.L⁻¹ of gallic acid, 100 mg.L⁻¹ of quercetin or 0.2 mg.L⁻¹ cyanidin 3-O-glucoside chloride.

After the complete mixing of all components for a given mixture composition, each system was centrifuged at 2,000 x g for 10 min at 298.15 ± 1.00 K (Hettich Universal 320R, Germany) to favor the phase separation, and then each tube was placed in a thermostatic bath (Marconi MA-127) at 298.15 ± 1.00 K for at least 12 h, to reach the equilibrium. The tubes were sealed to avoid the ACN vaporisation. The volume and weight of each phase was measured and both phases were further separated for the quantification of each phenolic compound and for the determination of their pH values (pHmeter DM-22 Digimed). At least three independent replicates were made and the average partition coefficients and associated standard deviations were therefore determined.

The concentrations of each phenolic compounds at top and bottom phase were quantified through UV-spectroscopy, using a Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrophotometer, and at a wavelength of 435 nm (gallic acid), 690 nm (quercetin) and 525 nm (cyanidin 3-O-glucoside chloride) using a calibration curve previously established.

The partition coefficient (K) was defined as ratio between the phenolic compound concentration in the top (C_T) and bottom phase (C_B), as describe by equation (10).

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (10)$$

The extraction efficiency in the top (EE) was evaluated using equations (11):

$$EE = \frac{KR_V}{1 + KR_V} \quad (11)$$

$$R_V = \frac{V_T}{V_B} \quad (12)$$

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

The selectivity (S) of the systems was determined by the ratio between the partition coefficients of two a two biomolecules under study.

2.4. Density and Viscosity

Density and viscosity were measurement for each phases, and performed at different temperatures (298.15–328.15 K), with an uncertainty of ± 0.02 K, using an automated SVM 3000 Anton Paar rotational Stabinge viscosimeter-densimeter. The density have an absolute uncertainty of $5 \times 10^{-4} \text{ g.cm}^{-1}$ while the relative uncertainty of dynamic viscosities is 0.35 %. The equipment was calibrated using standard solution.

3. Results and Discussion

3.1. Phase Diagrams

The binodal experimental data of the organic two-phase systems formed by PVP + ACN + H₂O at 298.1 K and atmospheric pressure are depicted in Figure 2a (triangular diagram). The acetonitrile content is high in both case, therefore we can represent the phase diagram in terms of water and polymer content in Cartesian coordinates (Figure 2b). Moreover, the constituents are purposely expressed in molality units to avoid misunderstands in the PVP evaluation, due to different molecular weight. The mass fraction of experimental data are show in Tables DB1-DB3 of Data in Brief.

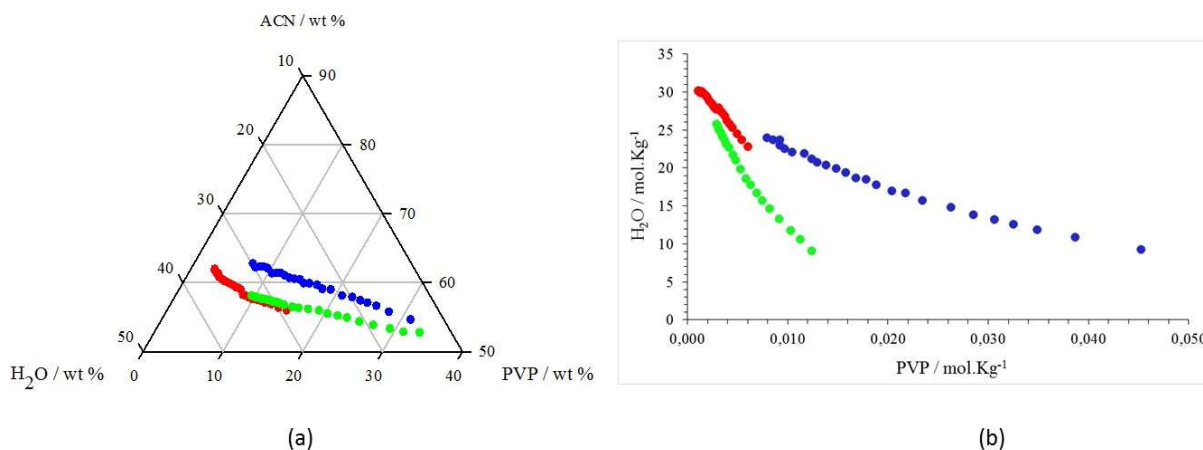


Figure 2. Binodal curves for ternary systems composed of acetonitrile + PVP + H₂O at 298 ± 1 K and 0.1 ± 0.01 MPa. ■ - PVP 10000 g mol⁻¹; ■ - PVP 29000 g mol⁻¹; ■ - PVP 40000 g mol⁻¹.

The area above the binodal curve represents the biphasic region, thus the diagrams formed by PVP with higher molecular weight demonstrate a greater capacity for phase formation (PVP 40000 g mol⁻¹ > PVP 29000 g mol⁻¹ > PVP 10000 g mol⁻¹). The increase in the PVP molecular weight and consequently the number of methylene groups in the polymer chain makes the PVP more hydrophobic, consequently the coexistence of two phases due to

incompatibilities of the constituents (PVP and water) increases. The increase of hydrophobicity with the polymer chain increment and consequently the ease of phase formation was also observed in another system formed by ACN + Dextran + water [18] and PEG + sodium citrate + water [10].

All experimental binodal data were fitted using the Merchuck's empirical equation, and the fitting parameter A, B and C, as well as, the regression coefficient (R^2) were estimated by the regression of the minimum squares and are given in Table 1. The experimental data fit well with the model proposed by Merchuck et al. [27], since the regression coefficients (R^2) of the systems were close to 1, that is, more than 99% of the data can be explained by the model used in the work.

Table 1. Regression parameters (A, B and C) and corresponding standard deviation (σ), obtained by Merchuk's equation and correlation coefficients (R^2), for the ternary systems composed of PVP + ACN + water at 298.15 K and 0.1 MPa^a.

PVP (gmol ⁻¹)	A \pm σ	B \pm σ	C \pm σ	R^2
10,000	68.65 \pm 0.18	-0.0329 \pm 0.0009	1.49 \times 10 ⁻⁶ \pm 1.14 \times 10 ⁻⁷	0.9989
29,000	67.10 \pm 0.22	-0.047 \pm 0.002	1.66 \times 10 ⁻¹⁴ \pm 1.20 \times 10 ⁻⁸	0.9973
40,000	63.70 \pm 0.16	-0.0296 \pm 0.0008	6.02 \times 10 ⁻⁷ \pm 7.63 \times 10 ⁻⁸	0.9976

^a Standard uncertainties u are u(T) = 1 K and u(p) = 10 kPa.

In order to complete, the phases diagrams, some tie-lines were determined and their constituents composition are reported in Table 2. The representation of the phase diagrams in terms of mass fraction with their respective tie-lines of the systems studied are presented as triangular diagrams in Figure DB1 in the Data in Brief.

Table 2. Mass fraction composition for the tie-lines (TLs) and respective tie-line lengths (TLLs), and critical points (Pc) for ATPS composed of ACN + PVP of different molecular weights (10.000, 29.000 and 40.000 g.mol⁻¹) + H₂O at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP (g.mol ⁻¹)	Weight fraction / wt%									TLL	PC		
	[PVP] _M	[ACN] _M	[H ₂ O] _M	[PVP] _T	[ACN] _T	[H ₂ O] _T	[PVP] _B	[ACN] _B	[H ₂ O] _B		[PVP]	[ACN]	[H ₂ O]
10000	10.16	63.91	25.93	0.02	68.37	31.61	37.50	51.88	10.62	40.94			
	13.98	61.43	24.59	0.22	67.60	32.18	21.32	58.13	20.55	23.14	1.19	66.31	32.50
	12.00	61.84	26.16	0.47	67.12	32.41	17.31	50.41	23.28	18.52			
29000	7.00	61.13	31.87	1.19	63.72	35.09	25.78	52.77	21.45	26.91			
	8.00	59.91	31.09	2.52	62.24	35.23	23.32	53.39	23.28	22.61	14.61	56.13	29.26
	9.04	59.08	31.96	3.98	61.05	34.96	21.94	53.76	24.30	19.38			
40000	8.00	59.98	32.02	0.52	62.36	37.12	26.49	54.09	19.42	27.26			
	9.02	58.92	32.06	2.32	60.89	36.79	22.05	55.08	22.87	20.57	12.01	57.40	30.59
	11.00	58.03	30.97	4.28	59.92	35.80	19.41	55.67	24.92	15.71			

^a Standard uncertainties u are u([PVP], [ACN] or [H₂O]) = 0.01, u(T) = 1 K, and u(p) = 10 kPa.

The tie-lines are practically parallel with few deviations due to experimental errors, noticing the good determination. Even so, the accuracy of the tie-lines in each OTPS proposed was verified by applying the Othmer-Tobias and Bancroft equations. The correlation coefficients obtained from the two equations are higher than 0.97, and thus the tie-lines of this study can be reliable (Table 3).

Table 3. Parameter values of fitting parameters of Othmer-Tobias and Bancroft equation for the system composed of acetonitrile + PVP + water and correlation coefficients (R^2) at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP(gmol ⁻¹)	Othmer-Tobias			Bancroft		
	c	d	R ²	e	f	R ²
10,000	-0.798	0.051	0.975	-0.738	0.026	0.983
29,000	-1.126	0.531	0.993	-0.570	0.138	0.994
40,000	-0.619	0.126	0.988	-0.530	-0.126	0.969

^a Standard uncertainties u are $u(T) = 1$ K and $u(p) = 10$ kPa.

According to Quental et al. [29], the determination of density and viscosity of top and bottom phase in a liquid-liquid equilibrium is a very important characterization for the design of the extraction processes. Hence, OTPSs with similar TLL (system A – TLL= 18.52: 12.05 wt% PVP (10.000 g.mol⁻¹) + 62.05 wt% ACN + 25.90 wt% H₂O; system B – TLL = 19.38: 9.02 wt% PVP (29.000 g.mol⁻¹) + 59.02 wt% ACN + 31.96 wt% H₂O; system C – TLL= 20.57: 8.89 wt% PVP (40.000 g.mol⁻¹) + 58.89 wt% ACN + 32.22% H₂O) were used to measure the density and viscosity in the top and bottom phases. The density and viscosity values at different temperatures are shown in Figures 3, and reported in Table DB4-DB6 of the Data in Brief.

The behavior of density and viscosity with temperature presents a typical linear and exponential variation. As expected, the PVP-rich phase (bottom phase) is more dense and viscous than the water-rich phase (top). The difference between the density of the top and bottom phases allows evaluating the phase separation, and its ease and quickness. For this work, the difference are 0.173 – 0.197 g.cm⁻³ (system A), 0.151 – 0.158 g.cm⁻³ (system B) and 0.138 -0.156 g.cm⁻³ (system C), which are easier and faster to separate than those formed by PEG-6000 e triammonium citrate (0.08 g.cm⁻³) [30] and similar to those found for systems formed by tetrahydrofuran and glucose (0.235 - 0.322 g.cm⁻³) [13].

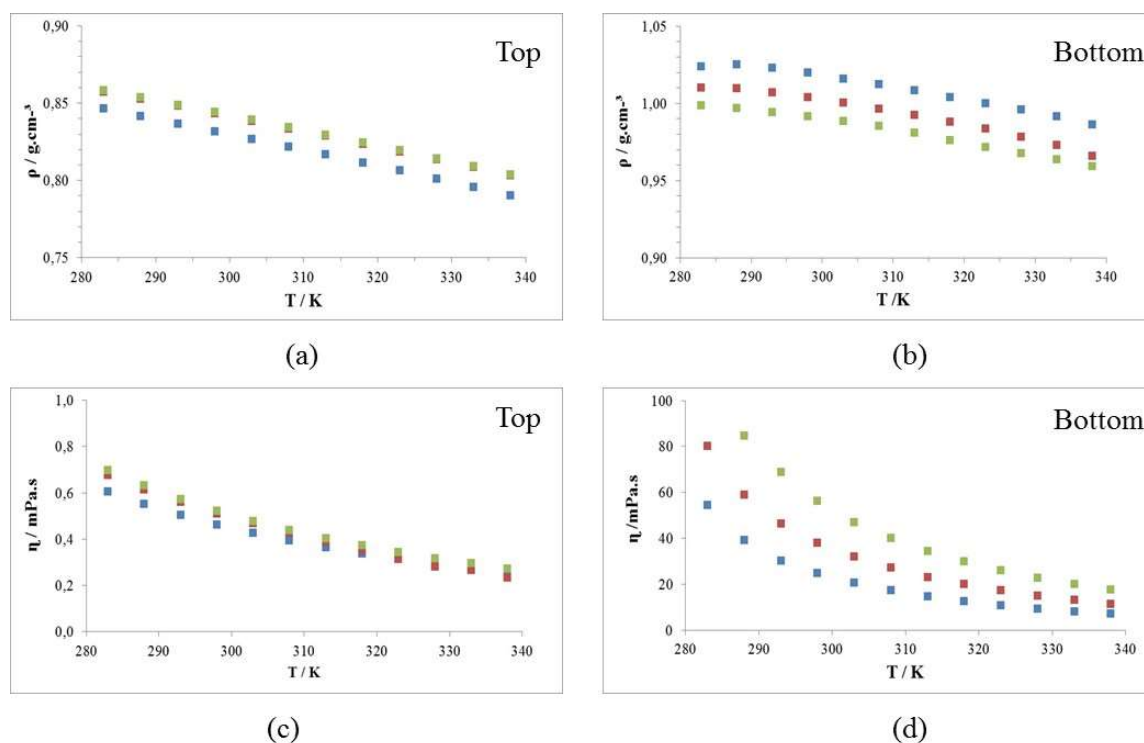


Figure 3. Experimental density (a and b) and viscosity (c and d) for different organic two-phase system at different temperature (283.15 – 338.15 K) and 0.10 ± 0.01 MPa. ■ - System A, ■ - System B, and ■ - System C.

Intra- and intermolecular interactions such as hydrogen bonds play an important role in the exponential profile of the decrease in viscosity with temperature [29], as observed in the Figure 3c and 3d. The viscosities in the water-rich phase (top phase) are 31 to 135 times more viscous than the PVP-rich phase (bottom phase). Based on the polymer rich phase, the viscosity values for systems A (6.17 - 82.13 mPa.s), B (9.88 - 103.49 mPa.s) and C (15.61 - 156.84 mPa.s) are lower than those found in the PEG-rich phase at 298 K (PEG-6000 + K_3PO_4) to 202 mPa.s (PEG-8000 + K_3PO_4) [31], and for the maltose rich phase (25.42 - 273.63 mPa.s) in the system maltose + tetrahydrofuran [13].

3.2. Partition of Phenolic Compounds

The differential partitioning of cyanidin 3-O-glucoside chloride, gallic acid and quercetin in OTPS based on polyvinylpyrrolidone with different molecular weight, acetonitrile and water was studied in system with similar TLL (system A – TLL= 18.52: 12.05 wt% PVP ($10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 62.05 wt% ACN + 25.90 wt% H_2O ; system B – TLL = 19.38: 9.02 wt% PVP ($29.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 59.02 wt% ACN + 31.96 wt% H_2O ; system C – TLL= 20.57: 8.89 wt% PVP ($40.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 58.89 wt% ACN + 32.22% H_2O) at

298.15 K and 0.1 MPa. The partition coefficients and extraction efficiency are depicted in Figure 4 and Table DB7 of Data in Brief).

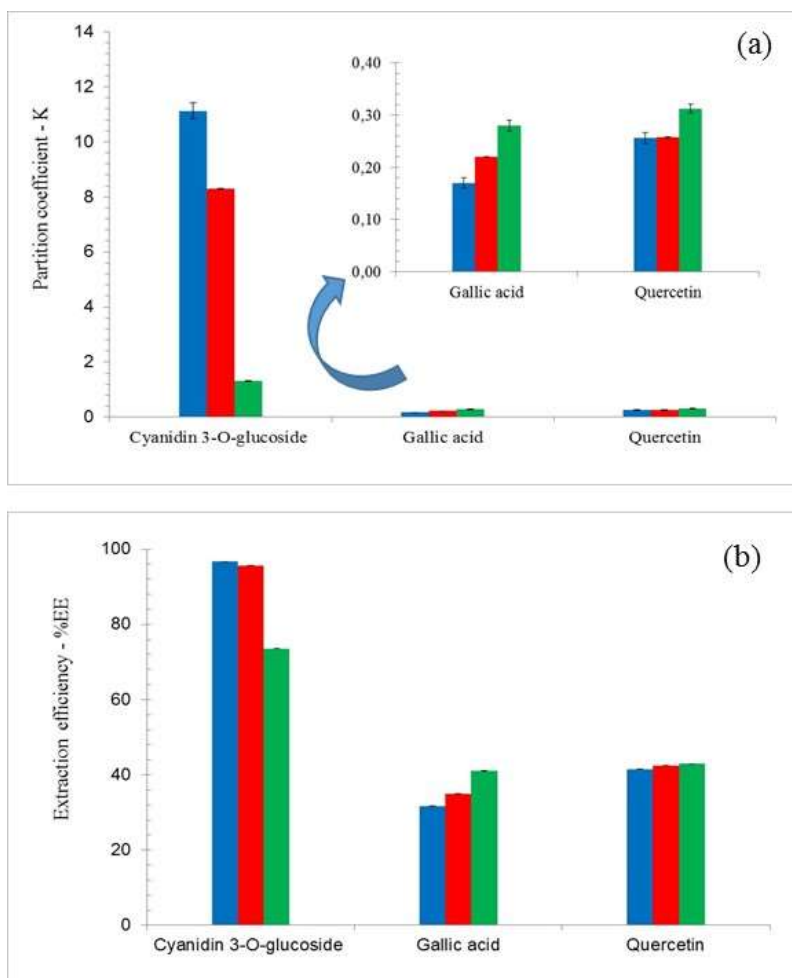


Figure 4. Partition coefficient (a) and extraction efficiency (b) of cyanidin-3-glucoside (0.2 mg/L), quercetin (100 mg/L) and gallic acid (600 mg/L) in a system formed by + acetonitrile + water at 298 ± 1 K) and 0.10 ± 0.01 MPa.. (■) - PVP $10.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (System A); (■) - PVP $29.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (System B), and (■) - PVP $40.000 \text{ g.mol}^{-1}$ (System C).

The mass balance of compounds confirmed (within $\pm 10.0\%$ error), that the precipitation of biomolecules in the interface has been neglected. The cyanidin 3-O-glucoside chloride has a preferential migration towards the top phase ($1.32 \leq K_{\text{CYN}} \leq 11.12$), while gallic acid ($0.17 \leq K_{\text{AGA}} \leq 0.28$) and quercetin ($0.26 \leq K_{\text{QUE}} \leq 0.31$) were found mostly in bottom phase. This behavior corroborates the charge of the biomolecules in the system.

The pH values of both phases were measured, and were ranged between 4.84 and 7.55 for the top phase and 5.50 and 7.55 for the bottom phase (Table 4). Under the

conditions of partitioning and observing the speciation curve of biomolecules (Figure DB2-DB4 in the Supporting Information), cyanidin 3-O-glucoside chloride presents a negative charge and favorable migration to the water rich phase, whereas gallic acid and quercetin appear to be uncharged, thus tending to migrate to the PVP-rich phase.

Table 4. pH values of phase of acetonitrile (top) and polyvinylpyrrolidone (bottom) at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

Biomolecule	System A		System B		System C	
	Top	Bottom	Top	Bottom	Top	Bottom
Cyanidin 3-O-glucoside chloride	6.06	4.58	4.85	4.61	6.51	5.02
Gallic acid	5.79	5.63	4.93	4.60	4.84	4.87
Quercetin	7.55	6.18	6.02	4.50	4.96	4.75

^a Standard uncertainties u are $u(\text{pH}) = 0.1$, $u(T) = 1$ K, and $u(p) = 10$ kPa.

Another justification for the biomolecules partitioning is related to the values of the logarithm of the octanol-water coefficient ($\log K_{ow}$), which are -0.50, 0.86 and 1.48 for cyanidin-3-O-glycoside, gallic acid and quercetin, respectively. Therefore, negative $\log K_{ow}$ is associated with greater affinity with water, i.e. with hydrophilic constituents, whereas positive $\log K_{ow}$ is related to hydrophobic constituents (PVP).

On the other hand, the increase in the mass of PVP molecule rises the number of CH_2 groups of the PEG, which trend to interact with aromatic structures of the anthocyanins [32], allowing a larger migration of cyanidin 3-O-glucoside chloride to the bottom phase, and consequently decreasing the partition coefficient. Therefore, the migration can be significantly altered by the structures characteristics of PVP. It should also be noted that the biomolecules partitioning into a liquid-liquid systems is mainly attributed to the hydrophilic/hydrophobic balance of the system, followed by the size and shape of the biomolecule [33]. For these reasons, it is likely that quercetin and gallic acid partitioned differently when the molecular weight of the PVP increased.

The aromatic ring of gallic acid had more influence in the hydrophobic characteristics, allowing more interaction with PVP and their extraction to polymer-rich phase [1].

The extraction efficiency accompanies the biomolecules partitioning, and is inversely proportional to the molecular mass of the PVP, that is, the cyanidin-3-O-glycoside is best recovered in the top phase in PVP 10000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, while gallic acid and

quercetin are best recovered in phase of the bottom with PVP 40000 g.mol⁻¹.

Other authors have found lower values of K_{CYA} and %EE_{CYA}, such as those found by Lima et al. [34] who observed values between 1.39 - 6.70 and 9.45 - 31.90%, respectively. Nevertheless, Reis et al. [35] reported highest extraction efficiency of gallic acid in ATPS 95 % (PEG + salt + water) and 98 % (alcohol + salt + water) than those found in this study.

Differentiated partitioning of the biomolecules allowed the determination of the selectivity of the system (Table 5). The increase in the PVP molecular weight increases the selectivity of the extraction, due to the migration of cyanidin to the top phase and of gallic acid and quercetin to the opposite phase. The selectivity (S) indicates that cyanidin-3-O-glycoside may be more separated from gallic acid ($4.26 \leq S_{CYA/AGA} \leq 65.41$) than that of quercetin ($4.71 \leq S_{CYA/QUE} \leq 42.77$). Wu et al. [36] also studied the selective partitioning of anthocyanins present in mulberry, and observed that 85.1% of the anthocyanins migrated to the ethanol phase (top phase) and 89.5% of the sugars were collected in the bottom phase, which resulted in a selectivity of 47.58.

Table 5. Selectivity of separation of cyanidin-3-O-glycoside using organic two-phase system in system content gallic acid and quercetin at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP (g.mol ⁻¹)	Selectivity (S)	
	$S_{CYA/AGA}$	$S_{CYA/QUE}$
10000 (Systema A)	65.41	42.77
29000 (Systema B)	37.68	31.88
40000 (Systema C)	4.26	4.71

^a Standard uncertainties u are $u(S) = 0.01$, $u(T) = 1$ K and $u(p) = 10$ kPa.

4. Conclusions

This paper reports a new concept of liquid-liquid equilibria, here called the organic two-phase system (OTPS) due to the high content of acetonitrile in both top and bottom phases. OTPSs were formed by acetonitrile (ACN), polyvinylpyrrolidone (PVP) with different molecular weight (10000, 29000 and 40000 g.mol⁻¹) and water at 298 K and atmospheric pressure. Phase diagrams were determined, which were reported the experimental binodal data adjusted by the Merchuck's equation, tie-lines and the critical points were also presented. For all systems, the bottom phase is rich in PVP and the top phase is rich in water. The proposed

systems were applied in the partitioning of three different biomolecules. Cyanidin-3-O-glycoside chloride was preferably partitioned to the top phase (water-rich phase) while gallic acid and quercetin for the bottom phase (PVP-rich phase). The highest selectivity ($S_{\text{CYA/AGA}} = 65.41$ and $S_{\text{CYA/QUE}} = 42.77$) in the cyanidin-3-O-glycoside chloride separation occurred in OTPS formed by ACN (62.05 wt%) + PVP-10000 (12.05 wt%)+ H₂O (25.90 wt%), corresponding to system A with TLL = 18.52).

Acknowledgment

The authors are thankful to *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe* – FAPITEC/SE for the financial support and CNPq for the scholarship of C.M.S. D’Anzicourt.

References

- [1] L. Xavier, M.S. Freire, I. Vidal-Tato, J.González-Álvarez, Aqueous two-phase systems for the extraction of phenolic compounds from Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014) 1772-1778.
- [2] F. He, D. Li, D. Wang, M. Deng, Extraction and purification of quercitrin, hyperoside, rutin, and afzelin from *Zanthoxylum bungeanum* maxim leaves using an aqueous two-phase system, *J. Food Sci.* 81 (2016) C1593–C1602.
- [3] T. Poonsin, B.K. Simpson, S. Benjakul, W. Visessanguan, S. Klomkla, Albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen trypsin partitioning in an aqueous two-phase system and its hydrolytic pattern on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shells. *Int. J. Food Prop.* 20 (2017) 2409–2422.
- [4] B. Y. Zaslavsky, V.N. Uversky, A. Chait, Analytical applications of partitioning in aqueous two-phase systems: Exploring protein structural changes and protein–partner interactions in vitro and in vivo by solvent interaction analysis method, *BBA-Proteins Proteom.* 1864 (2016) 622-644.
- [5] P.A. Albertsson, *Partition of cell particles and macromolecules*, Wiley Interscience, New York, 1986.

- [6] C. Grobmann, R. Tintinger, J. Zhu, G. Maurer, Aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran - experimental results and modeling of thermodynamic properties. *Fluid Phase Equilibr.* 106 (1995) 111-138.
- [7] J.M.P. Barbosa, R.L. Souza, A.T. Fricks, G.M. Zanin, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Purification of lipase produced by a new source of in submerged fermentation using an aqueous two-phase system, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 3853–3858.
- [8] Y. Li, Z. Xu, Q. Luo, X. Lu, J. Hu, Phase diagram of ionic liquid aqueous two-phase systems with *N*-butylpyridinium tetrafluoroborate, ammonium citrate/sodium acetate, and water from 308.15 K to 328.15 K, *Thermochim. Acta.* 632 (2016) 72–78.
- [9] A.M. Ferreira, P.D.O. Esteves, I. Boal-Palheiros, A.B. Pereiro, L.P.N. Rebelo, M.G. Freire, Enhanced tunability afforded by aqueous biphasic systems formed by fluorinated ionic liquids and carbohydrates, *Green Chem.* 18 (2016) 1070-1079.
- [10] A.M. Azevedo, A.G. Gomes, P.A.J. Rosa, I.F. Ferreira, A.M.M.O. Pisco, M.R. Aires-Barros, Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 65 (2009) 14–21.
- [11] S.W. Lo, R.M. Ramanan, B.T. Tey, W.S. Tan, P.L. Show, T.C. Ling, C.W. Ooi, Purification of the recombinant enhanced green fluorescent protein from *Escherichia coli* using alcohol + salt aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 192 (2018) 130–139.
- [12] Z.J. Tan, F.F. Li, X.L. Xu, Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 1105-1113.
- [13] K.M. Sousa, G.E.L.O. 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.
- [14] 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.
- [15] R.L. Souza, R.A. Lima, J.A.P. Coutinho, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase, *Process Biochem.* 50 (2015) 1459-1467.

- [16] 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.
- [17] G.B. Cardoso, I.N. Souza, M.G. Freire, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: Phase diagrams and extractive performance, *Sep. Purif. Technol.* 124 (2014) 54-60.
- [18] G.B. Cardoso, I.N. Souza, M.M. Pereira, M.M., 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 (2014b) 74-80.
- [19] G.B. Cardoso, I.N. Souza, M.M. Pereira, M.M., 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.
- [20] G.Bianco, M.S. Soldi, E.A. Pinheiro, A.T.N. Pires, M.H. Gehlen, V. Soldi, Thermal stability of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-methacrylic acid) copolymers in inert atmosphere, *Polym. Degrad. Stab.* 80 (2003) 567–574.
- [21] A.H. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, third ed., Pharmaceutical Press, London, 2000.
- [22] D. Zhang, Y. Zhang, Y. Wen, K. Hou, J. Zhao, Intrinsic kinetics for the synthesis of acetonitrile from ethanol and ammonia over Co-Ni/ γ -Al₂O₃ catalyst. *Chem. Eng. Res. Des.* 89 (2011) 2147–2152.
- [23] M. Taha. H.L. Teng. M.J. Lee, Phase diagrams of acetonitrile or (acetone + water + EPPS) buffer phase separation systems at 298.15 K and quantum chemical modeling, *J. Chem. Thermodyn.* 54 (2012) 134–141.
- [24] Y. Gu, P.H. Shih, Salt-induced phase separation can effectively remove the acetonitrile from the protein sample after the preparative RP-HPLC, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 592–597.
- [25] 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.
- [26] R.H. Kaul, *Aqueous Two-Phase Systems, Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, 2000.
- [27] 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.

- [28] M.G. Freire, A.F.M. Claudio, J.A.P. Coutinho, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem Soc Rev* 41 (2012) 4966–4995.
- [29] M.V. Quental, H. Passos, K.A. Kurnia, J.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.
- [30] I. Regupathi, R. Govindarajan, S.P. Amaresh, T. Murugesan, Densities and viscosities of polyethylene glycol 6000 + triammonium citrate + water systems, *J. Chem. Eng. Data.* 54 (2009) 3291–3295.
- [31] S.M. Snyder, K.D. Cole, D.C. Szlag, 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.
- [32] C. Jampani, K.S.M.S. Raghavarao, Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Sep. Purif. Tech.* 151 (2015) 57–65.
- [33] M. Videira, M.R. Aires-Barros, Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate, *J. Chromatogr. A.* 668 (1994) 237–240.
- [34] 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.
- [35] I.A.O. Reis, A.F. Campos, P.H.S. Santos, S.B. Santos, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied in the extraction of gallic acid from guava, *Sep. Sci. Technol.* 50 (2014) 520–528.
- [36] X. Wu, L. Liang, Y. Zou, T. Zhao, J. Zhao, F. Li, L. Yang, Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chem.* 129 (2011) 443–453.

APPENDIX A. Data in Brief

Data in brief associated with this article can be found, in the online version.

DATA IN BRIEF

DATA OF PHASE DIAGRAM AND PHENOL COMPOUNDS PARTITIONING IN ORGANIC TWO-PHASE SYSTEMS BASED ON ACETONITRILE + WATER + POLYVINYLPIRROLIDINE

Bruno Sales Oliveira^a, Camila Maria de Souza D'Anzicourt^a, Cleide Mara Faria Soares^{a,b},
Ranyere Lucena de Souza^{a,b}, Álvaro Silva Lima^{a,b,*}

^aTiradentes University, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

^bInstitute of Technology and Research, Av. Murilo Dantas, 300-Prédio do ITP, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed: e-mail: alvaro_lima@itp.org.br.
Tel.: +55 7932182115. Fax: +55 7932182190.

Table DB1. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP
 10.000 g.mol⁻¹ (1) + ACN (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP 100w₁	ACN 100w₂	H₂O 100w₃
31.18	54.64	14.18
27.91	55.77	16.32
25.90	56.65	17.45
24.56	57.09	18.35
23.49	57.43	19.08
22.24	57.91	19.84
20.87	58.13	21.00
19.01	59.00	21.99
17.90	59.09	23.00
16.97	59.68	23.36
15.89	59.90	24.20
15.17	59.92	24.91
14.44	60.45	25.12
13.69	60.56	25.75
12.97	60.71	26.33
12.20	61.05	26.75
11.52	61.39	27.08
11.07	61.40	27.53
10.48	61.35	28.16
9.51	62.10	28.38
8.90	62.33	28.76
8.49	62.32	29.18
7.94	62.23	29.82

^a Standard uncertainties u are u([PVP], [ACN] or [H₂O]) = 0.01, u(T) = 1 K, and u(p) = 10 kPa.

Table DB2. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP 29.000 g.mol⁻¹ (1) + ACN (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP 100w₁	ACN 100w₂	H₂O 100w₃
14.98	55.97	29,05
13.78	56.37	29,85
12.61	56.86	30,54
11.66	57.12	31,22
11.01	57.40	31,59
10.43	57.56	32,01
9.85	57.62	32,53
9.31	57.85	32,84
8.87	58.08	33,05
8.39	58.24	33,37
7.74	59.01	33,25
7.31	59.24	33,44
6.95	59.34	33,71
6.54	59.60	33,86
6.08	59.81	34,11
5.68	59.98	34,34
5.29	60.16	34,54
5.02	60.24	34,74
4.72	60.45	34,83
4.42	60.65	34,93
4.17	60.76	35,07
3.98	60.96	35,06
3.74	61.33	34,94
3.56	61.38	35,06
3.40	61.55	35,06
3.26	61.64	35,10
3.13	61.75	35,12
2.97	61.98	35,04

^a Standard uncertainties u are u([PVP], [ACN] or [H₂O]) = 0.01, u(T) = 1 K, and u(p) = 10 kPa.

Table DB3. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of PVP 40.000 g.mol⁻¹ (1) + ACN (2) + water (3) at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

PVP 100w₁	ACN 100w₂	H₂O 100w₃
33.25	52.77	13.98
31.16	52.87	15.97
29.25	53.33	17.42
26.88	53.88	19.24
24.90	54.36	20.74
23.06	54.92	22.01
21.76	55.23	23.01
20.36	55.48	24.15
19.04	55.98	24.99
17.59	56.16	26.24
16.31	56.33	27.36
15.46	56.48	28.06
14.27	56.79	28.94
13.65	56.98	29.37
13.09	57.16	29.75
12.57	57.28	30.14
12.29	57.40	30.31
11.82	57.51	30.67
11.34	57.64	31.02
10.97	57.68	31.35
10.59	57.79	31.62
10.19	57.90	31.91
9.3	58.00	32.17
9.52	58.11	32.37

^a Standard uncertainties u are u([PVP], [ACN] or [H₂O]) = 0.01, u(T) = 1 K, and u(p) = 10 kPa.

Table DB4. Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System A consists of 12.05 wt% PVP ($10.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 62.05 wt% ACN + 25.9 wt% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

Temperature K	Density / $\text{g}\cdot\text{cm}^3$		Viscosity / $\text{mPa}\cdot\text{s}$	
	Top Phase	Bottom Phase	Top Phase	Bottom Phase
278	0.8512	1.0243	0.65450	82.1320
283	0.8465	1.0240	0.60373	54.2160
288	0.8416	1.0250	0.55202	39.1010
293	0.8367	1.0228	0.50468	30.0560
298	0.8318	1.0197	0.46222	24.6370
303	0.8268	1.0157	0.42625	20.4290
308	0.8217	1.0121	0.39301	17.1210
313	0.8166	1.0081	0.36319	14.4770
318	0.8114	1.0039	0.33684	12.3300
323	0.8062	0.9997	0.31249	10.5560
328	0.8010	0.9958	0.29140	9.1172
333	0.7956	0.9914	0.27046	7.9359
338	0.7902	0.9864	0.24036	6.9630
343	0.7847	0.9819	0.19725	6.1695

^a Standard uncertainties u are $u(\rho) = 5 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $u(\eta) = 0.35\%$, $u(T) = 0.02 \text{ K}$, and $u(p) = 10 \text{ kPa}$.

Table DB5. Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System B consists of 9.02 wt% PVP ($29.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 59.02 wt% ACN + 31.96 wt% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

Temperature K	Density / $\text{g}\cdot\text{cm}^3$		Viscosity / $\text{mPa}\cdot\text{s}$	
	Top Phase	Bottom Phase	Top Phase	Bottom Phase
278	0.8620	1.0125	0.74113	103.490
283	0.8574	1.0101	0.67609	79.979
288	0.8528	1.0097	0.61341	58.963
293	0.8481	1.0071	0.55958	46.305
298	0.8434	1.0037	0.50991	38.022
303	0.8385	1.0002	0.46653	31.952
308	0.8336	0.9965	0.42614	27.037
313	0.8287	0.9924	0.38824	23.060
318	0.8237	0.9879	0.35063	19.826
323	0.8186	0.9834	0.31284	17.142
328	0.8138	0.9784	0.27960	14.879
333	0.8086	0.9727	0.26509	12.979
338	0.8034	0.9658	0.23186	11.358
343	0.7980	0.9563	0.21122	9.880

^a Standard uncertainties u are $u(\rho) = 5 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $u(\eta) = 0.35\%$, $u(T) = 0.02 \text{ K}$, and $u(p) = 10 \text{ kPa}$.

Table DB6. Experimental density ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) and viscosity ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) of organic two-phase system used in the partition of biomolecules. System C consists of 8.89% PVP ($29.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) + 58.89% ACN + 32.22% H_2O at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

Temperature K	Density / $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$		Viscosity / $\text{mPa}\cdot\text{s}$	
	Top Phase	Bottom Phase	Top Phase	Bottom Phase
278	0.8628	1.0004	0.76526	156.8400
283	0.8582	0.9984	0.69710	113.1300
288	0.8536	0.9966	0.63041	84.6880
293	0.8489	0.9942	0.57318	68.5900
298	0.8441	0.9914	0.52248	56.2750
303	0.8392	0.9884	0.47817	47.0050
308	0.8343	0.9851	0.43868	40.0810
313	0.8294	0.9808	0.40337	34.4360
318	0.8244	0.9762	0.37164	29.7710
323	0.8193	0.9717	0.34325	25.9040
328	0.8142	0.9677	0.31711	22.7030
333	0.8089	0.9634	0.29671	19.9550
338	0.8037	0.959	0.27238	17.6190
343	0.7984	0.9545	0.22767	15.6140

^a Standard uncertainties u are $u(\rho) = 5 \times 10^{-4} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, $u(\eta) = 0.35\%$, $u(T) = 0.02 \text{ K}$, and $u(p) = 10 \text{ kPa}$.

Table DB7: Partitioning coefficient and extraction efficiency of biocompounds at 298.15 K and 0.1 MPa.^a

Biocompounds	PVP	K	EE%
Cyanidin 3-O-glucoside chloride	10000	11.12 ± 0.30	96.69 ± 0.07
	29000	8.29 ± 0.18	95.61 ± 0.09
	40000	1.32 ± 0.01	73.55 ± 1.44
Gallic acid	10000	0.17 ± 0.01	32.00 ± 1.03
	29000	0.22 ± 0.00	35.00 ± 0.00
	40000	0.28 ± 0.01	41.00 ± 1.00
Quercetin	10000	0.26 ± 0.01	41.48 ± 1.03
	29000	0.26 ± 0.00	42.00 ± 0.09
	40000	0.31 ± 0.01	42.97 ± 0.68

^a Standard uncertainties u are u(T) = 1 K and u(p) = 10 kPa.

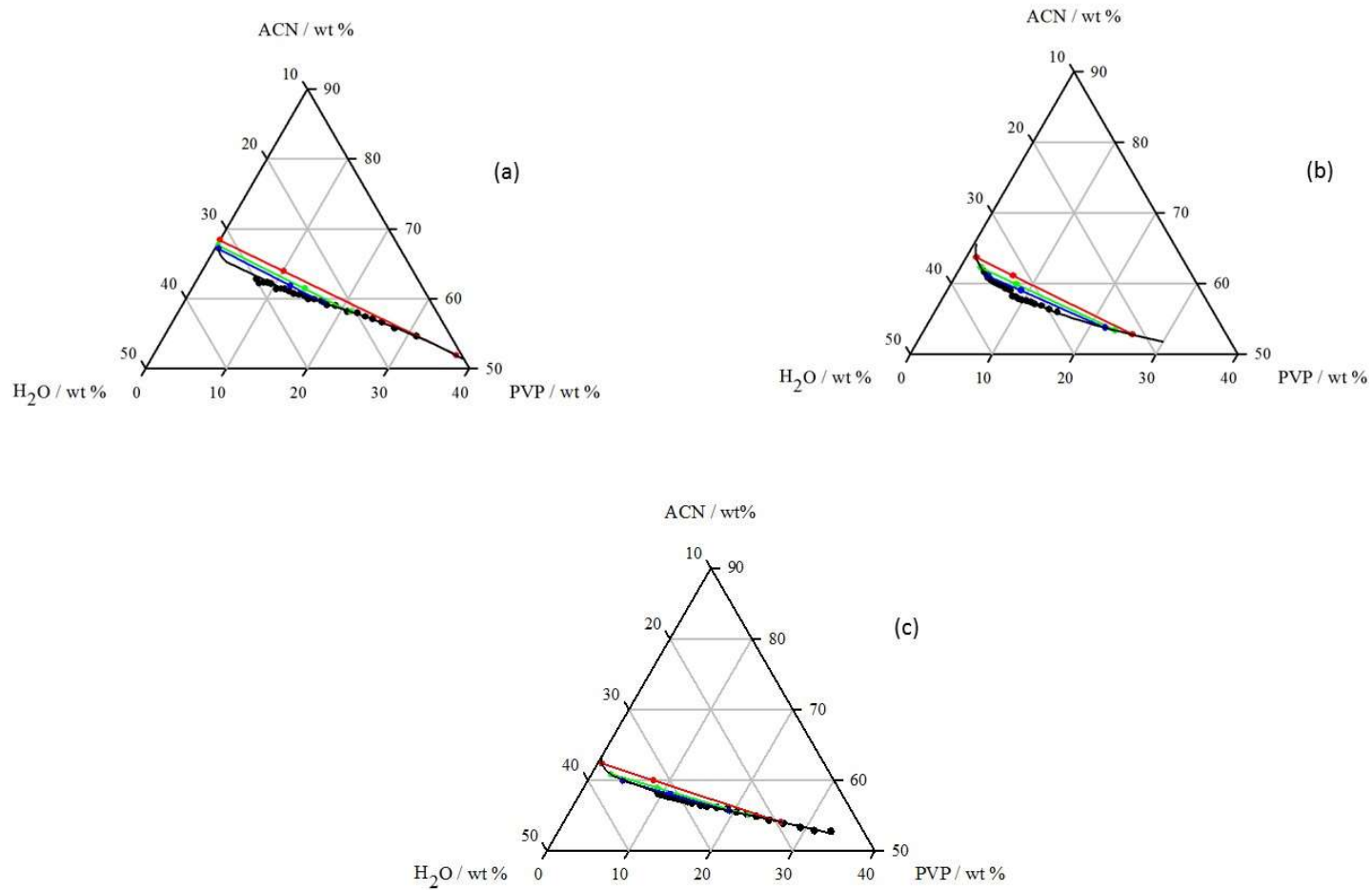


Figure DB1. Phase diagrams for ternary systems composed of acetonitrile + PVP + water at 298.15 K and 0.1 MPa. (a) PVP 10.000 gmol⁻¹; (b) PVP 29.000 gmol⁻¹; (c) PVP 40.000 gmol⁻¹.

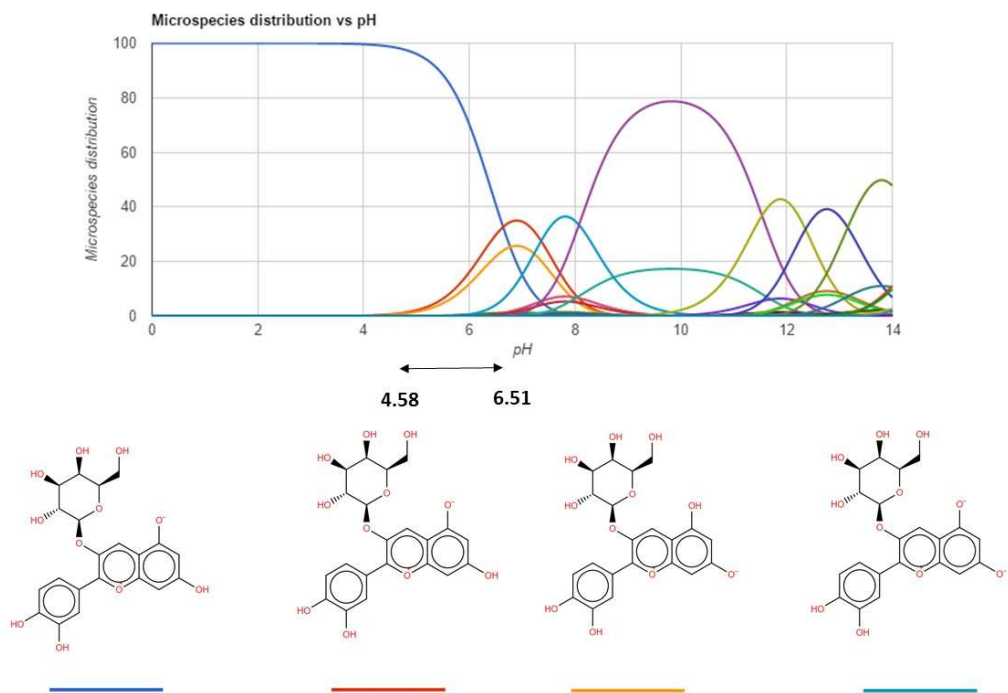


Figure DB2. Chemical structure of cyanidin 3-O-glucoside at different pH values. This content was adapted from ChemSpider chemistry database [1].

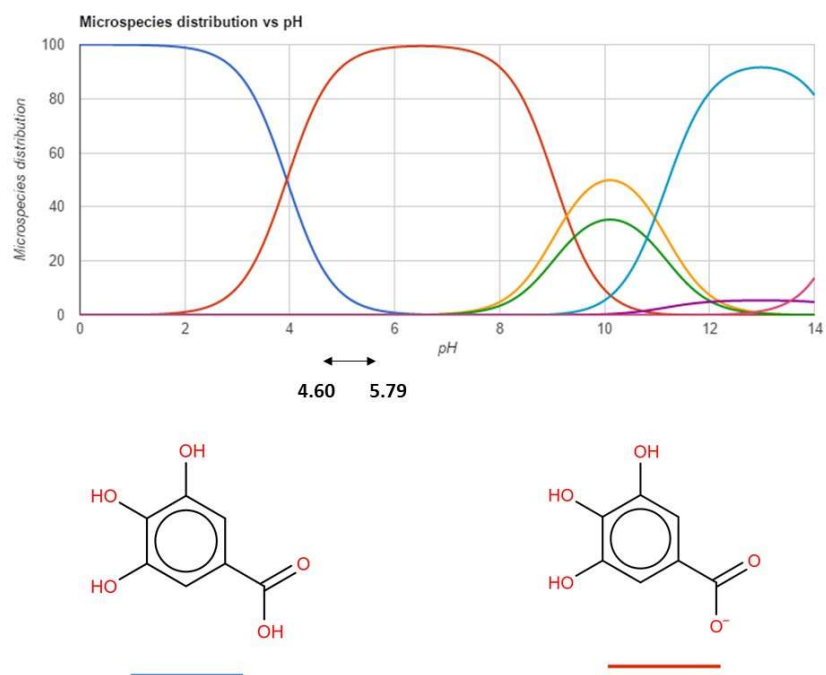


Figure DB3. Chemical structure of gallic acid at different pH values. This content was adapted from ChemSpider chemistry database [1].

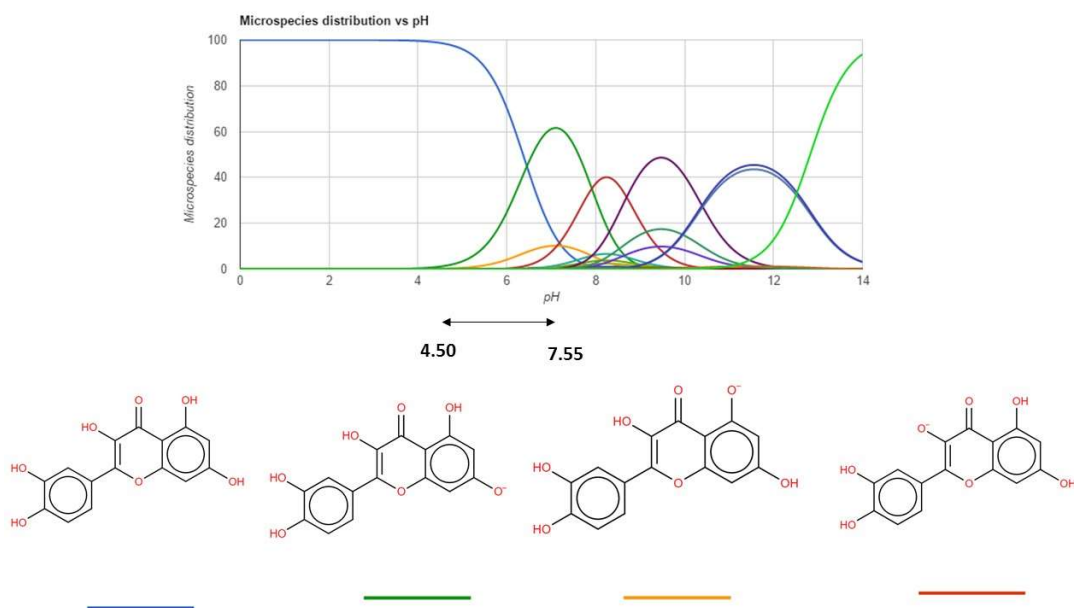


Figure DB4. Chemical structure of quercetin at different pH values. This content was adapted from ChemSpider chemistry database [1].

ARTIGO II

Sequential extraction of anthocyanins from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) using non-conventional protocols followed by purification based on organic two-phase system

Bruno Sales Oliveira¹, Ranyere Lucena de Souza^{1,2}, Cleide Mara Faria Soares^{1,2}, Álvaro Silva Lima^{*1,2}

¹Post-Graduated Program on Process Engineering, Tiradentes University, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

²Institute of Technology and Research Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

To whom correspondence should be addressed: e-mail: alvaro_lima@itp.org.br. Phone: +55 7932182115. Fax: +55 7932182190.

Abstract

Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) is an exotic Brazilian fruit with a high content of phenolic compounds, mainly anthocyanins, that presents antioxidant properties for use in both the food and pharmaceutical industries. The present study focuses on the multivariate optimization of the extraction of anthocyanins from the jaboticaba peel by conventional agitation method (as a standard) and non-conventional methods by microwave- or ultrasound-assisted extraction using acetonitrile (ACN) aqueous solution and sequential purification in organic two-phase system (OTPS) based on ACN and polyvinylpyrrolidone (PVP) with molecular weight 10.000 g.mol⁻¹. Ultrasound-assisted extraction showed the best operating conditions and produced up to 2.60 mg.g⁻¹ of anthocyanins. During the purification protocol using OTPS, the highest selectivity ($S = 3.12$, $K_{ANT} = 1.56$, $R_T = 75.67\%$) was obtained in the water-rich phase (top phase) using ACN (64 wt%), PVP (6 wt%) and water (30 wt%) at 45 °C and 0.1 mPa. The partitioning process is spontaneous.

Keywords: Jaboticaba peel, biomass, anthocyanins, extraction, organic two-phase system

1. Introduction

There is much epidemiological evidence that diets rich in dark-colored edible fruit can reduce the incidence of cardiovascular disease, diabetes, cancer, and stroke (Crozier et al., 2009). Recently, there has been interest in tropical fruits in developed and developing countries because of their health benefits (Oliveira et al., 2012). This interest is accompanied by a global trend towards the use of natural phenolics as functional ingredients due to their antioxidants capability and prevalence in nature (Akter et al., 2011). Thus, edible fruits, such as jabuticaba, blueberry and grapes, were called "super fruits", especially in the food industry (Crozier et al., 2009).

Jabuticaba is an exotic native fruit from Brazil, which belongs to the family Myrtaceae and it is found spontaneously from north to south country (Cavalcanti et al., 2011). It is known as "Brazilian grape", and it has a sweet and pleasant flavor with little acidity, can be consumed in the *in natura* form or used in food preparations such as juice, jellies, liqueurs and wines (Wu et al., 2012). Similar to other dark-colored fruits, jabuticaba is also an important source of traditional nutrients and phytochemicals, such as polyphenols. These compounds, such as anthocyanins, have well-described biological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic and antiobesity properties, and have the potential to treat chronic obstructive pulmonary disease (Wu et al., 2012).

Anthocyanins are a group of water-soluble bioflavonoids that confer the blue, purple and red color to several fruits and vegetables (Spigno et al., 2007). They occur in nature as glycosides of anthocyanidins and can be acylated with organic or aliphatic acids, such as coumaric, coffee, ferulic, phytoxybenzoic, acetic, malonic, succinic, oxalic and malic acids (Türker and Erdogdu, 2006; Gris et al., 2007). Its general structure is derived from the 3-position flavyl cation which may be substituted with hydrogen, hydroxyl or methoxy residues, as shown in Figure 1.

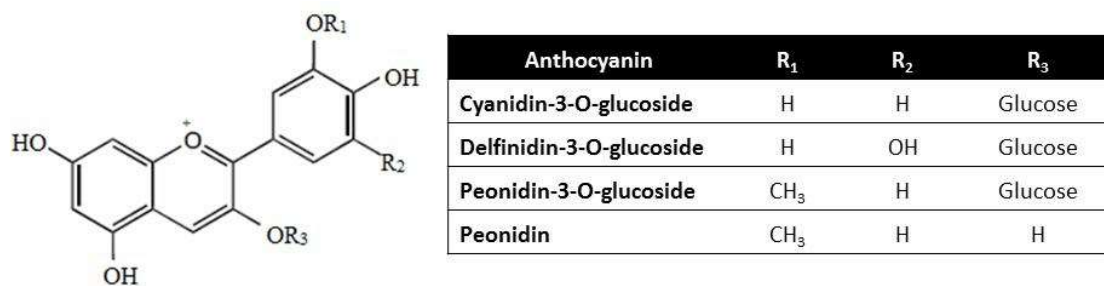


Figure 1: Chemical structures of anthocyanins reported in jabuticaba.

In jabuticaba it is common to find anthocyanins such as cyanidin, delphinidin and peonidine, which are antioxidants obtained by conventional extractions using solvents with different polarities, and by non-conventional techniques such as ultrasound- (Porto et al., 2013) or microwave-assisted extraction (Ballard et al., 2010). In order to apply anthocyanins in health care, an efficient process for extraction and purification is required. The literature reports several methods to extract phenolic compounds, including conventional extraction using different organic solvents with variable solvent-water ratio, with or without addition of acids (Lafka et al., 2007; Fontana et al., 2013; Cai et al., 2016), assisted by microwave and ultrasound (González-Centeno et al., 2014; Pedroza et al., 2015), employing subcritical water (Aliakbarian et al., 2012) or supercritical CO₂ (Porto et al., 2014). However, recent developments with modern extraction techniques such as the use of supercritical fluids may result in increased costs for the extraction process, because they require special equipments and high-energy consumption (Pedro et al., 2016). In any case, the procedure for anthocyanin extraction requires the careful optimization of operational conditions such as solvent type, solid/liquid ratio, agitation and temperature (Pedro et al., 2016). In order to eliminate some of these disadvantages, aqueous two-phase system (ATPS) that can be considered a liquid-liquid extraction technique is presented as an alternative for extracting and purifying biomolecules because it is biocompatible (Reis et al., 2014).

In the literature there are already works with aqueous two-phase system formed by polymer-polymers (Grobmann et al., 1995) and polymers-salts; PEG-phosphate buffer (Barbosa et al., 2011), and more recently the systems formed with acetonitrile (ACN) together with carbohydrates (Cardoso et al., 2013), with polyols (Cardoso et al., 2014a), with polyvinylalcohol (PVA) (Cardoso et al., 2015) and with dextran (Cardoso et al., 2014b), beside liquid ionic and salts (Lima et al., 2017). However, the literature has not yet reported biphasic system based on ACN, PVP and water, which the both phases are rich in an organic solvent and for this reason are called organic two-phase system and are applied in this work.

Polyvinylpyrrolidone (PVP) commercially known by povidone is a homopolymer of *N*-vinyl-2-pyrrolidone obtained by radical polymerization in water or in isopropyl alcohol, hygroscopic and compatible with a wide range of resins hydrophilic and hydrophobic. PVP is a white, amorphous, free flowing powder that solubilizes in water and in organic solvents, having the ability to form stable complexes with polymers and surfactants (Speight et al., 1992). It is widely used in pharmaceutical technology as a binder and disintegrant for tablet and suspending agent to liquid pharmaceutical forms. The high frequency of applications of PVP and its copolymers in medicine and in the pharmaceutical industries occur due to its properties: solubility in water and in organic solvents, stable, non-toxic, has complex abilities with several substances when in aqueous solution, ability to form films and to interact with other polymers (Mano, 1988; Kibbe, 2000). The structural formula gives it an amphiphilic character, which is due to existence of the highly polar amide group with hydrophilic properties, methylene groups and methyl present in the backbone with hydrophobic properties (Kibbe, 2000).

Apart from the solid-liquid extraction of anthocyanins, their purification is a key step in the recovery of phenolic compounds from crude biomass. Some strategies are available such as chromatography and adsorption in macroporous adsorbent (Jampani et al., 2014; Chen et al., 2016), while less attention has been devoted to the concept of liquid-liquid extraction and

purification. Several advantages have been reported for the application of liquid-liquid in purification of complex biomolecule extracts. Most importantly, liquid-liquid protocols can prevent biomolecule denaturation or loss of biological activities (i.e. biocompatibility) (Pereira et al., 2010; Freire et al., 2011; Cardoso et al., 2014b). Besides the separation processes are easy to scale-up, can be run in a continuous manner and moreover may offer high yields of biomolecules, better selectivity and lower associated cost compared to conventional strategies (Cláudio et al., 2012; Passos et al., 2013).

In here, we present a strategy for the consecutive extraction and purification of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel using aqueous acetonitrile solution as the extracting solvent and a simplified separation using OTPS formed of polyvinylpyrrolidone with molecular mass 10.000 g.mol⁻¹. The parameters of solid-liquid extraction by conventional method in agitation and non-conventional methods by microwave assisted extraction and ultrasound were evaluated. In addition, this work presents the best operational conditions to obtain the highest selectivity of total anthocyanins in OTPS, allowing their separation of their contaminants.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fruits were purchased in the local market of Aracaju-SE, which were transported to the laboratory in thermal boxes, washed and sanitized (20 mg.L⁻¹ sodium hypochlorite). The peels were dried in an oven at 55 °C until constant weight, because temperatures above 60°C degrade the anthocyanins. Then, they were milled in a knife mill to a particle size of 42 μm, packed and stored in polypropylene bags at 4 °C. The extractions were carried out with ACN (HPLC grade with a purity of 99.9 wt%) and for the purification of the anthocyanins the PVP of molecular mass 10.000 g.mol⁻¹ (> 99 wt%) both reagents were obtained from Sigma-Aldrich. The standards of phenolic compounds used were cyanidin-3-O-glucoside chloride, delphinidin-3-

O-glucoside chloride and gallic acid, were also purchased from Sigma-Aldrich (HPLC grade \geq 95 wt%). All others chemicals had analytical grade.

2.2. Stirring in water bath (SWB)

The extraction was performed by optimizing different concentrations of the solvent (0 – 100%) (mL.mL^{-1}), solid/liquid ratios (25 – 250 mg.mL^{-1}), temperature (25 – 55 °C) and time extraction (1 – 240 minutes). For the study of each effect three variables were fixed and the extractions performed in shaker, model NT 230 - DUNNOFF, at 150 rpm. The obtained extracts were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes in a MIKRO centrifuge, filtered through a Millipore filter (0.45 μm) and analyzed for phenolic compounds and total anthocyanins by UV spectroscopy using a Varian Cary 50 Bio UV spectrophotometer -Vis.

2.3. Ultrasound assisted extraction (UAE)

The extraction was performed at a fixed concentration of 60% (mL.mL^{-1}) acetonitrile and a solid/liquid ratio of 100 mg.mL^{-1} , optimizing the power of the equipment (0 – 100%) 300 watts, temperature (25 – 55 °C) and time (1 – 240 minutes). For the study of each effect four variables were fixed and extractions performed in ultrasonic bath, model USC-2850A. The obtained extracts were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes in a MIKRO centrifuge, filtered through a Millipore filter (0.45 μm) and analyzed for phenolic compounds and total anthocyanins by UV spectroscopy using a Varian Cary 50 Bio UV spectrophotometer -Vis.

2.4. Microwave assisted extraction (MAE)

The extraction was performed at a fixed concentration of 60% (mL.mL^{-1}) acetonitrile and a solid/liquid ratio of 100 mg.mL^{-1} , optimizing the power of the equipment (0 – 100%) 300 watts, temperature (25 – 55 °C) and time (1 – 30 minutes). For the study of each effect four variables were fixed and the extractions performed in a microwave extractor Discover SP

ActiVent (CEM, Matthews, North Carolina, USA). The obtained extracts were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes in a MIKRO centrifuge, filtered through a Millipore filter (0.45 µm) and analyzed for phenolic compounds and total anthocyanins by UV spectroscopy using a Varian Cary 50 Bio UV spectrophotometer -Vis.

2.5. Analytical determinations

2.5.1. Total anthocyanins (ANT)

The total anthocyanins content (ANT) was determined using the differential pH method (Fuleki et al., 1968; Hosseinian et al., 2008) using two solutions, a potassium chloride buffer at pH 1.0 and another of sodium acetate at pH 4.5. Aliquots of the extracts were diluted 10 fold to a final volume of 5 mL. The absorbance of each sample was measured at 520 nm and 700 nm on a Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrophotometer. The total content of anthocyanins was expressed in cyanidin-3-glucoside equivalent and calculated by Equations (1-2):

$$C \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF}}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4.5} \quad (2)$$

where A is the absorbance, MW is the molecular weight of cyanidin-3-glucoside (449.2 g.mol⁻¹), DF is the dilution factor, and ε is the molar absorbance of cyanidin-3-glucoside (26,900 mol.L⁻¹), L is the bucket path length (1 cm). Finally, the results were converted to milligram equivalents of cyanidin-3-glucoside.g⁻¹ of dry bark.

2.5.2. Total phenolic content (TPC)

The total phenolics content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu method (Meda et al., 2005). Aliquots of 0.1 mL extract were respectively dissolved in 2.8 mL deionized water, 2 mL of 2% sodium carbonate (Na₂CO₃), and 0.1 mL Folin-Ciocalteu 50% (v/v). After incubation at room temperature for 30 min, the absorbance of the mixture was measured at 690

nm against a blank of deionized water on a Varian Cary 50 Bio UV-Vis spectrophotometer using an eight-point standard curve (200-1400 mg.L⁻¹) of gallic acid. The total phenolic content levels were determined in triplicate and the data was expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter. Finally, the results were converted to milligram equivalents of gallic acid (EAG).g⁻¹ of dry bark.

2.5.3. Chromatographic analysis of the extract

The extract of jabuticaba peels obtained from the best extraction method was analyzed by a high performance liquid chromatography (HPLC) system (model Prominence, brand Shimadzu) with a UV-VIS detector, wavelength 520 nm, type of column C18 (ODS2 , length = 150 mm, internal diameter = 4.6 mm, particle size = 5 µm and pore size = 100 Å, phenomenex), mobile phase consisting of water: acetonitrile: acetic acid (90: 5: 5 v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min, isocratic mode, column temperature 35 °C, injection volume equal to 20 µL and elution time 40 min. All these chromatographic conditions were adapted (Leite-Legatti et al., 2012). For identification and quantification of compounds, a calibration curve was first constructed using a solution of a mix of two anthocyanin standards. The standards of cyanidin-3-O-glucoside chloride and delphinidin-3-O-glucoside chloride were used to quantify individual anthocyanins at concentrations of 4, 8, 12, 16 and 20 mg.L⁻¹. The anthocyanin concentration was detected at 520 nm and identified by its retention times and by comparison of its UV-VIS spectra from 190 to 800 nm. The concentrations of the anthocyanin compounds were calculated from the peak areas of samples and the corresponding standards.

2.6. Anthocyanin purification

The procedure was performed using mixture points in the OTPS biphasic region at concentrations of PVP (6 – 10 wt%), water (27 – 30 wt%) and temperature (5 – 45 °C). Partition systems were prepared by weighing the appropriate quantities of the polymer and solutions

containing anthocyanin obtained from the best extraction method in 15 mL graduated centrifuge tubes a total mass of 5 g. The content of acetonitrile and water were increased taking into account the content that is already present in the anthocyanin extract. The mixtures were then gently shaken and the graduated tubes equilibrated at the chosen temperature and atmospheric pressure for at least 12 hours using magnetic stirring (Model LM-MS-H-S) bath to achieve equilibrium and to promote the complete partitioning process of the anthocyanin. The two phases were then carefully collected for the determination of their volume and weight, and the total anthocyanin content and the total phenols concentration were quantified in the top and bottom phases.

Total anthocyanin content (ANT) was expressed in cyanidin-3-O-glycoside equivalent and quantified by high performance liquid chromatography using the calibration curve of cyanidin-3-O-glucoside chloride and total phenols (TPC) were obtained by spectrophotometry and expressed as gallic acid. Quantifications were performed in triplicates using as a blank consisting of top and bottom phase. The final partition coefficients and extraction efficiencies were determined, and the optimization of the anthocyanin purification was evaluated by the selectivity of the systems that were reported as mean of the three trials (accompanied by the respective standard deviations). It should be noted that for all studies studied OTPS, the top phase was rich in water while the bottom phase corresponded to the PVP-rich phase.

The partition coefficient (K) is defined as the ratio between the total anthocyanin concentrations or total phenolic content in the top phase and bottom phase. To evaluate the partitioning process, the volume ratio (R_V) and recovery of total anthocyanin to the top (R_T) were determined according to equations 3 – 5.

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (3)$$

$$R_V = \frac{V_T}{V_B} \quad (4)$$

$$R_T = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{R_V \times K}\right)} \quad (5)$$

where C_T is the total anthocyanin concentration or total phenolic content, V is phase volume and T and B correspond to the top and bottom phases, respectively. R_V represents the volume ratio between the volume of the top phase (V_T) and the volume of the bottom phase (V_B), K_{ANT} represents the partition coefficients of anthocyanin.

The selectivity of the systems is defined as the ratio between the partition coefficient of total anthocyanins and total phenols determined according to equation 6.

$$S = \left(\frac{K_{ANT}}{K_{TPC}} \right) \quad (6)$$

where K_{ANT} represents the partition coefficients of anthocyanins, and K_{TPC} the partition coefficients of total phenolic respectively.

The van't Hoff equation (equation 7) was used to determine the standard molar thermodynamic functions of transfer such as 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 ($\Delta_{tr}S_o^m$) correlated with the total anthocyanins partition coefficient at different temperatures (5 to 45°C).

$$\Delta_{tr}G_m^o = \Delta_{tr}H_m^o - T \times \Delta_{tr}S_m^o = -RT \ln(K_{ANT}) \quad (7)$$

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

3. Results and discussion

3.1. Extraction using stirring in water bath (SWB)

In order to understand the effect of solvent (acetonitrile) in the measurement of best operational condition for extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel, it was employed an extraction using a stirring in water bath, which is called conventional extraction. Figure 2 (Table S1 of the Supporting Information) depicted the experimental data. The increase of ACN concentration resulted in the increasing of the anthocyanin and total phenolic compounds extraction from jabuticaba peels (Figure 2a) at solid/liquid ratio 100 mg.mL⁻¹, 30, however above 60% (v/v) (3.34 ± 0.04 mg.g⁻¹) and 40% (v/v) (11.78 ± 0.2 mg.g⁻¹), respectively, the extraction decrease due to non-extraction of these hydrophilic compounds and decreased water concentration, as reported by Chandrasekhar et al. (2012) for anthocyanins extraction using ethanol. Moreover, Garcia-Castello et al. (2015) affirmed that the solvent reduces the dielectric constant of extractor (aqueous solution solvent), enhancing the solubility and diffusion of anthocyanins and phenolic compounds. For high solvent concentration, the cell wall dehydrated and collapsed while the protein of vegetable cell denatured, consequently making it difficult the diffusion of compounds from biomass to extracting solvent.

The criteria to choose the best operational condition of anthocyanin extraction was the highest value of ANT/TPC ratio, because it allows the highest amount of anthocyanin (target molecule) and the lowest amount of contaminant (total phenolic compounds), facilitating the purification process. In this way, the best condition was observed at 60% (v/v) of ACN that corresponding to ANT/TPC of 0.43 ([ANT] = 3.34 ± 0.04 mg.g⁻¹ and [TPC] = 7.83 ± 0.12 mg.g⁻¹).

The influence of solid/liquid ratio in extraction of anthocyanins from jabuticaba peels takes into account the range between 25 and 250 mg.mL⁻¹ (Figure 2b). The extractions followed

different paths, increasing the solid/liquid ratio allowed the increase of anthocyanins amount and decrease the extraction of phenolic compounds. This difference led the increase of ANT/TPC ratio reaching 0.43 at 100 and 250 mg.mL⁻¹ however for 250 mg.mL⁻¹ it was observed the smallest concentration of anthocyanin ([ANT] = 1.380 ± 0.001 mg.g⁻¹ and [TPC] = 3.29 ± 0.08 mg.g⁻¹) and for this reason the further experiments carried out at 100 mg.mL⁻¹ ([ANT] = 3.34 ± 0.04 mg.g⁻¹ and [TPC] = 7.83 ± 0.12 mg.g⁻¹). This ration was the same as those used in another study of the extraction of antioxidants from jabuticaba (Santos et al., 2010).

The effect of temperature in the anthocyanins extraction was carried out between 25 and 55 °C (Figure 2c). The solubility of anthocyanins increases with temperature, but above 35°C the aqueous ACN solution trends to saturate in the target biomolecule and starts the degradation of anthocyanis and above 60°C this biomolecule is unstable (Pessoa et al., 2012). The best condition was observed at 30°C ([ANT] = 3.34 ± 0.04 mg.g⁻¹ and [TPC] = 7.83 ± 0.12 mg.g⁻¹).

The influence of time in the anthocyanin extraction was carried out between 2 and 240 min (Figure 2d). After 120 min, the extraction of anthocyanins decreased, due to the possibility of solvent saturation occurring. The best extraction conditions of the phenolic compounds of the jabuticaba peel by SWB were: concentration of 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), solid/liquid ratio of 100 mg.mL⁻¹, temperature 30 °C, time 120 min and maximum power of the equipment (1520 W). Under these conditions, 7.83 mg.g⁻¹ was obtained in gallic acid for total phenol content and 3.34 mg.g⁻¹ in cyanidin-3-glucoside for total anthocyanins.

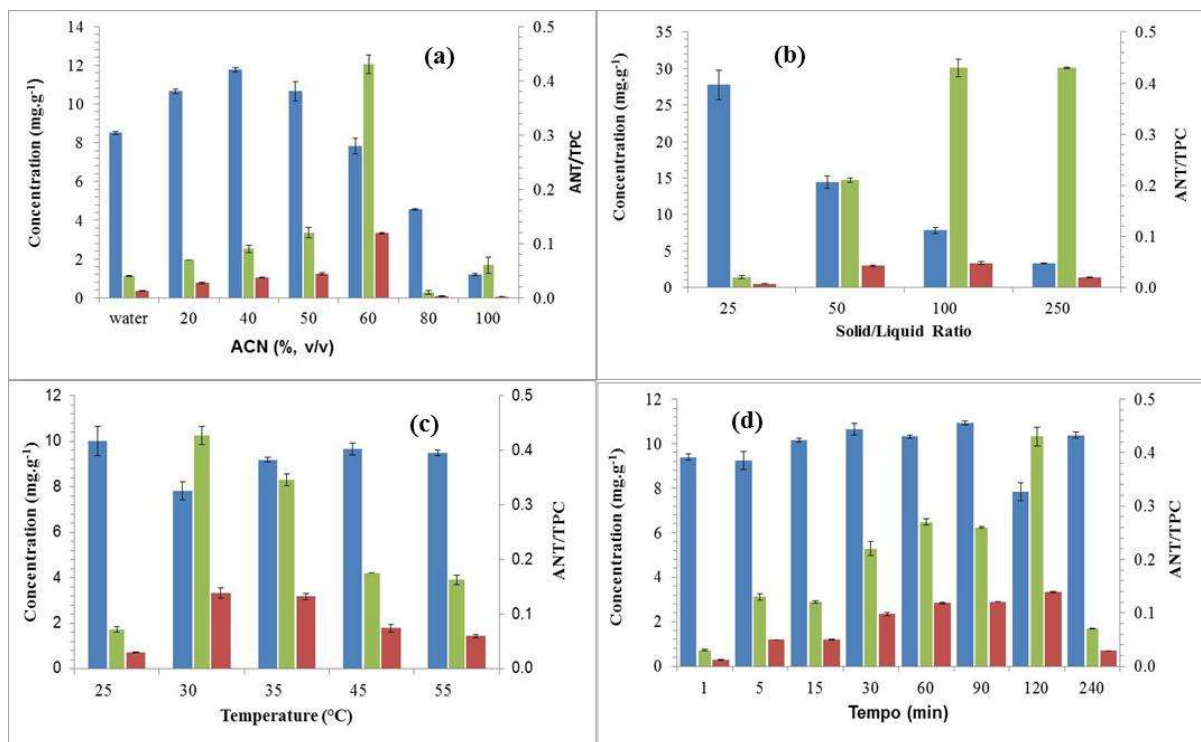


Figure 2. Extraction of phenolic compounds from the peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) using water bath agitation. (a) effect of the solvent concentration: S/L of 100 mg.mL⁻¹, temperature 30 °C and time 120 minutes; (b) effect of S/L: 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), temperature 30 °C and time 120 minutes; (c) effect of temperature: 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), S/L of 100 mg.mL⁻¹ and time 120 minutes; (d) effect of time: 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), S/L of 100 mg.mL⁻¹ and temperature 30 °C. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).

3.2. Ultrasound assisted extraction (UAE)

The optimization of extraction of anthocyanins and total phenolic compounds of jaboticaba peel by unconventional extraction (UAE) can be seen in Figure 3 (Table S2 of the Supporting Information).

The increase of the power of the equipment caused a greater extraction of both phenolic compounds and anthocyanins (Figure 3a). This result can be attributed as a consequence of the cavitation effect caused by ultrasound waves, contributing to the increase of the mass transfer from the matrix of the solid to the solvent, improving the extraction of the phenolic compounds, mainly the anthocyanins that are pigments found inside the vacuoles center of the plant cell

(Pourcel et al., 2010). Both the potency of 80% and 100% presented the same extraction efficiency (ANT/TPC) of 0.07, but the potency of 100% was considered as better because it extracted a larger amount of phenolic compounds, 9.17 mg.g⁻¹ for total phenol content and 0.65 mg.g⁻¹ for total anthocyanins.

The temperature influenced the extraction (Figure 3b), as the increase above 35°C decreased the concentration of anthocyanins in the extracts. It has already been reported that the temperature increase improves the extraction efficiency due to the higher solubility and diffusion rate of compounds in the solvent (Dai et al., 2009). However, high temperatures used in the extraction process may accelerate the degradation of anthocyanins, a phenomenon that has been studied extensively (Ahmed et al., 2004). The best result was at 35°C, because it presented the highest extraction efficiency (ANT/TPC), which was 0.24, or 10.05 mg.g⁻¹ for total phenol content and 2,47 mg.g⁻¹ for anthocyanins.

Figure 3c depicts the effect of time on the extraction of anthocyanins. The 90 and 120 minute times presented extraction efficiencies (ANT/TPC), practically equal to 0.31 and 0.30, but 90 minutes was considered to be the best because it extracted a higher amount of phenolic compounds, 8.46 mg.g⁻¹ for total phenol content and 2.60 mg.g⁻¹ for total anthocyanins, and the energy consumption is less.

The best extraction conditions were: concentration of acetonitrile at 60% (mL.mL⁻¹), solid/liquid ratio of 100 mg.mL⁻¹, temperature 35°C, time 90 min and maximum power of the equipment (300 W). Under these conditions, 8.46 mg.g⁻¹ was obtained for total phenol content and 2.60 mg.g⁻¹ for total anthocyanins.

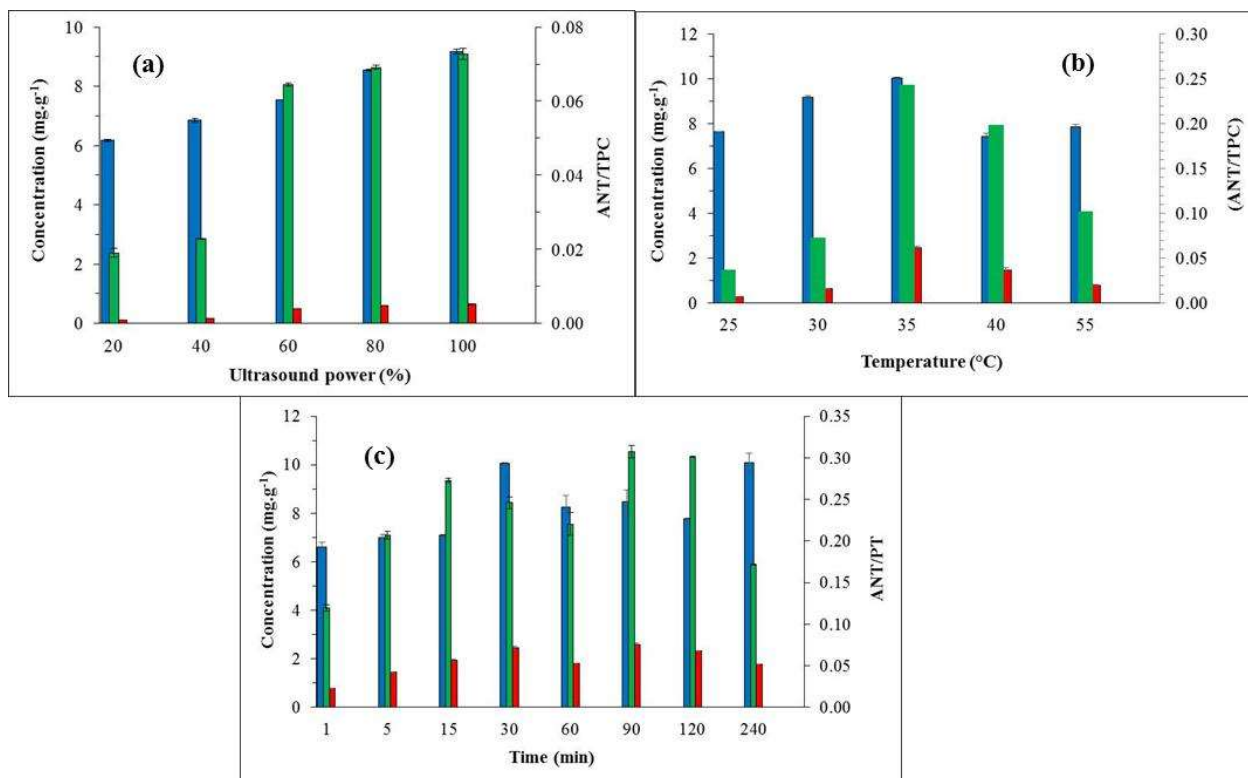


Figure 3. Extraction of phenolic compounds from the peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) using ultrasound. (a) effect of the power of the equipment: acetonitrile at 60% (mL.mL⁻¹), S/L of 100 mg.mL⁻¹, temperature 35 °C and time 120 minutes; (b) temperature effect: 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), S/L of 100 mg.mL⁻¹, equipment power at 100% (300 watts) and time 120 minutes; (c) effect of time: 60% acetonitrile (mL.mL⁻¹), S/L of 100 mg.mL⁻¹, equipment power at 100% (300 watts) and 35 °C temperature. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).

3.3. Microwave assisted extraction (MAE)

The other non-conventional extraction evaluated in this study was MAE and the results can be seen in Figure 4 (Table S3 of the Supporting Information).

The increase of the power of the equipment caused a greater extraction of the phenolic compounds until 60%, further it remained practically constant, whereas the power to 100% extracted larger amount of anthocyanins. The use of the power of the equipment at 40% and 100% presented the same ratio (ANT/TPC) that was 0.09, but at 100% extracted larger

quantities, 9.88 mg.g⁻¹ for phenols content total and 0.93 mg.g⁻¹ for total anthocyanins (Figure 4a).

The temperature influenced the extraction (Figure 4b), and the increase above 30 °C decreased the concentration of anthocyanins in the extracts, a fact explained earlier. The temperatures of 25 and 30°C presented near extraction efficiencies, but at 30 °C it was chosen as better because it presented a higher ratio (AT/FT) than 0.11, obtaining in these conditions 8.22 mg.g⁻¹ for total phenol content and 0.90 mg.g⁻¹ for total anthocyanins.

The effect of time on the extraction of the phenolic compounds can be seen in Figure 4c. The time of 5 min presented higher extraction efficiency (ANT/TPC) being considered better because it extracted larger amounts, 9.88 mg.g⁻¹ for total phenol content and 0.93 mg.g⁻¹ for total anthocyanins. The extraction time was short because as microwave heating does not depend on the thermal conductivity of the materials, it occurs more quickly forming localized regions of overheating, where the reactions will occur (Hayes, 2002).

The best extraction conditions were: concentration of acetonitrile at 60% (mL.mL⁻¹), solid/liquid ratio of 100 mg.mL⁻¹, temperature 30 °C, time 5 min and maximum power of the equipment (300 W). Under these conditions, 8.22 mg.g⁻¹ was obtained in gallic acid for total phenol content and 0.90 mg.g⁻¹ in cyanidin-3-glucoside for total anthocyanins.

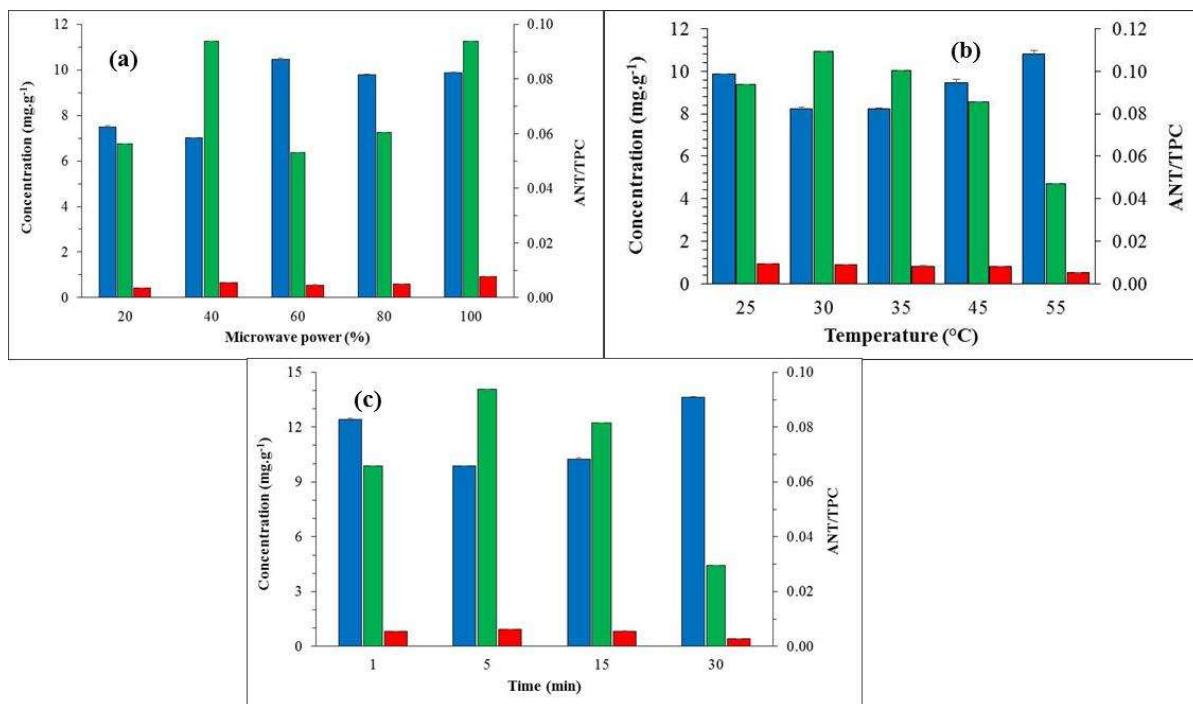


Figure 4. Extraction of phenolic compounds from the peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) using microwave. a) effect of the power of the equipment: acetonitrile at 60% (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and time 5 minutes; (b) effect of temperature: 60% acetonitrile (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and time 5 minutes; (c) time effect: acetonitrile at 60% (mL.mL^{-1}), S/L of 100 mg.mL^{-1} , equipment power at 100% (300 watts) and temperature $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC) (■).

3.4. Comparison between extraction methods (conventional x non-conventional)

The use of conventional methods for extracting biomolecules consist basically of subjecting the material to contact with a solvent for a given time and temperature with or without agitation (Azmir et al., 2013). Typically, these methods are easy to perform; however, they require larger amounts of solvent, time and have a low yield (Yang et al., 2008). Table 1 shows that SWB (1) was more efficient in extraction of anthocyanins extracting 22.15% and 73.05% more of cyanidin-3-glucoside compared to UAE (2) and MAE (3) respectively. Among the non-conventional methods UAE (2) was more efficient extracting 65.38% more of cyanidin-3-glucoside compared to MAE (3).

Although SWB (1) extracts 1.28 times more of anthocyanins than UAE (2), when evaluating the cost of energy, it is observed that SWB (1) has a high cost to extract, about 6.75 times more, therefore the UAE (2) was defined as the best method of extracting the phenolic compounds from the jabuticaba peel.

Table 1. Energy consumption (kwh) and extraction yield (%) in each method.

Method	Conditions			CYN (mg.g ⁻¹)	Extraction Yield (%)			Energy (Khw)
	T (°C)	Time (min)	Power (W)		(1) x (2)	(1) x (3)	(2) x (3)	
SWB	30	120	1520	3.34±0.04	22.15	-	-	3.04
UAE	35	90	300	2.60±0.06	-	-	65.38	0.45
MAE	30	5	300	0.90±0.00	-	73.05	-	0.02

*SWB (Stirring in water bath); UAE (Ultrasound assisted extraction); MAE (Microwave assisted extraction); CYN (cyaniding-3-glucoside)

3.5. Extraction capacity of acetonitrile against other solvents

The selection of a solvent to extract a bioactive compound must consider the molecular affinity between the solvent and solute to mass transfer, environmental security, toxicity, and financial viability (azmir et al., 2013). Figure 5 (Table S4 of the Supporting Information.) depicts a comparison of the extraction capacity of acetonitrile over other organic solvents. It is observed that, among the solvents tested, acetonitrile was the best presenting higher extraction efficiency (ANT/TPC) of 0.31 while methanol and ethanol were the worst solvents to extract the phenolic compounds from the peel of jabuticaba, both having the same extraction efficiency (ANT/TPC) of 0.03. It was considered the polarity of solvents used: 1-propanol – 4.0; methanol – 5.1; acetone – 5.1; ethanol – 5.2; acetonitrile – 5.8 (Byers, 2009). Methanol and ethanol are solvents with intermediate polarity and their potential extractive was reported in literature (Aguiar et al., 2014). Anthocyanins are highly hydrophilic compounds and due to the high polarity of acetonitrile, this result was already expected.

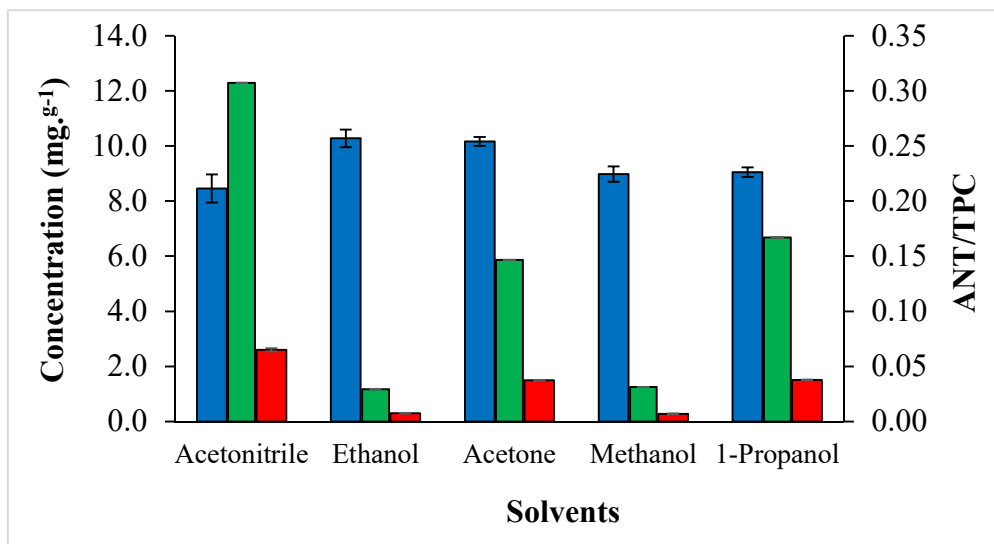


Figure 5. Acetonitrile extractive capacity against other organic solvents in extracting phenolic compounds from the jabuticaba peel using ultrasonic assisted extraction. Extraction conditions: solvent concentration at 60% (v/v), maximum power of the equipment (300 watts), S/L of 100 mg.mL⁻¹, temperature 35 °C and time 90 minutes. Total phenols (TPC) in gallic acid (■); total anthocyanins (ANT) in cyanidin 3-glucoside (■); extraction efficiency (ANT/TPC (■)).

Chromatographic analyzes of the anthocyanins of the jabuticaba peel revealed the presence of two major compounds: cyanidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-glycoside (Figure S1 of the Supporting Information), confirmed by comparing the retention times of the standards added to the extract (Figure S2 of the Supporting Information).

Quantifications were based on standard curves obtained from the HPLC analysis. The curves had the following equations for cyanidin-3-O-glucoside and delphinidin-3-O-glucoside: $y = 8137.7x - 4384.6$; $R^2 = 0.9982$; and $y = 11334x - 12972$; $R^2 = 0.9970$, respectively. The total content of anthocyanins determined by HPLC was 42.79 mg.g⁻¹ of *jabuticaba* peel. Cyanidin-3-O-glycoside (peak 3) was the dominant anthocyanin with 70.41% of total anthocyanins (30.13 ± 0.5 mg.g⁻¹) whereas delphinidin-3-O-glycoside (peak 2) had 12.66 ± 0.2 mg.g⁻¹ (29.59%).

3.6. Purification of anthocyanins

After measuring the best condition for the solid-liquid extraction of anthocyanins from jaboticaba peel, the purification process was carried out in OTPS based on ACN, PVP (10.000 g.mol⁻¹) and water. For the evaluation of the purification protocol, it was determined and optimized the selectivity (separation of the target biomolecule from contaminants). The phase diagram of OTPS was previously published for our research group (Oliveira et al., 2018), whereby was chosen the mixture points for the separation process.

The partition coefficient of the solutes depends on the main interactions and properties of the biomolecules and systems constituents, such as dispersive interactions, hydrogen bonds and electrostatic forces, besides the size of the biomolecules, solubility and affinity for a certain phase, that favor the migration of one side (Iqbal et al., 2016). In all cases, the target biomolecule (anthocyanins) migrated to top phase - water-rich phase ($K_{ANT} \gg 1$) while the total phenolic compounds migrated to bottom phase – PVP-rich phase ($K_{TPC} \ll 1$). The result is in agreement with the logarithm of octanol-water coefficient ($\log K_{ow}$) of anthocyanins such as cyanidin-3-O-glucoside chloride (-0.94), delphinidin-3-O-glucoside chloride (-0.69) and peonidin-3-O-glucoside chloride (-0.85), which is associated with greater affinity with water-rich phase (hydrophilic phase). On the other hand the total phenolic expressed as gallic acid presents a positive $\log K_{ow}$ (0.86), and consequently a migration to more hydrophobic phase, i.e. PVP-rich phase ($\log K_{ow} = -0.69$).

The influence of PVP concentration on the partition and consequently purification of anthocyanins was studied in the range from 6 to 10 wt% (Table 2). The increase of PVP concentration allowed the reduction of interstitial space in bottom phase (volume exclusion effect) and the water and the target biomolecule is excluded to top phase, and the contaminant compound (total phenolic) migrated to bottom phase as reported by Babu et al. (2008). The extraction efficiency accompanies the target biomolecule partition and is inversely proportional

to the increase in the PVP concentration. Therefore, the OTPS based on PVP (6 wt%) + ACN (64 wt%) + water (30 wt%) showed the highest selectivity (S) - 2.72, indicating that anthocyanins may be more separated from phenolic compounds.

Table 2. Effect of PVP concentration on the separation and purification of anthocyanins using OTPS formed of ACN (64 wt%) and water at 25 °C and 0.1 MPa.^a

PVP (wt%)	$K_{ANT} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$	$K_{TPC} \pm \sigma$	S
6	1.93 ± 0.01	83.54 ± 0.01	0.71 ± 0.02	2.72
8	1.30 ± 0.01	77.89 ± 0.28	0.53 ± 0.03	2.45
10	1.16 ± 0.01	62.79 ± 0.94	0.49 ± 0.01	2.37

^a Standard uncertainties u are u(S) = 0.01, u(T) = 1° C and u(p) = 10 kPa.

Table 3 shows the influence of the concentration of water on the partition of the anthocyanins in OTPS formed of PVP (6 wt%) + water + ACN at 25 °C and 0.1 mPa. The increase of water content caused a decrease in the values of the partition coefficients, because the hydrophobicity of both phase probably decrease. The extraction efficiency accompanies the partitioning of the biomolecules and is inversely proportional to the increase of the water content, that is, the anthocyanins are better recovered in the top phase with the decrease of the water content. The differentiated partitioning of the biomolecules allowed the determination of the selectivity of the system. The best OTPS composition for purification (highest selectivity) remained PVP (6 wt%) + ACN (64 wt%) + water (30 wt%).

Table 3. Effect of water content on the separation and purification of anthocyanins using OTPS formed of PVP (6 wt%) and ACN at 25 °C and 0.1 MPa.^a

Water (wt%)	$K_{ANT} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$	$K_{TPC} \pm \sigma$	(S)
30	1.93±0.01	83.54 ± 0.01	0.71 ± 0.02	2.72
29	1.15±0.02	62.53 ± 0.37	0.58 ± 0.01	1.98
28	1.19±0.07	67.16 ± 1.21	0.59 ± 0.01	2.02
27	1.18±0.06	62.70 ± 0.99	0.54 ± 0.01	2.19

^a Standard uncertainties u are u(S) = 0.01, u(T) = 1° C and u(p) = 10 kPa.

The effect of temperature on the purification of total anthocyanins was analyzed in the 6 wt% of PVP, 64 wt% of ACN and 30 wt% of water at 0.1 mPa and different temperatures (5 to 45 °C) and showed in Table 4. The solubility of anthocyanin in water-rich phase and total phenolic compounds in PVP-rich phase increase with the increase of temperature (Cacace and Mazza, 2003). Above 25 °C, the phase probably became sutured in the biocompound and they went to the opposite phase. The purification of anthocyanins expressed as selectivity reached 3.12 at 45 °C.

Table 4. Selectivity of the separation of anthocyanins using organic two-phase system with 6% PVP, 64% acetonitrile at different temperatures and 0.1 MPa ^a

Selectivity (S)				
T (°C)	$K_{ANT} \pm \sigma$	$R_T \pm \sigma$	$K_{TPC} \pm \sigma$	(S)
5	1.16±0.01	62.32 ± 0.08	0.70±0.01	1.66
15	1.47±0.01	62.66 ± 0.14	0.71±0.01	2.07
25	1.93±0.01	83.54 ± 0.01	0.71±0.02	2.72
35	1.52±0.01	75.25 ± 0.11	0.53±0.01	2.87
45	1.56±0.04	75.67 ± 0.49	0.50±0.01	3.12

^a Standard uncertainties u are $u(S) = 0.01$, $u(T) = 1^\circ\text{C}$ and $u(p) = 10\text{ kPa}$.

Based on this experimental data, it was possible to measure the standard molar thermodynamic functions of transfer such as Gibbs free energy of transfer ($\Delta_{tr}G_m^\circ$), the standard molar enthalpy of transfer ($\Delta_{tr}H_m^\circ$) and standard molar entropy of transfer ($\Delta_{tr}S_m^\circ$) using the total anthocyanins partition coefficient at different temperatures. From this data correlation it can be concluded that the partitioning of total anthocyanins is a spontaneous process ($\Delta_{tr}G_m^\circ = -1.18\text{ KJ.mol}^{-1}$), reflecting a preferential partitioning to the top phase ($K > 1.0$). The enthalpy and entropy of the system were evaluated from two temperature ranges of 5-25 °C and 25-45 °C. In the first range the process is endothermic ($\Delta_{tr}H_m^\circ = 17.53\text{ KJ.mol}^{-1}$), governed by the enthalpy forces ($\Delta_{tr}S_m^\circ = 0.06\text{ KJ.mol}^{-1}$). In the second range the process is exothermic ($\Delta_{tr}H_m^\circ$

= -8.50 KJ.mol⁻¹), also governed by the enthalpy forces ($\Delta_{tr}S_m^0 = -0.02$ KJ.mol⁻¹) (Silva and Loh, 2006).

4. Conclusions

In this paper the extraction and consecutive purification of anthocyanins from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel were investigated using aqueous solutions of acetonitrile (ACN) as extraction solvent and purification with organic two-phase system composed of polyvinylpyrrolidone (PVP) of molecular weight 10.000 g.mol⁻¹, ACN and water. Ultrasonic assisted extraction (UAE) showed the best results obtaining 2.60 mg.g⁻¹ of anthocyanins in the following operating conditions: (ACN at 60% v/v; S/L = 100 mg.mL⁻¹; power = 300 W; T = 35 °C; Time = 90 min). The two main anthocyanins from jabuticaba to cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside were identified by HPLC, the former representing a percentage of 70.41% of the extract. Extraction of anthocyanins was followed by their subsequent purification using OTPS to separate the contaminant compound (total phenolic compounds). Anthocyanins were partitioned to the top phase (water-rich phase) while the phenolic compounds migrated to the bottom phase (PVP-rich phase), in this way it was possible to obtain the separation of the target biomolecule (anthocyanins) from its contaminants (phenolic compounds) analyzed through selectivity. The highest selectivity was 3.12 under the following operating conditions: ACN (64 wt%), PVP (6 wt%) and water (30 wt%) at 45 ° C.

Acknowledgements

The authors are thankful to *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe* – FAPITEC/SE for the financial support.

References

- Aguiar, A. C., Santos, P., Coutinho, J. P., Barbero, G. F., Godoy, H. T, Martínez, J. (2014). Supercritical fluid extraction and low pressure extraction of Biquinho pepper (*Capsicum chinense*). *LWT-Food Sci. Technol.*, 99, 1239-1246.
- Ahmed, J., Shivhare, U.S., Raghavan, G.S.V. (2004). Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree, *Eur. Food Res. Technol.*, 218, 525–528.
- Akter, M. S., Oh, S., Eun, J. B., Ahmed, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review, *Food Res. Int.*, 44, 1728-1732.
- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery waste using subcritical water, *J. Supercrit. Fluids.*, 65, 18–24.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *J. Food Eng.*, 117, 426-436.
- Babu, R., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system B, *Chem. Eng. Proces.*, 47, 83–89
- Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O’Keefe, S. (2010) Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food Chem.*, 120, 1185-1192.
- Barbosa, J. M. P., Souza, R. L., Fricks, A. T., Zanin, G. M., Soares, C. M. F., Lima, A. S. (2011). Purification of lipase produced by a new source of in submerged fermentation using an aqueous two-phase system, *J. Chromatogr. B.*, 879, 3853-3858.
- Byers, J. A. (2009). Catálogo Phenomenex, Available at: <http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>.

Cacace, J. E., Mazza, G. (2003). optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol, *J. Food Sci.*, 68, 240-248.

Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P., Li, P. (2016). Conventional, ultrasoundassisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes, *Food Chem.*, 197, 266–272.

Cardoso, G. B., Souza, I. N., Pereira, F. M., Freire, M. G., Soares, C. M. F., Lima, A. S. (2014). Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: phase diagrams and extractive performance, *Sep. Purif. Technol.*, 124, 54–60.

Cardoso, G. B., Souza, I. N., Pereira, M. M., Costa, L. P., Freire, M. G., Soares, C. M. F., Lima, A. S. (2015). 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, 317–323.

Cardoso, G. B., Souza, I. N., Pereira, M. M., Freire, M. G., C. M. F. Soares, Lima, A. S. (2014) Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile, *Sep. Purif. Technol.*, 136, 74- 80.

Cardoso, G.B., Mourão, T., Souza, F. Menezes. Pereira, G. Mara. Freire, Fricks, Alini. Tinoco. 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.

Cavalcanti, R.N., Veggi, P.C., Meireles, M.A.A. (2011). Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability, *Procedia Food Sci.*, 1, 1672 – 1678.

Chen, Y., Zhang, W., Zhao, T., Li, F., Zhang, M., Li, J., Zou, Y., Wang, W., Cobbina, S.J., Wu, X., Yang, L. (2016). Adsorption properties of macroporous adsorbent resins for separation of anthocyanins from mulberry, *Food Chem.*, 194, 712–722.

- Cláudio, A. F. M., Ferreira, A. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P. (2012). Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.*, 97, 142–149.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health, *Nat. Prod. Rep.*, 26, 1001-1043.
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., Mumper, R.J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms, *Food Chem. Toxicol.*, 47, 837–847.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., Bottii, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8987–9003.
- Freire, M. G., Claudio, A. F. M., Araujo, J. M. M., Coutinho, J. A.P., Marrucho, I.M., Lopes, J. N. C., Rebelo, L. P. N. (2012) Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 4966-4995.
- Freire, M. G., Louros, C. L. S., Rebelo, L. P. N., Coutinho, J. A. P. (2011). Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications, *Green Chem.*, 13, 1536–1545.
- Fuleki, T., Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice, *J. Food Sci.*, 33, 78-83.
- Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes *LWT – Food Sci. Technol.*, 64, 1114-1122.
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosseló, C., Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted

extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrason Sonochem.*, 21, 2176–2184.

Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., Bordignon-Luiz, M. T. (2007). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems, *Food Chem.*, 100, 1289-1296.

Grobmann, C., Tintinger, R., Zhu, J., Maurer, G. (1995). Aqueous two-phase systems of poly (ethylene glycol) and dextran - experimental results and modeling of thermodynamic properties, *Fluid Phase Equilibr.*, 106, 111-138.

Hayes, B. L. (2002), *Microwave synthesis: chemistry at the speed of light*. CEM Publishing, Matthews, New York.

Hosseinian, F. S., Li, W. D., Beta, T. (2008). Measurement of anthocyanins and other phyto Chemicals in purple wheat, *Food Chemistry.*, 109, 916-924.

Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. A. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., Yuan, Z. (2016). Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18, 2- 18.

J. Chandrasekhar, M. C., Madhusudhan, Raghavarao, K. S. M. S. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption, *Food Bioprod. Process.*, 9, 615–623.

Jampani, C., Naik, A., Raghavarao, K. S. M. S. (2014). Purification of anthocyanins from jamun (*Syzygium cumini* L.) employing adsorption, *Sep. Purif. Technol.*, 125, 170–178.

Kibbe, A. H. (2000). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3th Ed. American Pharmaceutical Association, Washington.

Lafka, T. I., Sinanoglou, V., Lazos. E.S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes, *Food Chem.*, 104, 1206–1214.

- Leite-Legatti, A. V., Batista, Â. G., Dragano, N. R. V., Marques, A. C., Malta, L. G., Riccio, M. F. (2012). Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Res. Int.*, 49, 596–603.
- Lima, A. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions, *Fluid Phase Equilibr.*, 451, 68-78.
- Mano, E. B. (1988). *Introdução à Polímeros*. 3th Ed. Edgard Blucher, São Paulo.
- Meda, A. C., Lamien, E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry.*, 91, 571–577.
- Oliveira, B. S, D'Anzicourt, C. M. S, Soares, C. M. F, Souza. R. L., Lima, A. S. (2018). Organic two-phase system based on acetonitrile + water + polyvinilpirrolidone: A novel concept of liquid-liquid equilibrium: phase diagrams and phenolic compounds partitioning, *Sep. Purif. Technol. In press*.
- Oliveira, V. B., Yamada, L T., Fagg, C. W., Brancla-O, M. G. L. (2012). Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds, *Food Res. Int.*, 48 170-179.
- Passos, H., Trindade, M. P., Vaz, T. S. M., Costa, L. P., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P. (2013). The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.*, 108, 174–180.
- Pedro, A.C., Granato, D., Rosso, N.D. (2016). Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability, *Food Chem.*, 191, 12–20.
- Pedroza, M.A., Amendola, D., Maggi, L., Zalacain, A., Feveri, D. M., Spigno, G. (2015). Microwaveassisted extraction of phenolic compounds from dried waste grape skins, *Int. J. Food Eng.*, 11, 359–370.

- Pereira, J.F.B., Lima, A.S., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P. (2010) Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems, *Green Chem.*, 12, 1661–1669.
- Pessoa, J. D. C., Teixeira, G. H. A. (2012). *Tecnologias para inovação nas cadeias euterpe*, Embrapa, Brasília.
- Porto, C., Natolino, A., Decorti, D. (2014). Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercriticalfluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol–water mixture as co-solvent, *J. Supercrit. Fluids.*, 87, 59–64.
- Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013) Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds, *Ultrason. Sonochem.*, 20, 1076-1080.
- Pourcel, L., Irani, N. G., Lu, Y., Riedl, K., Schwartz, S., Grotewold, E. (2010). The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in arabidopsis thaliana and implications for the sequestration of anthocyanin pigments, *Mol. Plant.*, 3, 78–90.
- Reis, I. A., Santos, S. B., Pereira, F. D. S., Sobral, C. R. S., Freire, M. G., Freitas, L. S., Soares, C. M. F., Lima, A. S. (2014). Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems, *Sep. Sci. Technol.*, 49, 656-663.
- Santos, D. T., Veggi, P. C., Meireles, M. A. A. (2010). Extraction of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation, *J. Food Eng.*, 101, 23-31.
- Silva, L. H. M., Loh, W. (2006). Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de Proteínas, *Quím. Nova*, 29, 1345-1351.
- Speight, J.G. (1992). *Ullmans Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH.
- Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *J. Food Eng.*, 81, 200–208.

Türker, N., Erdogdu, F. (2006). Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.), *J. Food Eng.*, 76, 579-583.

Wu, S. B., Dastmalchi, K., Long, C. L., Kennelly, E. J. (2012). Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices, *J. Agri. Food Chem.*, 60, 7513-7525.

Yang, B., Zhao, M. M., Shi, J., Yang, N., Jiang, Y. M. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp, *Food Chem.*, 106, 685–690.

APPENDIX A. Supporting Information

Supporting data associated with this article can be found, in the online version.

Sequential extraction of anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) using non-conventional protocols followed by purification based on organic two-phase system

Bruno Sales Oliveira¹, Ranyere Lucena de Souza^{1,2}, Cleide Mara Faria Soares^{1,2}, Álvaro Silva Lima*^{1,2}

¹Post-Graduated Program on Process Engineering, Tiradentes University, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

²Institute of Technology and Research Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

To whom correspondence should be addressed: e-mail: alvaro_lima@itp.org.br. Phone: +55 7932182115. Fax: +55 7932182190.

Table S1. Effect of operational condition in the stirring in water bath extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel.

Conditions				Concentration		Ratio
ACN % (mL.mL ⁻¹) 1)	S/L (mg.mL ⁻¹)	T (°C)	Time (min)	ANT ± σ (mg.g ⁻¹)	PT ± σ (mg.g ⁻¹)	ANT/PT
0	100	30	120	0.36 ± 0.01	8.51± 0.09	0.04
20	100	30	120	0.76 ± 0.05	10.66± 0.13	0.07
40	100	30	120	1.05 ± 0.02	11.78± 0.12	0.09
50	100	30	120	1.24 ± 0.05	10.66± 0.48	0.12
60	100	30	120	3.34 ± 0.04	7.83± 0.40	0.43
80	100	30	120	0.09 ± 0.01	4.56± 0.04	0.01
100	100	30	120	0.05 ± 0.05	1.19± 0.07	0.06
60	25	30	120	0.51 ± 0.04	27.76 ± 2.03	0.02
60	50	30	120	2.95 ± 0.11	14.45 ± 0.85	0.21
60	250	30	120	1.38 ± 0.00	3.29 ± 0.08	0.43
60	100	25	120	0.72 ± 0.01	10.02 ± 0.65	0.07
60	100	35	120	3.18 ± 0.14	9.19 ± 0.11	0.35
60	100	45	120	1.78 ± 0.18	9.66 ± 0.25	0.18
60	100	55	120	1.44 ± 0.07	9.48 ± 0.12	0.16
60	100	30	1	0.28 ± 0.02	9.40 ± 0.15	0.03
60	100	30	5	1.19 ± 0.00	9.24 ± 0.40	0.13
60	100	30	15	1.21 ± 0.02	10.15 ± 0.08	0.12
60	100	30	30	2.34 ± 0.08	10.65 ± 0.25	0.22
60	100	30	60	2.83 ± 0.04	10.32 ± 0.08	0.27
60	100	30	90	2.89 ± 0.00	10.94 ± 0.10	0.26
60	100	30	240	0.69 ± 0.00	10.38 ± 0.13	0.07

Extractions were typically performed with pre-dried *jabuticaba* peel as indicated in the materials.

Table S2. Effect of operational condition in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by ultrasound.

Conditions			Concentration		Ratio
Power (%)	T (°C)	Time (min)	ANT $\pm \sigma$ (mg.g ⁻¹)	PT $\pm \sigma$ (mg.g ⁻¹)	ANT/PT
20	30	30	0.12 \pm 0.00	6.17 \pm 0.05	0.02
40	30	30	0.16 \pm 0.00	6.85 \pm 0.06	0.02
60	30	30	0.49 \pm 0.00	7.53 \pm 0.00	0.06
80	30	30	0.59 \pm 0.00	8.55 \pm 0.02	0.07
100	30	30	0.65 \pm 0.01	9.17 \pm 0.08	0.07
100	25	30	0.30 \pm 0.00	7.65 \pm 0.00	0.04
100	35	30	2.47 \pm 0.06	10.05 \pm 0.03	0.24
100	45	30	1.48 \pm 0.10	7.43 \pm 0.14	0.20
100	55	30	0.80 \pm 0.00	7.86 \pm 0.11	0.10
100	35	1	0.79 \pm 0.00	6.61 \pm 0.19	0.12
100	35	5	1.45 \pm 0.01	7.01 \pm 0.12	0.21
100	35	15	1.93 \pm 0.03	7.09 \pm 0.04	0.27
100	35	60	1.82 \pm 0.01	8.26 \pm 0.49	0.22
100	35	90	2.60 \pm 0.06	8.46 \pm 0.51	0.31
100	35	120	2.34 \pm 0.01	7.78 \pm 0.03	0.30
100	35	240	1.78 \pm 0.00	10.10 \pm 0.37	0.17

Extractions were typically performed with pre-dried *jabuticaba* peel as indicated in the materials.

Table S3. Effect of operational condition in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by microwave.

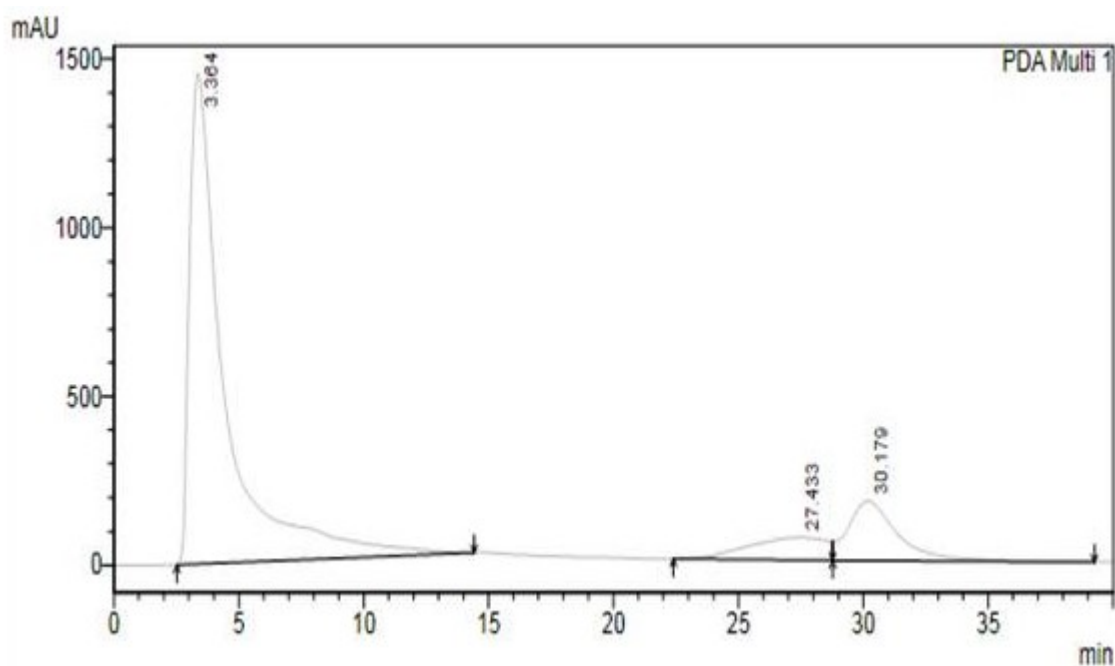
Conditions			Concentration		Ratio
Power (%)	T (°C)	Time (min)	ANT ± σ (mg.g ⁻¹)	PT ± σ (mg.g ⁻¹)	ANT/PT
20	25	5	0.42 ± 0.00	7.48 ± 0.06	0.06
40	25	5	0.66 ± 0.01	7.02 ± 0.01	0.09
60	25	5	0.56 ± 0.01	10.45 ± 0.07	0.05
80	25	5	0.59 ± 0.01	9.79 ± 0.03	0.06
100	25	5	0.93 ± 0.00	9.88 ± 0.01	0.09
100	30	5	0.90 ± 0.00	8.22 ± 0.10	0.11
100	35	5	0.82 ± 0.01	8.22 ± 0.06	0.10
100	45	5	0.81 ± 0.01	9.47 ± 0.15	0.09
100	55	5	0.51 ± 0.00	10.81 ± 0.18	0.05
100	25	1	0.82 ± 0.01	12.43 ± 0.28	0.07
100	25	15	0.84 ± 0.03	10.25 ± 0.26	0.08
100	25	30	0.40 ± 0.01	13.64 ± 0.20	0.03

Extractions were typically performed with pre-dried *jabuticaba* peel as indicated in the materials.

Table S4. Effect of different solvents in the extraction of anthocyanins and total phenolic compounds from jabuticaba peel assisted by ultrasound.

Solvents	Concentration		Ratio
	ANT $\pm \sigma$ (mg.g ⁻¹)	PT $\pm \sigma$ (mg.g ⁻¹)	ANT/PT
Acetonitrile	2.60 \pm 0.06	8.46 \pm 0.51	0.31
Acetone	1.49 \pm 0.01	10.17 \pm 0.16	0.15
1-propanol	1.51 \pm 0.01	9.05 \pm 0.17	0.17
Ethanol	0.30 \pm 0.01	10.28 \pm 0.32	0.03
Methanol	0.28 \pm 0.01	8.98 \pm 0.28	0.03

Extractions were typically performed with pre-dried *jabuticaba* peel as indicated in the materials.



Compound	Retention time (min)	(mg.g ⁻¹)
Cyanidin-3-O-glucoside	30.17	30.13
Delphinidin-3-O-glucoside	27.43	12.66

Figure S1. Identification and quantification of anthocyanins from extracts obtained by the ultrasound-assisted extraction method (UAE). Chromatographic conditions: isocratic method; mobile phase: water/acetic acid/acetonitrile (90:5:5) v/v; column C18; column temperature at 35 °C; injection volume 20 microlitres/min; running time 40 min.

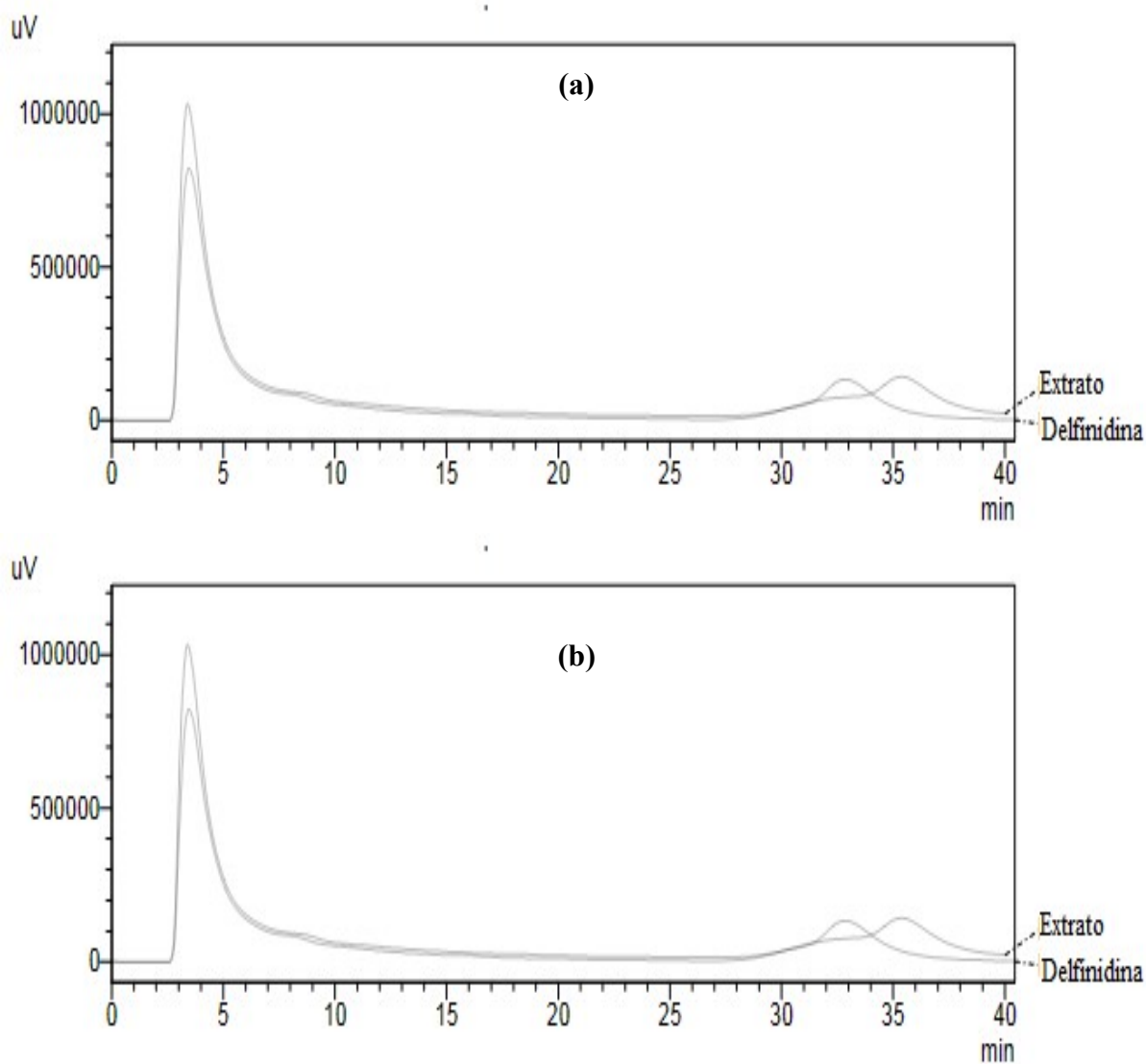


Figure S2. Confirmation of the extract anthocyanins obtained by the ultrasound-assisted extraction method (UAE). (a) Cyanidin-3-O-glucoside chloride standard added to the extract; (b) Delphinidin-3-O-glucoside chloride standard added to the extract. Chromatographic conditions: isocratic method; mobile phase: water/acetic acid/acetonitrile (90:5:5) v/v; column C18; column temperature at 35 °C; injection volume 20 microlitres/min; running time 40 min.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A jabuticaba se destaca por seu potencial terapêutico, industrial e sensorial devido, principalmente, à presença das antocianinas e, é por isso, que é necessário que técnicas de extração e purificação sejam aperfeiçoadas. Neste trabalho foram estudados métodos de extração convencional por agitação em banho maria, utilizando solvente à frio e à quente, otimizados os métodos não convencionais assistidos por ultrassom e micro-ondas e foi desenvolvido um novo conceito de equilíbrio líquido-líquido o SOB para purificação dos antioxidantes.

Ao comparar os métodos de extração os resultados mostraram que os não convencionais apresentam um menor custo para a obtenção das antocianinas. Com a realização deste estudo, foi possível desenvolver um método de extração rápido e eficiente assistido por ultrassom, que extraiu 2,60 mg de ANT/g de casca seca do fruto da jabuticaba utilizando acetonitrila a 60% (mL/mL), relação sólido/líquido de 100 mg/mL, temperatura 35 °C, tempo 90 min e potência máxima do equipamento (300 W).

Os sistemas modelos foram aplicados na partição de três biomoléculas diferentes. O cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo particionou para a fase de topo (fase rica em água) enquanto ácido gálico e quercetina para a fase inferior (fase rica em PVP). A maior seletividade ($S_{CYA/AGA} = 65,41$ e $S_{CYA/QUE} = 42,77$) na separação de cloreto de cianidina-3-O-glicosídeo ocorreu em OTPS formada por ACN (62,05% em peso) + PVP-10.000 g/mol (12,05% em peso) + H₂O (25,90% em peso), correspondente ao sistema A com TLL = 18,52).

Quando o sistema modelo foi aplicado para purificar as antocianinas a partir de sua fonte natural, os resultados mostraram que a maior seletividade alcançada ($S = 3.12$, $K_{ANT} = 1,56$, $R_T = 75.67\%$) foi atingida na fase de topo rica em solvente, usando ACN (64% em peso) e PVP (6% em peso) a 45 °C

Diante do exposto, é possível concluir que a associação entre método de extração com o SOB foi fundamental para o sucesso na purificação das antocianinas e, desta forma, o sistema desenvolvido apresenta-se como excelente alternativa para a purificação dos antioxidantes da jabuticaba.

TRABALHOS APRESENTADOS

Até o presente momento, os resultados obtidos com o desenvolvimento desta tese foram publicados e aceitos em eventos nacionais, conforme descritos abaixo:

1. OLIVEIRA, B.S.; D'ANZICOURT, C. M. DE S.; FREIRE, MARA G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Desenvolvimento de novos sistemas aquosos bifásicos baseados em acetonitrila e polivinilpirrolidona. XX Simpósio Nacional de Bioprocessos, XI Simpósio de Hidrolise Enzimática de Biomassas, Fortaleza - CE, 2015.

2. OLIVEIRA, B.S.; MIRANDA, R. C. M. DE.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Extração de compostos fenólicos e de antocianinas da casca de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando acetonitrila como solvente extrator. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Fortaleza, 2016.

3. OLIVEIRA, B.S.; BRITO, L. L. R.; SOARES, C. M. F.; SOUZA, R. L, DE.; LIMA, A. S. Extração de compostos fenólicos e de antocianinas da casca de Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando acetonitrila em processo assistido por ultrassom. 18º Sempesq, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2016.

4. OLIVEIRA, B.S.; BRITO, L. L. R.; SOARES, C. M. F.; SOUZA, R. L, DE.; LIMA, A. S. Extração de compostos fenólicos da casca da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*): um estudo de comparação entre métodos de extração assistidos por ultra-som e micro-ondas. XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos, XII Simpósio de Hidrolise Enzimática de Biomassas, Aracaju - SE, 2017.

5. OLIVEIRA, B.S.; C. M. F.; SOUZA, LIMA, A. S. Particionamento de antocianinas da casca do fruto da Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) utilizando sistema orgânico bifásico composto por acetonitrila e polivinilpirrolidona. Simpósio Ibero-Americano sobre Sistemas Aquosos Bifásicos - SISAB, Aracaju - SE, 2018.

6. Capítulo de livro publicado

LIMA, A. S.; SANTANA, C. C.; **OLIVEIRA, B.S.** Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas. In: Lima, A.S.; Santana, C.C. (Org.). Processos de Extração e Purificação de Biomoléculas. 1ed. Aracaju: Editora Universitária Tiradentes, 2017, v. 1, p. 17-28.

TRABALHOS FUTUROS

- Construir digramas de fases para os sistemas formados por acetonitrila com polivinilpirrolidona de diferentes massas moleculares (10.000, 29.000 e 40.000 g/mol) usando sais como adjuvantes;
- Construir digramas de fases formados por acetonitrila com sais utilizando polivinilpirrolidona de diferentes massas moleculares (10.000, 29.000 e 40.000 g/mol) como adjuvantes;
- Estudar os compostos fenólicos presentes na jabuticaba, que foram considerados contaminantes para o SOB.
- Realizar estudos de toxicidade dos extratos purificados de antocianinas obtido por intermédio do SOB para aplicação nas áreas cosmética e farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A. Partition of proteins in liquid polymer-polymer two-phase systems, *Nature*, 182, p. 709-711, 1958.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules, *Wiley Interscience*, New York, USA, 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations, in: Asenjo, J.A. (Ed.), *Separation Processes in Biotechnology* (pp. 287-327). New York: Marcell Dekker, 1990.
- ALEZANDRO, M. R.; DUBÉ, P.; DESJARDINS, Y.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. *Food Research International*, 54(1), p. 468–477, 2013.
- ALUPULUI, A.; CALINESCU, I.; LAVRIC, V. Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants, *Chemical Engineering Transactions*, 17, p. 1023–1028, 2009.
- ALUPULUI, A.; CALINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants, *U. P. B. Science Bulletin, Series B*, 74, p. 129-142, 2012.
- ASSIS, S. A.; VELLOSA, J. C. R.; BRUNETTI, I. L.; KHALIL, N. M.; LEITE, K. M. D. C.; MARTINS, A. B. G. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International Journal of Food science and Nutrition*, 60, p. 439-448, 2009.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review, *Journal of Food Engineering*, 117, p. 426-436, 2013.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47, p. 83-89, 2008.
- BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*. 120 (4), p. 1185-1192, 2010.

- BARBOSA, J.M.P., SOUZA, R.L., FRICKS, A.T., ZANIN, G.M., SOARES, C.M.F., LIMA, A.S. Purification of lipase produced by a new source of in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*. 879, p. 3853-3858, 2011.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e reações biológicas. *Alimentos e nutrição*. v.15, p. 285-292, 2004.
- BOARI LIMA, A. J.; DUARTE CORRÊA, A.; CARVALHO ALVES, A. P.; PATTO ABREU, C. M.; DANTAS, B.A.M. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(4), p. 416–42, 2008.
- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed) *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press, p. 39, 1982.
- BRUNINI, M. A.; OLIVEIRA, A. L.; SALADINI, C. A. R. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria cauliflora* (Vell) Berg) cv ‘sabará’. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 378-383, 2004.
- CARDOSO, G.B.; SOUZA, T. MOURÃO.; PEREIRA, F. MENEZES.; FREIRE. G. MARA.; FRICKS, ALINI TINOCO.; 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* 104, p. 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*, 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*, 136, p. 74-80, 2014b.
- CARDOSO, G.B.; SOUZA, I. P.; MATHEUS, M. COSTA.; PEREIRA, L.; FREIRE G. M.; 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* 94, p. 317–323, 2015.

- CAVALCANTI, R.N.; VEGGI, P.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. *Procedia Food Science*. 1, p. 1672 – 1678, 2011.
- CEAGESP - COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO, 2016. Disponível em:<<http://www.ceagesp.gov.br/produtos/jaboticaba/>>. Acessado em 11/02/2018.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system, *Process Biochemistry*, 45, p. 1148-55, 2010.
- CHAN, C-H.; YUSOFF, R.; NGOH, G.-C.; KUNG, F. W.-L. Microwave-assisted extractions of active ingredient from plants, *Journal of Chromatography A*, 1218, p. 6213-6225, 2011.
- CHANDRASEKHAR, J.; MADHUSUDHAN, M.C.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioproducts Processing*, 90, p. 615–623, 2012.
- CHANG, C.C., YANG, M. H., WEN, H. M., CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, p. 178–182, 2002.
- CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 18, p. 813-835, 2011.
- CITADIN, I.; VICARI, I. J.; SILVA, T DA; DANNER, A.. Qualidade de frutos de jaboticabeira (*Myrciaria cauliflora*) sob influência de duas condições de cultivo: sombreamento natural e pleno sol. *Revista Brasileira de Agrociência*, 11, p. 373, 2005.
- CITADIN, I.; DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z. Jaboticabeiras. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, p. 343-656, 2010.
- COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido, *Viçosa: UFV*, 2003.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S.; Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Journal of Nutritional Biochemistry*. 7(2), p. 66, 1996.

- COOPER, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, p. 557-563, 1999.
- CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, p. 898-902, 2008.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, p. 1001-1043, 2009.
- DAÍ, J. GUPTE. A.; GATES L.; MUMPER, RJ. A Comprehensive Study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 47, p. 837-847, 2009.
- DAMIANI, C.; SILVA, F. A.; RODOVALHO, E. C.; BECKER, F. S.; ASQUIERI, E. R.; OLIVEIRA, R. A.; LAGE, M. E. Aproveitamento de resíduos vegetais para produção de farofa temperada. *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 657-662, 2011.
- 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.
- DONADIO, L. C. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). Jaboticabal, Brasil: FUNEP. effects, and dietary sources”, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2), p. 66, 2000.
- DOUGHARI, J. M. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. In: Rao, V. (Org). *Phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health*. Winchester: InTech Published online, p. 1-33, 2012.
- EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X. D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, 84, p. 23-28, 2004.
- EMBRAPA. *Tecnologias para inovação nas cadeias euterpe*. Pessoa, José Dalton Cruz; Teixeira, Gustavo Henrique de Almeida - editores. Brasília, DF, 2012.
- ESCLAPEZ, M. D.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MULET, A.; CÁRCEL, J. A. Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Engineering Reviews*, 3, p. 108-120, 2011.
- FANALE, C. I. Comercialização de jaboticaba no ETSP- Entrepósito Terminal de São Paulo (CEAGESP), 2008. Disponível em:<www.ceagesp.gov.br>. Acessado em 21/11/2010.

- FERREIRA, A. E.; FERREIRA, B. S.; LAGES, M. M. B.; RODRIGUES, V. A. F.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D. Produção, caracterização e utilização da farinha de casca de jabuticaba em biscoitos tipo cookie. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 603-607, 2012.
- FORTUNY, M.; RAMOS, A. L. D.; DARIVA, C.; EGUES, S. M. da S.; SANTOS, A. F. Principais aplicações das microondas na produção e refino de petróleo, *Química Nova*, 31, p. 1553-1561, 2008.
- FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 28, p. 273-314, 1989.
- FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal foods World*, v. 45, p. 208-213, 2000.
- FREIRE, MG.; CLAUDIO, AFM.; ARAUJO, JMM.; COUTINHO, JAP.; MARRUCHO, IM.; LOPES, JNC.; REBELO, LPN. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Rev* 41, p. 4966-4995, 2012.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F.J. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Food Science*. 33, p. 78-83, 1968.
- GARCIA-CASTELLO, E.M.; RODRIGUEZ-LOPEZ, A.D.; MAYOR, L.; BALLESTEROS, R.; CONIDI, C.; CASSANO, A. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes *LWT - Food Science and Technology*, 64, p. 1114-1122, 2015.
- GONZÁLEZ-CENTENO M.R.; COMAS-SERRA.F.; FEMENIA A.; ROSSELLÓ C.; SIMAL S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling, *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 22, p. 506-514, 2015.
- GRIS, E. F.; FERREIRA, E. A.; FALCÃO, L. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from *Cabernet Sauvignon* grape extracts in model systems; *Food Chemistry*, 100(3), p. 1289, 2007.
- GROßMANN, C.; TINTINGER, R.; ZHU, J.; MAURER, G. Aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran - experimental results and modeling of thermodynamic properties. *Fluid Phase Equilibria*. 106, p. 111-138, 1995.

- GU, Y.; SHIH, P.H. Salt-induced phase separation can effectively remove the acetonitrile from the protein sample after the preparative RP-HPLC. *Enzyme Microb. Technol.* 35, p. 592–597, 2014.
- HARBORNE, J. B.; Comparative biochemistry of the flavonoids, *Academic Press*: London, 1967.
- HARBORNE, J. B.; The Flavonoids: advanced in research since 1986, *Chapman and Hall*: New York, 5th edition, 1994.
- HAYES, B. L. Microwave synthesis: chemistry at the speed of light. *CEM Publishing*, Matthews, 2002.
- HOSSEINIAN, F.S.; LI, W.D.; BETA, T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chem.* 109, p. 916-924, 2008.
- HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem* 373, p. 23–30, 2002.
- ILOUKHANU, H, ALMASE, M. Densities, viscosities, excess molar volumes, and refractive indices of acetonitrile and 2-alkanols binary mixture at different temperatures: experimental results and application of the Prigogine–Flory–Patterson theory, *Thermochim. Acta.* 495, p. 139–148, 2009.
- JAITAK, V.; SINGH B.; BIKRAM, KAUL, V.K. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *Phytochem Anal.*, vol. 20, p. 240-245, 2009.
- JOHANSSON, H. O.; FEITOSA, E.; PESSOA, A. Phase Diagrams of the Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol)/Sodium Polyacrylate/Salts, *Polymers*, 3, p. 587- 601, 2011.
- KIBBE, A. H. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3 edition, p. 440, 2000.
- LEILE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, A. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F. Jabuticaba peel: Antioxidant compounds. antiproliferative and antimutagenic activities. *Food Research International*, 49, p. 596-603, 2012.
- LEITE, A. V.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. A. M.; JUNIOR, M. R. M. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-

- Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *J. Agric. Food Chem*, 59, 2277–2283, 2011.
- LIAZID, A.; GUERRERO, R.F.; CANTOS, E.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry* 124, p. 1238–1243, 2011.
- LIMA, A. DE. J. B.; CORRÊA, A. D.; SACZK, A. A.; MARTINS, M. P.; CASTILHO, R. O. Anthocyanins, Pigment Stability And Antioxidant Activity In Jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 33, p. 877-887, 2011.
- LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. S.; PALTRAM, R.; HALBWIRTH, H.; BICA, K. Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 2017.
- LORENZI, H.; BACHER, L, LACERDA, M.; SARTORI, S. *Brazilian fruits & cultivated exotics (for consumin in natura)*. Avenida Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2000.
- LOUROS, C. L. S.; CLAUDIO, A. F. M.; NEVES, C. M. S. S.; MARRUCHO, M. G. F.; ISABEL M.; PAULY, J.; COUTINHO, J. A. P. Extraction of Biomolecules Using Phosphonium-Based Ionic Liquids + K₃PO₄ Aqueous Biphasic Systems. *Int. J. Mol. Sci.* v. 11, p. 1777-1791, 2010.
- MALPIEDI, L. P.; ROMANINI, D.; PICO, 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 Purification Technology*. v. 65, p. 40-45, 2009.
- MANDAL, M.K.; SANT, S.B.; BHATTACHARYA, P.K. Dehydration of aqueous acetonitrile solution by pervaporation using PVA-ironoxide nanocomposite membrane. *Colloid Surf. A*. 373, p. 11–21, 2011.
- MANO, E. B. *Introdução a Polímeros*. 3d. São Paulo: Edgard Blucher, 1988.
- MARTINS, J. P.; DA SILVA. M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; SENRA, T. D. A.; FERREIRA, G. M. D.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. *Journal Chemical Engineering*. v. 54, p. 2891-2894, 2009.

- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUKMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, p. 571–577, 2005.
- MERCHUCK, J.C.; B.A. ANDREWS.; J.A. ASENJO. Aqueous two-phase systems for protein separation: studies on phase inversion, *J. Chromatogr. B.* 711, p. 285–293, 1998.
- MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M.C.; MEZA-VELÁZQUEZ, JA.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, v. 106, p. 179-189, Jun. 1879-1344, 2014.
- MORTON, J. *Fruits of warm climates*. Winterville, NC: *Creative Resource Systems Inc.* 3 p.86-388, 1987.
- MOTA, W. F.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, M. C. T. Influência do tratamento pós-colheita com cálcio na conservação de jabuticaba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, p. 49-52, 2002.
- OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.
- OTHMER, D. F.; TOBIAS, P. E. Liquid–liquid extraction data The line correlation. *Ind. Eng. Chem.* 34, p. 693–696, 1942.
- PASSOS, H.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquid solutions as extractive solvents for value-added compounds from biomass, *Green Chemistry*, 16, p. 4786-4815, 2014.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.
- PERALTA-JIMÉNEZ, L; CAÑIZARES-MACÍAS, M.P. Ultrasound-Assisted Method for Extraction of Theobromine and Caffeine from Cacao Seeds and Chocolate Products. *Food Bioprocess Technology*. 6, p. 3522–3529, 2013.

- PEREIRA, JORGE F. B., LIMA, ALVARO S., FREIRE. MARA G., COUTINHO, JOAO A. P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *The journal is of Society of Chemistry, Green Chem*, 12, p. 1661–1669, 2010.
- PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri - SP, Manole, 2005.
- PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, p. 1076-1080, 2013.
- POURCEL, L., IRANI, N.G., LU, Y., RIEDL, K., SCHWARTZ, S., GROTEWOLD, E. The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol. Plant* 3, p. 78–90, 2010.
- RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins, *Food and Bioproducts Processing*, 89, p. 73-80, 2011.
- 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.; LIMA, A. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds, *Food Chemistry*, 135, p. 2453-2461, 2012.
- REIS, I. A.; SANTOS, S. B.; PEREIRA, F. D. S.; SOBRAL, C. R. S.; FREIRE, M. G.; FREITAS, L. S.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt- based aqueous two-phase systems, *Separation Science and Technology*, 49(5), p. 656-663, 2014.
- REIS, I. A. O.; CAMPOS, A. F.; SANTOS, P. H. S.; SANTOS, A. B.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied in the extraction of gallic acid from guava, *Separation Science and Technology*, 50, p. 1-9, 2015.
- REYNERTSON, K, A.; WALLACE, A. M; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products*, 69, p. 1228-1230, 2006.

- RODRIGUES-SAONA, LE.; WROLSTAD, RE. Extraction isolation and purification of anthocyanins. In Current Protocols in Food analytical Chemistry. *John Wiley e Sons*. Inc. 2011.
- RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; SOUSA, A. D.; NARAIN, N. Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407, 2015.
- ROUSSY, G.; PEARCE, J. A. Foundations and Industrial Applications of Microwave and Radio Frequency Fields. Physical and Chemical Processes, *John Wiley & Sons*, 1995.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PEREZ JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI, F. J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121, p. 996-1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, 44, p. 2072-2075, 2011.
- SADEK, P. C. The HPLC solvent guide, 2^o ed., John Wiley and Sons, Inc., Publications, 2002.
- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: Yield, composition and economical evaluation. *Journal of Food Engineering*, 101, p. 23-31, 2010a.
- 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/SiO₂) como catalisador e acetonitrila como solvent. *Química Nova*, v. 33, p. 57-64, 2010b.
- SANTOS, D. T.; ALBUQUERQUE, C. L. C.; MEIRELES, M. A. A. Antioxidant dye and pigment extraction using a homemade pressurized solvent extraction system. *Procedia Food Science*, 1, p. 1581-1588, 2011a.
- SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Optimization of bioactive compounds extraction from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins assisted by high pressure CO₂. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, p. 398-406, 2011.
- SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, 108, p. 444-452, 2012.

- SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de Proteínas, *Química Nova*, 29, p. 1345-1351, 2006.
- SMITH, R. M. Extractions with superheated water, *Journal of Chromatography A*, 975, p. 31-46, 2002.
- SOUZA, R. L.; LIMA, R. A.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification, *Separation and Purification Technology*, 2015. In Press. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.05.021.
- SPIGNO, G.; FAVERI, D. M. de. Microwave- assisted extraction of tea phenols, a phenomenological study, *Journal of Food Engineering*, 93, p. 210–217, 2009.
- STICHER, O. Natural product isolation. *Natural Product Reports*, v. 25, p. 517-554, 2008.
- TAHA, M.; TENG, H.L.; LEE, M.J. Phase diagrams of acetone nitrile or (acetone + water + EPPS) buffer phase separation systems at 298.15 K and quantum chemical modeling. *J. Chem. Thermodyn.* 54, p. 134–141, 2012.
- TAN, Z.; WANG, C.; YI, Y.; WANG, H.; LI, M.; ZHOU, W.; TAN, S.; LI, F. Extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) leaf using an ethanol/salt aqueous two-phase system, *Separation and Purification Technology*, 132, p. 396-400, 2014.
- TAO, Y.; SUN, D-W. Enhancement of Food Processes by Ultrasound: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), p. 570-594, 2015.
- TAO, Y.; WU, D.; ZHANG, Q.A.; SUN, D.W. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, p. 706-715, 2014.
- TAVEIRA, M., SILVA, L. R., VALE-SILVA, L. A., PINTO, E., VALENTAO, P., FERRERES, F., ANDRADE, P. B. Lycopersicon esculentum Seeds: An Industrial Byproduct as an Antimicrobial Agent. *J Agric Food Chem*, 58(17), p. 9529-9536, 2010.
- TREVISAN, L M.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Carbohydrates, organic acids and anthocyanins of *Myrciaria jaboticaba*, *Berg. journal of Food Science*, 37, p. 818-819, 1972.

- TÜRKER, N.; ERDOĞDU, F.; Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.); *Journal of Food Engineering*, 76(4), p. 579, 2006.
- ULLMANS, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH. v. 21, p. 752-754, 1992.
- VEGGI, P. C.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Anthocyanin extraction from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: Economic evaluation. *Procedia Food Science*, 1, p. 1725-1731, 2011.
- WANG, Y.; WANG, J.; HAN, J.; HU, S. e YAN, Y. Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts, *Central European Journal of Chemistry*, 8, p. 886-891, 2010.
- WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YANG, L. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidante activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.), *Food Chemistry*, 129, p. 443-453, 2011.
- WU, S. B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C. L.; KENNELLY, E. J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 7513-7525, 2012.
- XIANZHE, ZHENG.; XIANGWEN, XU.; CHENGHAI, LIU.; YU SUN.; ZHEN, LIN.; HAIJUN, LIU. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*. 104, p. 17–25, 2013.
- YANG, B.; ZHAO, M. M.; SHI, J.; YANG, N.; JIANG, Y. M. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp, *Food Chemistry*, 106, p. 685–690, 2008.
- YIGIT, D., YIGIT, N., & MAVI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(4), p. 346-352, 2009.
- ZHANG, D.; ZHANG, Y.; WEN, Y.; HOU, K.; ZHAO, J. Intrinsic kinetics for the synthesis of acetone from ethanol and ammonia over Co–Ni/c-Al₂O₃ catalyst. *Chem. Eng. Res.* 89, p. 2147–2152, 2011.

ZHENG, X.; XU, X.; LIU, C.; SUN, Y, LIN, Z.; LIU, H. Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology* 104, p. 7-25, 2013.