

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS NA
EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES PRESENTES EM FRUTAS
TROPICAIS**

Doutorando: Igor Adriano de Oliveira Reis

Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof^ª. Dr^ª. Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL

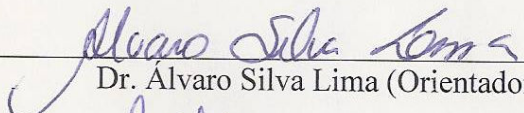
DEZEMBRO DE 2012

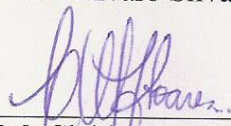
APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS NA EXTRAÇÃO DE
ANTIOXIDANTES PRESENTES EM FRUTAS TROPICAIS

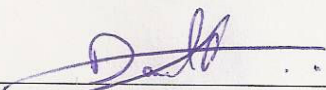
Igor Adriano de Oliveira Reis


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

Avaliado por:

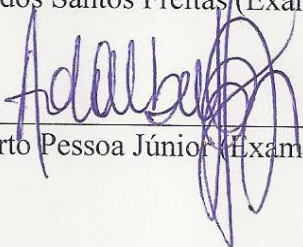

Dr. Alvaro Silva Lima (Orientador)


Dr.ª Cleide Mara Faria Soares (Orientador)


Dr. Daniel Pereira da Silva (Examinador Interno)


Dr. César Costapinto Santana (Examinador Interno)


Dr.ª Lisiane dos Santos Freitas (Examinador Externo)


Dr. Adalberto Pessoa Júnior (Examinador Externo)

ARACAJU, SE - BRASIL

DEZEMBRO DE 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

R375a Reis, Igor Adriano de Oliveira.

Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na extração de antioxidantes presentes em frutas tropicais. / Igor Adriano de Oliveira Reis; orientadores Álvaro Silva Lima, Cleide Mara Faria Soares. – Aracaju, 2012.

185 p.: il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, 2012.

1. Engenharia de Processos. 2. Antioxidantes. 3. Sistema aquosos bifásico. 4. Ácido L-ascórbico. 5. Vanilina. 6. Rutina. 7. Ácido gálico. 8. Malvidina. I. Lima, Álvaro Silva (orient.). II. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 66.098

Não se encontra senão folhas quando não é tempo de frutos.

Cabe esperar o momento certo.

(Provérbio oriental)

Agradecimentos

Ao meu Deus que me deu o Dom da Vida e me abençoou. Que me deu força para chegar ao fim do caminho escolhido. Que me presenteou com momentos de sucesso e vitória. Agradeço-te por estar sempre comigo, iluminando meus passos, dando-me sabedoria, serenidade e coragem, permitindo que eu chegasse até aqui e com muita vontade de seguir adiante.

Ao meu filho Davi, luz do meu caminho.

Aos meus queridos pais, Fernando (*In Memoriam*) e Cândida. De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Por isso já seria eternamente grato. Mas vocês não se contentaram em presentear-me somente com ela, revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram em mim, quando criança, todos os valores que me transformaram em um adulto responsável e consciente, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar... a instrução. Sei que hoje estão realizados, tanto quanto eu. Tomara Deus que eu consiga transmitir seus ensinamentos com a mesma dignidade com que vocês fizeram chegar a mim.

A minha esposa Fernanda, pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência, e que não mediu esforços para me acompanhar nessa jornada.

Aos meus irmãos, pelo apoio incondicional.

À meus orientadores e amigos, Álvaro Silva Lima e Cleide Mara Faria Soares, que sempre foram uma grande fonte de conhecimento inacabável e que puseram a minha disposição todos os ensinamentos e me fizeram gostar cada vez mais de ser um pesquisador.

Aos professores e funcionários da Universidade Tiradentes e do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A todos os colegas do mestrado e doutorado em Engenharia de Processos, em especial à meus amigos do ITP (Samuel, Andressa, Patrícia, Carla, Roneval, Camila, Acenini, Mateus, Vanessa, Alysson, Murillo, Nayara, Ranyere, Naiana, Hofsky), por ter enfrentado junto comigo todas as alegrias, tristezas, facilidades e dificuldades desse grande desafio.

A Universidade Tiradentes.

À FAPITEC/SE pela concessão da bolsa.

Agradeço a todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

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.

APLICAÇÃO DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS NA EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES PRESENTES EM FRUTAS TROPICAIS

Igor Adriano de Oliveira Reis

A obtenção de moléculas de interesse para a indústria biotecnológica, como as de alimentos, farmacêutica e biocombustível, depende estritamente das técnicas de extração e do grau de pureza dos biocompostos. Devido à complexidade dessas substâncias, as técnicas de extração e purificação são invariavelmente mais refinadas, refletindo nos custos do processo e consequentemente no valor do produto final. Portanto, é muito importante o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida, de fácil capacidade de recuperação, baixo custo e com alta eficiência de extração. Dentre as técnicas utilizadas, pode-se destacar o sistema aquoso bifásico (SAB) que se baseia na partição da biomolécula entre duas fases formadas por constituintes dispersos em água. Portanto, este estudo está focado na avaliação e utilização de SAB formados por alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 - solução tampão) na extração de biocompostos de frutas tropicais encontradas na região nordeste do Brasil. Primeiramente os diagramas de fase (curvas binodais, linhas de amarração e comprimentos das linhas de amarração) para os sistemas ternários compostos de álcool + sal inorgânico + água foram determinados a 25 °C e pressão atmosférica. A influência destes diferentes alcoóis e sais inorgânicos, na concepção do comportamento dos diagramas de fases foi investigada. Usando estes SAB's como sistema de extração modelo foi possível recuperar e separar as biomoléculas como a vanilina, ácido L-ascórbico, rutina, ácido gálico e malvidina para a fase rica em álcool ou para a fase rica em sal. A influência do sal inorgânico e do álcool utilizados foram avaliados pela estimação dos coeficientes de partição (K) e porcentagens de recuperação obtida nas duas fases co-existent e para cada composto. Uma segunda etapa do trabalho foi a extração das biomoléculas em SAB's formados por alcoóis e sais de fosfato de potássio em resíduos de frutas (acerola, goiaba e jamelão). No processo de extração em matrizes reais as biomoléculas migram para a fase de topo ($K > 1$) ou fase de fundo ($K < 1$) a depender dos constituintes dos sistemas e da molécula alvo, corroborando com os sistemas modelos estudados. Assim, os SAB's baseados em álcool-sal podem ser encarados como processos alternativos de extração para a recuperação de compostos de alto valor agregado, tais como ácido ascórbico, ácido gálico, vanilina, rutina e malvidina, a partir de resíduos agroindustriais. Os constituintes do sistema podem ser manipulados de modo a se ter as biomoléculas extraídas para a fase rica em álcool ou rica em sal de potássio, demonstrando assim a versatilidade dos sistemas estudados.

Palavras-Chave: extração, sistema aquoso bifásico, antioxidantes, biomoléculas.

Abstract of thesis submitted to the Process Engineering Graduate Program of University Tiradentes as part of the requirements for the degree of Doctor of Engineering Processes.

APPLICATION SYSTEMS IN AQUEOUS TWO-PHASE EXTRACTION ANTIOXIDANTS IN THESE TROPICAL FRUITS

Igor Adriano de Oliveira Reis

The achievement of molecules of interest in the biotechnological industry, such as food, pharmaceuticals and biodiesel, depends strictly on the extraction techniques and the purity of the compounds. Due to the complexity of substances, the extraction and purification techniques are invariably refined, reflection in the processes costs and consequently on the final product. However, it is very important to develop a simple, rapid and of easy recovery method, with low costs and high extraction efficiency. Among the techniques used, the aqueous biphasic system (ABS) based on the partitioning of the biomolecule in two phases formed by constituents dispersed in water. However, for this study the evaluation and use of ABS formed by alcohols (methanol, ethanol, 1 – propanol and 2 – propanol) and potassium salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 , K_2HPO_4/K_2HPO_4 - buffer solution) in the extraction of biocompounds from tropical fruits found in the northeast of Brazil were used. Firstly, the phase diagrams (binodal curves, tie lines and its lengths) for the ternary system composed of alcohol + inorganic salt + water were determined at 25 °C and atmospheric pressure. The influence of these alcohols and inorganic salts, in the conception of the phase diagram behavior were also investigated. Using ABS's as the extraction model it was possible to recover and separate biomolecules such as vanillin, ascorbic acid, rutin, galic acid and malvidin for the phase rich in alcohol or rich in salt. The influence of inorganic salt and alcohol used were evaluated by estimating the partitioning coefficients and recovery percentage in both coexisting phases and for each compound. The second stage was the extraction of biomolecule from ABS formed by alcohols and potassium phosphate salts residues from fruits (barbados cherry, guava and java plum). In the extraction process in real matrixes, the biomolecules migrate to the top phase ($K > 1$) or the bottom phase ($K < 1$) depending on the compounds of each system based in alcohol salt, agreeing with the system studied. So the ABS's salt-alcohol-based can be viewed as an alternative extraction processes for recovery of high-value compounds from various agro-industrial residues. The constituents of the system may be manipulated such a way to obtain biomolecules extracted from alcohol rich- phase or potassium salt rich- phase, thus demonstrating the versatility of the systems studied.

Key words: extraction, biphasic aqueous system, antioxidants, biomolecules.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS.....	xv
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 BIOMOLÉCULAS	5
1.1.1 ANTIOXIDANTES	6
1.1.1.1 Ácido L-ascórbico.....	9
1.1.1.2 Ácido Gálico.....	10
1.1.1.3 Antocianinas	12
1.1.1.4 Vanilina.....	14
1.1.1.5 Rutina.....	15
1.2 FRUTAS TROPICAIS	17
1.2.1. Acerola.....	18
1.2.2. Jamelão	20
1.2.3. Goiaba.....	21
1.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS	23
1.3.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB).....	25
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. ARTIGO I – Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds.....	37
4. ARTIGO II – Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems	86
5. ARTIGO III – Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied to the extraction of gallic acid from guava.....	111
6. ARTIGO IV – Rutin extraction from acerola residue assisted by ultrasound combined with biphasic aqueous system	136
7. ARTIGO V – Recuperação de compostos antioxidantes a partir de resíduos da fruta jamelão: Extração de malvidina usando sistema de duas fases aquosas formados por alcoóis e sais de fosfato de potássio	162
8. CONCLUSÃO.....	180
9. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS	183
10. TRABALHOS FUTUROS	184
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1.1: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO L-ASCÓRBICO.....	9
FIGURA 1.2: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO.....	11
FIGURA 1.3: ESTRUTURA GENÉRICA DAS ANTOCIANINAS A PARTIR DO ESQUELETO DAS ANTOCIANIDINAS (AGLICONAS).....	12
FIGURA 1.4: ESTRUTURA QUÍMICA DA VANILINA.....	14
FIGURA 1.5: ESTRUTURA QUÍMICA DA RUTINA.....	15
FIGURA 1.6: ASPECTO DO FRUTO DA ACEROLA EM ESTÁDIO MADURO.....	18
FIGURA 1.7: ASPECTO DO FRUTO DO JAMELÃO (<i>Syzygium Cumini</i>) EM ESTÁDIO MADURO.....	20
FIGURA 1.8: ASPECTO DO FRUTO DA GOIABA (<i>Psidium Guajava L.</i>).....	22
FIGURA 1.9: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UM DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO.....	28
FIGURA 1.10: FATORES QUE INFLUENCIAM O SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB).....	32
FIGURA 1.11: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTIÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS NO SAB.....	34

CAPÍTULO III

FIGURE 1: PHASE DIAGRAMS OF ALL THE TERNARY SYSTEMS STUDIED COMPOSED OF FOUR ALCOHOLS (□) METHANOL, (■) ETHANOL, (●) 1-PROPANOL, AND (○) 2-PROPANOL, AND THREE INORGANIC SALTS: (i) K_3PO_4 , (ii) K_2HPO_4 , AND (iii) KH_2PO_4/K_2HPO_4	46
FIGURE 2: LOGARITHM FUNCTION OF THE PARTITION COEFFICIENTS (LOG K) OF THE TWO COMPOUNDS, VANILLIN (BLACK LINES) AND L-ACID ASCORBIC (GRAY LINES), FOR ALL THE EXTRACTION SYSTEMS COMPOSED OF METHANOL, ETHANOL, 1-PROPANOL, AND 2-PROPANOL, AND THE INORGANIC SALTS: K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND K_2HPO_4/KH_2PO_4 (TRIANGLES - DASHED LINE). THE CHEMICAL STRUCTURES OF EACH ONE OF THE BIOMOLECULES ARE ALSO SHOWN IN THIS FIGURE TO HELP THE RESULTS' INTERPRETATION.....	51
FIGURE 3: RECOVERY PERCENTAGES OF VANILLIN (DARK LINES) AND L-ASCORBIC ACID (GRAY LINES) OBTAINED IN EACH ONE OF THE EXTRACTION SYSTEMS STUDIED. THE TERNARY SYSTEMS ARE COMPOSED OF DIFFERENT ALCOHOLS, NAMELY METHANOL, ETHANOL, 1-PROPANOL, AND 2-PROPANOL, WITH THE INORGANIC SALTS: K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND K_2HPO_4/KH_2PO_4 (TRIANGLES - DASHED LINE).....	52
FIGURE 4: EXTRACTION PARAMETERS (RECOVERY PERCENTAGES AND PH VALUES FOR THE TOP AND BOTTOM PHASES) AND PARTITION COEFFICIENTS OF VANILLIN (DARK BARS) AND L-ASCORBIC ACID (GRAY BARS) FROM THE VANILLA DIET PUDDING DR. OETKER, OBTAINED USING THE OPTIMISED ATPS: 2-PROPANOL (50 WT.%) + K_2HPO_4 (15 WT.%) + H_2O (35 WT.%) AND ETHANOL (50 WT.%) + K_2HPO_4 (15 WT.%) + H_2O (35 WT.%). THE pH VALUES TOGETHER WITH THE RESPECTIVE STANDARD DEVIATIONS ARE ALSO REPORTED.....	54

ANEXO A - Supporting Information

FIGURE S.1: PHASE DIAGRAMS OF ALL THE TERNARY SYSTEMS STUDIED COMPOSED OF FOUR INORGANIC SALTS (\star) K_3PO_4 , (\blacktriangle) K_2HPO_4 , AND (\bullet) KH_2PO_4/K_2HPO_4 , AND FOUR ALCOHOLS: (i) METHANOL, (ii) ETHANOL, (iii) 1-PROPANOL, AND (iv) 2-PROPANOL..... 72

FIGURE S.2: PHASE DIAGRAMS FOR TWO TERNARY SYSTEM COMPOSED OF: (i) METHANOL + K_2HPO_4 + WATER AND (ii) 2-PROPANOL + K_3PO_4 + WATER. THE DATA PRESENTED WAS PREPARED AT 298 (\pm 1) K AND IS DESCRIBED BY: (\circ) EXPERIMENTAL PHASE DIAGRAM DATA; (\star) TL DATA. THE SOLID LINE REPRESENTS THE FIT OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQUATION (1)..... 73

FIGURE S.3: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF METHANOL + K_3PO_4 + WATER AT 298 (\pm 1) K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE SOLID LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQUATION (1)..... 74

FIGURE S.4: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF METHANOL + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 75

FIGURE S.5: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF ETHANOL + K_3PO_4 + WATER AT 298 (\pm 1) K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 76

FIGURE S.6: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF ETHANOL + K_2HPO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 77

FIGURE S.7: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF ETHANOL + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 78

FIGURE S.8: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF 1-PROPANOL + K_3PO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 79

FIGURE S.9: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF 1-PROPANOL + K_2HPO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 80

FIGURE S.10: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF 1-PROPANOL + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 81

FIGURE S.11: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF 2-PROPANOL + K_2HPO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 82

FIGURE S.12: PHASE DIAGRAM FOR THE ATPS COMPOSED OF 2-PROPANOL + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + WATER AT 298 K: (\circ) SOLUBILITY CURVE EXPERIMENTAL DATA, (\star) TL DATA. THE DASHED LINE REPRESENTS THE FITTING OF THE EXPERIMENTAL DATA BY EQ (1)..... 83

FIGURE S.13: GRAPHICAL REPRESENTATION OF THE DATA DISPERSION BETWEEN THE REAL MASS CONCENTRATION OF L-ASCORBIC ACID USED IN THE PREPARATION OF DIFFERENT ALCOHOLIC SOLUTIONS AND THE RESPECTIVE MASS CONCENTRATIONS MEASURED USING THE TILLMAN'S METHOD. (\blacksquare) METHANOL; (\square) ETHANOL; (\blacktriangle) 1-PROPANOL; (\triangle) 2-PROPANOL..... 84

FIGURE S.14: ILLUSTRATION OF THE CHEMICAL STRUCTURES OF VANILLIN OBTAINED FOR DIFFERENT pH VALUES..... 85

CAPÍTULO IV

FIGURE 1: MOLECULAR STRUCTURE OF RUTIN..... 88

FIGURE 2: PARTITION COEFFICIENTS OF RUTIN, KRUT, IN THE SEVERAL ALCOHOL-SALT ATPS AT 298.15 K AS A FUNCTION OF INITIAL RUTIN CONCENTRATION. ALCOHOL: □ - METHANOL, ■ - ETHANOL, ■ - 1-PROPANOL, ■ - 2-PROPANOL; POTASSIUM PHOSPHATE SALTS: (i) $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, (ii) K_2HPO_4 , AND (iii) K_3PO_4 . ALL ATPS ARE COMPOSED OF 50 WT% OF ALCOHOL AND 15 WT% OF SALT..... 96

FIGURE 3: INFLUENCE OF THE 1-PROPANOL CONCENTRATION IN THE ATPS CONTAINING $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ AT 20 WT% (i) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ BUFFER CONCENTRATION IN THE ATPS CONTAINING 1-PROPANOL AT 40 WT% (ii) AT 298.15 K IN THE PARTITION COEFFICIENT (■) AND EXTRACTION EFFICIENCY (□) OF RUTIN..... 99

FIGURE 4: EFFECT OF TEMPERATURE ON THE PARTITION COEFFICIENT (■) AND EXTRACTION EFFICIENCY (□) OF RUTIN IN THE ATPS COMPOSED OF 1-PROPANOL AT 40 WT% AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ AT 20 WT%..... 100

FIGURE 5: EFFECT OF THE CONCENTRATION OF NaCl IN THE PARTITION COEFFICIENT (■) AND THE EXTRACTION EFFICIENCY (□) OF RUTIN IN THE SYSTEM COMPOSED OF 1-PROPANOL (40 WT%) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (20 WT%) AT 303.15 K..... 101

FIGURE 6: PARTITION COEFFICIENTS AND EXTRACTION EFFICIENCIES OF RUTIN EXTRACTED FROM THE PEELS AND SEEDS OF ACEROLA AT 298.15 K..... 103

CAPÍTULO V

FIGURE 1: CHEMICAL STRUCTURE OF GALLIC ACID..... 113

FIGURE 2: LOGARITHM FUNCTION OF THE PARTITION COEFFICIENTS (LOG KAG) IN THE ATPS COMPOSED OF METHANOL, ETHANOL, 1-PROPANOL, AND 2-PROPANOL, AND THE INORGANIC SALTS K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ BUFFER (TRIANGLES - DASHED LINE)..... 120

FIGURE 3: RECOVERY PERCENTAGES OF GALLIC ACID OBTAINED IN EACH ONE OF THE EXTRACTION SYSTEMS STUDIED. THE TERNARY SYSTEMS ARE COMPOSED OF DIFFERENT ALCOHOLS, NAMELY METHANOL, ETHANOL, 1-PROPANOL, AND 2-PROPANOL, WITH THE INORGANIC SALTS K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ BUFFER (TRIANGLES - DASHED LINE). 122

FIGURE 4: LOGARITHM FUNCTION OF THE PARTITION COEFFICIENTS (LOG KAG) IN THE ATPS COMPOSED OF PEG 1500, PEG 4000 AND PEG 8000, AND THE INORGANIC SALTS K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ BUFFER (TRIANGLES - DASHED LINE)..... 123

FIGURE 5: RECOVERY PERCENTAGES OF GALLIC ACID OBTAINED IN EACH ONE OF THE EXTRACTION SYSTEMS STUDIED. THE TERNARY SYSTEMS ARE COMPOSED OF DIFFERENT PEG MOLECULAR WEIGHT, NAMELY PEG 1500, PEG 4000 AND PEG 8000, WITH THE INORGANIC SALTS K_3PO_4 (CIRCLES - SOLID LINE), K_2HPO_4 (SQUARES - POINTED LINE) AND $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ BUFFER (TRIANGLES - DASHED LINE)..... 125

FIGURE 6: CONVENTIONAL EXTRACTION OF GALLIC ACID FROM GUAVA USING DIFFERENT ALCOHOLS, NAMELY METHANOL, ETHANOL, 1-PROPANOL AND 2-PROPANOL..... 126

CAPÍTULO VI

FIGURE 1: MOLECULAR STRUCTURE OF RUTIN..... 139

FIGURE 2: STANDARD CHROMATOGRAMS AND SAMPLES: (A) STANDARD, (B) RUTIN CONVENTIONAL EXTRACTION, (C) RUTIN EXTRACTION ASSISTED BY ULTRASOUND, (D) EXTRACTION COMBINED WITH RUTIN..... 145

FIGURE 3: THE EFFECT OF ALCOHOL TYPE AND CONCENTRATION IN RUTIN FROM ACEROLA WASTE IN COLD CONVENTIONAL EXTRACTION WITH AGITATION. ALCOHOLS: ■ – METHANOL; ■ – ETHANOL; □ – 1-PROPANOL; ■ – 2-PROPANOL..... 146

FIGURE 4: EXTRACTION TIME INFLUENCE ON ULTRASOUND OF THE RUTIN EXTRACTION YIELDS FROM ACEROLA WASTE (PEEL AND SEEDS) USING ETHANOL (□) AND 1-PROPANOL (■) SOLVENTS. CONTROL PROCEDURE (0): MAGNETIC AGITATION RATHER THAN ULTRASOUND TREATMENT..... 148

FIGURE 5: SOLVENT VOLUME/SAMPLE WEIGHT IN THE RUTIN EXTRACTION YIELD IN ACEROLA WASTE (PEEL AND SEEDS) USING ETHANOL (□) AND 1-PROPANOL (■) SOLVENTS..... 149

FIGURE 6: THE FREQUENCY OF EXTRACTIONS ASSISTED BY ULTRASOUND INFLUENCE OVER THE RUTIN EXTRACTION YIELD FOR ACEROLA WASTE ASSISTED BY ULTRASOUND USING ETHANOL (□) AND 1-PROPANOL (■) SOLVENTS. CONTROL PROCEDURE (0): MAGNETIC AGITATION INSTEAD OF ULTRASOUND TREATMENT..... 150

FIGURE 7: RUTIN EXTRACTION CYCLE ASSISTED BY ULTRASOUND INFLUENCE USING SOLVENTS: ETHANOL (■); 1-PROPANOL (◆) AND WATER (▲)..... 152

FIGURE 8: THE YIELD COMPARISON RESULTS OF CONVENTIONAL ASSISTED BY ULTRASOUND AND COMBINED EXTRACTION (ULTRASOUND + AGITATION) USING ETHANOL (□) AND 1-PROPANOL (■) SOLVENTS..... 153

CAPÍTULO VII

FIGURA 1: (A) CROMATOGRAMAS DO PADRÃO (LINHA PRETA) E AMOSTRA (LINHA VERMELHA); (B) VARREDURA DO ESPECTRO DO PADRÃO DA MAVIDINA..... 170

FIGURA 2: EFEITO DO TIPO DOS ALCOÓIS NA CONCENTRAÇÃO DE MALVIDINA E FENÓIS TOTAIS A PARTIR DE RESÍDUOS DE JAMELÃO NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL A FRIO COM AGITAÇÃO. BIOMOLÉCULAS: □ – MALVIDINA (mg/100g); ■ – FENÓIS TOTAIS (mg EAG/100g)..... 171

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

<i>TABELA 1.1: CLASSIFICAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.</i>	5
<i>TABELA 1.2: PRINCIPAIS AGENTES DE DEFESA ANTIOXIDANTE.</i>	6
<i>TABELA 1.3: FONTES ENDÓGENAS E EXÓGENAS DE GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES.</i>	6
<i>TABELA 1.4: ALGUMAS FONTES DE ANTIOXIDANTES NA DIETA ALIMENTAR.</i>	7
<i>TABELA 1.5: TEORES DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO DE FRUTAS TROPICAIS.</i>	10
<i>TABELA 1.6: TEORES DE ÁCIDO GÁLICO EM FRUTAS TROPICAIS.</i>	12
<i>TABELA 1.7: ANTOCIANINAS TOTAIS DE FRUTAS TROPICAIS.</i>	13
<i>TABELA 1.8: TEORES DE RUTINA EM VÁRIOS TIPOS DE AMOSTRAS DE ACEROLA.</i>	16
<i>TABELA 1.9: EXEMPLOS DE COMPONENTES E TIPOS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO.</i>	27
<i>TABELA 1.10: EXEMPLOS DE DIFERENTES COMPONENTES UTILIZADOS NA FORMAÇÃO DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO PARA A EXTRAÇÃO DE DIVERSAS BIOMOLÉCULAS.</i>	28

CAPÍTULO III

<i>TABLE 1: pH VALUES OF THE TOP (T) AND BOTTOM (B) PHASES FOR THE EXTRACTION SYSTEMS COMPOSED OF ALCOHOL + INORGANIC SALT + WATER, AT 298 K AND ATMOSPHERIC PRESSURE.</i>	48
--	----

ANEXO A - Supporting Information

<i>TABLE S1: EXPERIMENTAL BINODAL MASS FRACTION DATA FOR THE SYSTEM COMPOSED OF METHANOL (1) + SALT (2) + WATER (3) AT 298 K.</i>	62
<i>TABLE S2: EXPERIMENTAL BINODAL MASS FRACTION DATA FOR THE SYSTEM COMPOSED OF ETHANOL (1) + SALT (2) + WATER (3) AT 298 K.</i>	63
<i>TABLE S3: EXPERIMENTAL BINODAL MASS FRACTION DATA FOR THE SYSTEM COMPOSED OF 1-PROPANOL (1) + SALT (2) + WATER (3) AT 298 K.</i>	64
<i>TABLE S4: EXPERIMENTAL BINODAL MASS FRACTION DATA FOR THE SYSTEM COMPOSED OF 1-PROPANOL (1) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (2) + WATER (3) AT 298 K.</i>	65
<i>TABLE S5: EXPERIMENTAL BINODAL MASS FRACTION DATA FOR THE SYSTEM COMPOSED OF 2-PROPANOL (1) + SALT (2) + WATER (3) AT 298 K.</i>	66

TABLE S6: ADJUSTED PARAMETERS AND RESPECTIVE STANDARD DEVIATIONS (STD) OBTAINED FROM THE REGRESSION OF EQ. (1), AT 298 K AND ATMOSPHERIC PRESSURE.....67

TABLE S7: MASS FRACTION COMPOSITIONS FOR THE INITIAL MIXTURE (M), TL DATA AND RESPECTIVE TLLS, IN THE TOP (T) AND BOTTOM (B) PHASES, FOR THE SYSTEMS COMPOSED OF ALCOHOL (Y) AND INORGANIC SALT (X), AT 298 K AND ATMOSPHERIC PRESSURE.....68

TABLE S8: WEIGHT FRACTION COMPOSITIONS AND PARTITION COEFFICIENTS DATA OF L-ASCORBIC ACID (K_{AA}), DETERMINED AT 298 (± 1) K.....69

TABLE S9: WEIGHT FRACTION COMPOSITION AND PARTITION COEFFICIENT DATA OF VANILLIN (K_{VAN}), DETERMINED AT 298 (± 1) K.....70

TABLE S10: CONCENTRATION OF THE ANTIOXIDANTS AND pH VALUES OF THE ALCOHOL SOLUTION OF THE PUDDING SAMPLES FOR THE EXTRACTION SYSTEMS COMPOSED OF ALCOHOL + INORGANIC SALT + WATER, AT 298 (± 1) K AND ATMOSPHERIC PRESSURE.....71

CAPÍTULO V

TABLE 1: pH VALUES OF THE TOP (T) AND BOTTOM (B) PHASES FOR THE EXTRACTION SYSTEMS OF GALLIC ACID (500 mg.L^{-1}) COMPOSED OF ALCOHOL + INORGANIC SALT + WATER, AT 298 K AND ATMOSPHERIC PRESSURE..... 121

TABLE 2: pH VALUES OF THE TOP (T) AND BOTTOM (B) PHASES FOR THE EXTRACTION SYSTEMS THE BIOMOLECULE RUTIN COMPOSED OF ALCOHOL + INORGANIC SALT + WATER, AT 298 K AND ATMOSPHERIC PRESSURE..... 124

TABLE 3: PARTITION COEFFICIENT OF GALLIC ACID, RECOVERY AND pH VALUES OF PHASE FOR DIFFERENT TERNARY SYSTEM AT 298.15 K..... 128

CAPÍTULO VI

TABLE 1: EXTRACTION PARAMETERS AND PARTITIONING COEFFICIENTS OF RUTIN OBTAINED FROM THE REAL SAMPLE OF WASTE OF ACEROLA USING ATPS..... 155

CAPÍTULO VII

TABELA 1: COEFICIENTES DE PARTIÇÃO DA MALVIDINA (K_{MAL}) E FENÓIS TOTAIS (K_{FT}), RECUPERAÇÃO (R_{MAL}) E FATOR DE PURIFICAÇÃO (FP_{MAL}) DA MALVIDINA NA FASE DE TOPO (T) E FUNDO (B) OBTIDOS A PARTIR DA CASCA DO JAMELÃO UTILIZANDO SAB's..... 173

TABELA 2: VALORES DE PH NAS FASES DE TOPO (T) E FUNDO (B) PARA OS SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DA MALVIDINA E DOS FENÓIS TOTAIS A PARTIR DO JAMELÃO COMPOSTO DE ÁLCOOL + SAL INORGÂNICO + ÁGUA, À 25 °C E PRESSÃO ATMOSFÉRICA 175

LISTA DE SIGLAS

C_{T ou B}: Concentração biomolécula na fase de topo ou fundo (g/L e/ou mg/100g)

K: Coeficiente de partição da biomolécula (adimensional)

PEG: Polietilenoglicol

PF_{T ou B}: Fator de purificação na fase de topo ou fundo (adimensional)

E: Eficiência de extração (adimensional)

R_{T ou B}: Recuperação na fase de topo ou fundo (adimensional)

R_V: Razão volumétrica (adimensional)

SAB: Sistema Aquoso Bifásico

TL e TLL: Linha de amarração e Comprimento da linha de amarração

AA: Ácido L-ascórbico

VAN: Vanilina

GA: Ácido Gálico

MAL: Malvidina

FT: Fenóis Totais

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

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país rico em frutos tropicais exóticos, de alto valor nutricional, os quais apresentam vitaminas e pigmentos naturais na sua composição e têm alto potencial de industrialização. O mercado dessas frutas, anteriormente restrito a áreas locais, tem se expandido para centros metropolitanos, isto devido ao sabor exótico apresentados por estes frutos tropicais, o que contribui para o aumento de seu consumo. A produção mundial de frutas atingiu 540 milhões de toneladas anuais, movimentando um valor comercial de 162 bilhões de dólares no ano de 2009 (DANTAS *et al.*, 2009). A China ocupa o primeiro lugar no ranking, com 175 milhões de toneladas, seguida da Índia e do Brasil, com 57 e 43 milhões, respectivamente (IBRAF, 2012). No Brasil, a fruticultura ocupa uma área de 2,5 milhões de hectares, empregando 5,6 milhões de pessoas, aproximadamente 27% da mão-de-obra agrícola do país (NASCENTE, 2003).

O Nordeste do Brasil destaca-se na produção de uma grande variedade de frutas, representando uma ótima alternativa de agronegócio para a região. Muitas fruteiras são bem adaptadas às condições de luminosidade, clima e solo predominantes na região Nordeste, e algumas espécies, em especial as frutas tropicais, têm se destacado por seu enorme potencial nos mercados externo e interno. Atualmente, vários municípios de Sergipe têm investido na fruticultura de frutas tropicais, em decorrência disso o Estado se destaca na produção de algumas frutas, como a acerola, com boas perspectivas para os mercados externo e interno. Essas frutas apresentam em sua composição compostos extremamente importantes e de interesse da indústria de alimentos como os corantes, e para o segmento de saúde destacam-se os ácidos fenólicos, antocianinas, carotenóides, representando assim um grande potencial a ser explorado.

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido à sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas. O interesse pela ação antioxidante de componentes da dieta é notoriamente crescente nos últimos anos, com especial ênfase às vitaminas A, C, E e o β -caroteno. Essa importância está relacionada com a presença de radicais livres no organismo humano que causam danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e conseqüentemente propicia o surgimento de várias doenças como câncer, envelhecimento precoce dos tecidos, lesões em órgão como o fígado, entre outros.

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos devem-se principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos. Encontram-se ainda nas frutas, nos vegetais e condimentos, os quais apresentam outras classes de substâncias que também contribuem para suas propriedades biológicas, como os compostos nitrogenados, carotenóides, vitaminas, polissacarídeos e clorofila.

Aliado ao aspecto nutricional os frutos tropicais apresentam uma elevada produção e um forte potencial para industrialização, gerando resíduo agroindustrial que, geralmente, resulta em acúmulo de lixo e impacto ambiental. Vale destacar que as cascas e as sementes são frequentemente os maiores componentes de vários frutos e geralmente não recebem a devida atenção. Neste sentido, não ocorre o reaproveitamento ou a reciclagem deste material, possivelmente, em decorrência da falta de valor comercial. Merece destaque, também, o teor de compostos com ação antioxidante presente nesses resíduos, pois estudos têm revelado que as cascas e as sementes de certos frutos exibem atividade antioxidante mais elevada do que a polpa, e que o perfil dos fitoquímicos antioxidantes é diferenciado nestas partes do vegetal (GUO *et al.*, 2003).

Diante do exposto, estudos sobre a extração de antioxidantes são de fundamental importância. Dentre os métodos de extração podem ser citados os métodos convencionais de extração utilizando solventes orgânicos (como etanol e metanol), e os métodos não convencionais como a extração em fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, extração por micro-ondas, micro-extração em fase sólida, extração por ultra-som e, como forma de purificação da biomolécula, a utilização de técnicas cromatográficas. Essas técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos dispendiosos e podem apresentar condições que sejam danosas às biomoléculas, por serem muitas vezes condições muito drásticas.

Por esta razão o consumo de solventes é inevitavelmente alto, e conseqüentemente os custos do processo são também elevados, sendo assim faz-se necessário o uso de uma técnica que permita um alto grau de purificação, separação e recuperação associada a um baixo custo de operação. Além disso, o processo deve ser simples, evitando sucessivas etapas.

Entre as técnicas de extração de antioxidantes destaca-se o uso do ultra-som, cuja vantagem está na possibilidade de usar diferentes solventes para a extração, bem

como diminuir o tempo necessário para realizá-las, além de apresentar uma boa reprodutibilidade. Todavia, a extração de antioxidantes com ultra-som depende da intensidade da cavitação e temperatura, sendo necessário otimizar estes parâmetros para a utilização desta técnica, além do custo do equipamento.

Uma técnica que desponta para a extração de biomoléculas são os sistemas aquosos bifásicos, que podem ser formados utilizando uma série de compostos como polímeros, sais inorgânicos, líquidos iônicos, alcoóis, dentre outros. A formação das duas fases dependerá das interações intermoleculares, que são responsáveis pela distribuição dos componentes, pela relação do volume entre as fases e do coeficiente de partição, dentre outros. Estes sistemas apresentam como maiores vantagens a sua biocompatibilidade, fácil ampliação de escala, facilidade de operação que permite um seletivo e rápido processo de extração, além da alta concentração de água que oferecem um ótimo meio para biomoléculas sensíveis, baixa tensão interfacial que facilita a migração das biomoléculas e também de partículas celulares entre as fases e ainda minimiza o risco de comprometimento da estrutura da biomolécula.

Entretanto a utilização de sistemas polímero-polímero apresenta algumas desvantagens como a lenta segregação das fases e a difícil reciclagem dos componentes formadores das fases que levaram à aplicação de sistemas baseado em sais. Este trabalho foca-se na utilização de alcoóis e sais, ambos de baixo custo e com uma abundância significativa na região nordeste, área onde o trabalho é desenvolvido.

Os sistemas aquosos bifásicos compostos por alcoóis e sais de fosfato de potássio apresentam como vantagem a baixa viscosidade, alta polaridade e a fácil recuperação dos alcoóis, associando-se ainda o mais baixo custo destes sistemas.

Entretanto, para a aplicação do sistema aquoso bifásico, é necessário o conhecimento prévio dos diagramas de fase dos sistemas em estudo, por este motivo as curvas binodais para todos os sistemas utilizados e as linhas de amarração que preveem a composição das fases de topo e fundo para alguns pontos de mistura foram realizadas. Cabe ressaltar a importância deste procedimento para o entendimento dos efeitos associados durante a partição de biomoléculas, além do ajuste matemático inserido.

Alguns trabalhos de partição de moléculas em sistemas alcoóis e sais (OOI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010) já foram publicados, porém a otimização das condições do processo de partição das biomoléculas não foram inteiramente estudadas, bem como a extração de biocompostos em frutas. Portanto este trabalho aplica a variação dos tipos e concentrações dos alcoóis e sais de fosfato de potássio, da temperatura e da adição de

eletrólitos na extração de antioxidantes em matrizes reais de frutas, tornando o trabalho inovador. Para entendimento da partição e recuperação de antioxidantes foram escolhidas como modelos, o ácido L-ascórbico, a vanilina, a rutina, o ácido gálico e a malvidina. Assim, foi possível constatar que a aplicação destes sistemas aquosos bifásicos formados por álcool-sal podem ser promissoras técnicas para a extração de compostos valiosos a partir de fontes simples ou ainda mais complexas, como por exemplo, resíduos agroindustriais e de alimentos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico será apresentado o estado da arte referente à extração de biomoléculas, em especial a revisão bibliográfica quanto à aplicação da técnica de extração líquido-líquido, especificamente o sistema aquoso bifásico formado por álcoois e sais de fosfato de potássio. Também, são apresentadas as propriedades das biomoléculas utilizadas.

1.1 Biomoléculas

O termo biomoléculas possui uma definição bastante ampla, abrange compostos sintetizados por organismos vivos como vegetais, animais e micro-organismo, os quais as utilizam no metabolismo, na digestão, na proteção, na locomoção e outros. As biomoléculas podem ser classificadas como de origem endógena ou de origem exógena, a Tabela 1.1 apresenta alguns exemplos de biomoléculas quanto a sua classificação (GREISLER, 2003).

Tabela 1.1. Classificação das biomoléculas.

Endógenas	Exógenas
Ácidos Nucléicos	Antioxidantes
Lipídios	Minerais
Glicídios	Retinol
Proteínas	Bioflavina

A aplicação de biomoléculas em diversas atividades industriais tem evoluído com o passar dos anos, principalmente devido ao surgimento de diversas técnicas de extração e purificação. Este interesse crescente é fortalecido pela alta demanda das indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica por produtos com alto grau de pureza (ZUÑIGA *et al.*, 2003), como por exemplo, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos,

antioxidantes, dentre outros. A seguir são apresentadas algumas biomoléculas de interesse deste trabalho.

1.1.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas à do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação deste substrato de forma eficaz (SIES e STAHL, 1995), ou seja, inibem e reduzem as lesões causadas pelos radicais livres nas células. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos, como apresentado na Tabela 1.2 (SIES, 1993).

Tabela 1.2. Principais agentes de defesa antioxidante.

Não-enzimático	Enzimático
α -tocoferol*	superóxido dismutase
β -caroteno	catalase
Ácido L-ascórbico**	glutathione peroxidase

*Vitamina E, **Vitamina C

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993).

A presença de radicais livres no organismo humano está relacionada a danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando várias doenças como câncer, envelhecimento precoce dos tecidos, lesões em órgão como fígado, entre outros. Esses danos são causados por fontes endógenas e exógenas (Tabela 1.3).

Tabela 1.3. Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

Fontes endógenas	Fontes exógenas
Respiração aeróbica	Cigarro
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta

Entretanto devido à eficiência parcial do sistema antioxidante enzimático do organismo humano, torna-se necessária a ingestão de compostos antioxidantes por meio da dieta alimentar, o que contribui para o mecanismo antioxidantes não-enzimático (PIETTA *et al.*, 1998). Os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes contêm agentes antioxidantes (Tabela 1.4), tais como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides, antocianinas e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

Tabela 1.4. Algumas fontes de antioxidantes na dieta alimentar.

Alimento	Antioxidante
Mamão	β -caroteno
Acerola	rutina
Uva	quercetina
Espinafre	clorofila
Laranja	ácido L-ascórbico
Jamelão	antocianinas

A vitamina C, β -caroteno e os ácidos fenólicos são considerados excelentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência. As fontes geradoras de radicais livres podem diminuir os níveis de antioxidantes celulares. Entretanto, as defesas antioxidantes do organismo podem ser restabelecidas com dietas apropriadas e suplementos vitamínicos (CARAGAY, 1992; ANDERSON, 1996).

Recomendações dietéticas para uma alimentação saudável incluem o consumo de frutas, pela presença de vitamina C, um eficiente antioxidante natural (GARDNER *et al.*, 2000), além de compostos fenólicos e carotenóides, que também apresentam potencial antioxidante (GARDNER *et al.*, 2000). De acordo com Halliwell (1996), a vitamina C possui alta disponibilidade biológica e, portanto, é o mais importante antioxidante hidrossolúvel nas células, absorvendo eficientemente espécies reativas como O_2^- (oxigênio singlete), OH (radicais peroxila). Estudos epidemiológicos atribuem a vitamina C um possível papel de proteção no desenvolvimento de tumores nos seres humanos (DUTHIE *et al.*, 1996).

Pigmentos, como o licopeno e o β -caroteno, por exemplo, funcionam como antioxidantes naturais e têm capacidade de proteger membranas, DNA e outros constituintes celulares contra danos oxidativos (SANTAMARIA e BIANCHI, 1989; KRINSKY, 1991).

Dentre os compostos antioxidantes, destacam-se os ácidos fenólicos presentes nas formas livres ou complexadas. Estes compostos foram identificados e quantificados nas mais diferentes frutas e vegetais, apresentando alta correlação com a atividade antioxidante demonstrada pelas mesmas (HOLMMAN e ARTS, 2000; KING e YOUNG, 1999). Entretanto, o conteúdo de fenólicos encontrados em diferentes frutas ou vegetais é bastante variado. Estas diferenças podem ser devido à complexidade desse grupo de compostos, aos métodos de extração e/ou à metodologia de quantificação empregada. Além disso, o conteúdo de fenólicos de plantas depende de fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento) (SUN, 2002).

Os compostos fenólicos promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006), e está representado pelas Equações 1.1 e 1.2:



Onde: ROO^\bullet e R^\bullet – radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A^\bullet – radical inerte.

Estes antioxidantes agem por meio da transferência de hidrogênio para o radical ROO^\bullet formando o radical fenoxil, este se torna estável e inerte por ressonância e perde sua capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO e JORGE, 2006).

As frutas, por conterem uma variedade de vitaminas e minerais essenciais, sempre foram consideradas como alimentos reguladores do metabolismo, ou seja, conservam e fortalecem o sistema imunológico, previne doenças degenerativas, aterosclerose, entre outras. Do ponto de vista das propriedades funcionais fisiológicas, esses alimentos têm

sido altamente recomendados pela sua riqueza em ácido L-ascórbico (vitamina C), ácido gálico, antocianinas, substâncias fenólicas, carotenóides, substâncias sulfuradas, fruto-oligossacarídeos, dentre muitos outros (SGARBIERI e PACHECO, 1999).

1.1.1.1 Ácido L-ascórbico

Dentre os antioxidantes o ácido L-ascórbico (vulgarmente conhecido como vitamina C) é o mais conhecido, possuindo inúmeras funções bioquímicas como a capacidade de reação com oxigênio singlete e outros radicais livres, participação do colágeno, síntese de alguns aminoácidos e auxílio na atividade de enzimas por meio da doação de elétrons (YARDIM-AKAYDIN *et al.*, 2003). O ácido L-ascórbico possui fórmula química $C_6H_8O_6$, cuja estrutura pode ser observada na Figura 1.1. Deste modo, pode ser verificado que a estrutura molecular do ácido L-ascórbico assemelha-se a de um monossacarídeo, apresentando extraordinário poder redutor devido à sua configuração dienólica $C(OH)=C(OH)$, redutona ou enediol (MURRAY *et al.*, 1997). O ácido L-ascórbico possui uma grande instabilidade e é facilmente hidrolisado em ácido dehidroascórbico, e essa degradação pode ocorrer devido ao calor, luminosidade, oxigenação e ao contato com enzimas oriundas de rompimento celular. Mas essa reação de oxidação é reversível e no interior dos tecidos o ácido dehidroascórbico se reduz em ácido L-ascórbico (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

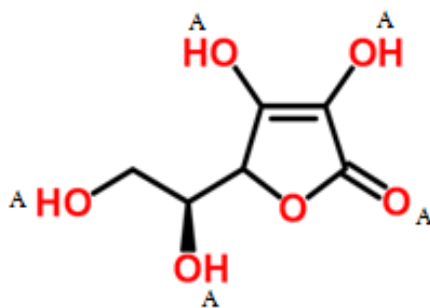


Figura 1.1. Estrutura molecular do ácido L-ascórbico. Sítios receptores de ligação de hidrogênio marcados com “A”. Fonte: <http://www.chemspider.com>

Variados teores de ácido L-ascórbico são encontrados em frutos tropicais (Tabela 1.5), os quais podem ser adequados de acordo com a necessidade de ingestão diária na dieta.

As fontes de ácido L-ascórbico nos frutos são classificadas em diferentes níveis: fontes elevadas (100 a 300 mg/100g); fontes médias (50 a 100 mg/100g); fontes baixas (25 a 50 mg/100g) e fontes muito baixas quando menores que 25mg/100g de polpa (FRANCO, 1999).

Tabela 1.5. Teores de ácido L-ascórbico de frutas tropicais.

Frutas	Ácido L-ascórbico (mg/100g)	Referência
Caju (<i>Anacardium occidentale</i>)	249,7±8,7	FRANCO, 1999
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i>)	1758,64±165,32	BATISTA <i>et al.</i> , 2000
Laranja (<i>Citrus Sinensis</i>)	84,03 ± 3,18	COUTO e C. BRAZACA, 2010
Cajá (<i>Spondias mombin</i>)	26,5±0,5	RUFINO <i>et al.</i> , 2011
Jamelão (<i>Syzygium cumini</i>)	112,0±5,8	RUFINO <i>et al.</i> , 2011

Além do seu papel nutricional, o ácido L-ascórbico é comumente utilizado como antioxidante nas indústrias para preservar o sabor e a cor natural de muitos alimentos, é usado como aditivo nutricional em bebidas, cereais matinais, conservas e refrigerantes enlatados e, por essa razão, o ácido L-ascórbico é manufaturado em larga escala (FIORUCCI, 2003). A produção mundial anual de ácido L-ascórbico em 1999 foi de 80.000 toneladas, das quais 50% são destinadas a indústria farmacêutica, 25% é utilizada no setor agroindustrial como aditivo, e ainda 15% na fabricação de bebidas, o restante vai para ração animal (ARAÚJO, 1999).

1.1.1.2 Ácido gálico

O ácido 3,4,5-tridroxibenzóico ($C_6H_2(OH)_3COOH$), também denominado de ácido gálico (Figura 1.2), ocorre naturalmente nos vegetais, em especial nas frutas. Este composto, amplamente distribuído no reino vegetal, apresenta uma estrutura fenólica tri-hidroxilada que lhes confere propriedade antioxidante (HERNÁNDEZ e PRIETO GONZÁLES, 1999), originária do metabolismo secundário, e é frequentemente um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

A separação e purificação desta biomolécula tem um grande interesse prático, pois ela tem várias características de importância biológica. Ela tem propriedades

antioxidante, anti-inflamatória (DU *et al.*, 2009; YILMAZ e TOLEDO, 2003), antifúngica, anti-tumor, diurético, depurativo, anti-séptico intestinal, bacteriostática e bactericida (CONDRAT *et al.*, 2010), tônico, anti-artrítica (ALBERTO *et al.*, 2001) e como transportadora de hidrogênio (SANTOS *et al.* 2010).

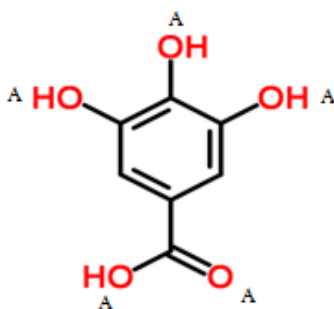


Figura 1.2. Estrutura química do ácido gálico. Sítios receptores de ligação de hidrogênio marcados com “A”. Fonte: <http://www.chemspider.com>

O ácido gálico também apresenta um importante papel como um inibidor do metabolismo de alguns micro-organismos (ação antimicrobiana). Devido a estas características atraentes associadas ao ácido gálico, esta biomolécula executa uma posição essencial na indústria farmacêutica no tratamento de problemas gástricos, anorexia, flatulência, gases, gota, doenças urinárias, reparador da pele hemostático (GIL-LONGO e GONZALEZ-VAZQUEZ, 2010, e sedativo, uma vez que é bem absorvido pelos seres humanos (DANESHFAR *et al.*, 2008). Além disso, o ácido gálico é comumente utilizado como antioxidante em aditivos alimentares (SERGEDIENE *et al.*, 1999).

Este ácido fenólico está presente em diversos produtos naturais, como casca de romã (LU *et al.*, 2007), vegetais (GIL-LONGO e GONZALEZ-VAZQUEZ, 2010), chás verde e preto (ZUO *et al.*, 2002), algumas plantas como *Plantae regnum* (CONDRAT *et al.*, 2010), e também em frutas tropicais, como mostrado na Tabela 1.6.

Tabela 1.6. Teores de ácido gálico em frutas tropicais.

Frutas	Ácido gálico (µg/100g)
Abacaxi (<i>Smooth cayenne</i>)	147,2 ± 10,1
Manga madura (<i>cv. Keaw</i>)	397,4 ± 13,1
Rambutão (<i>Nephelium lappaceum</i>)	231,4 ± 11,9
Goiaba (<i>cv. Klom sali</i>)	374,3 ± 13,1

Fonte: GORINSTEIN *et al.*, 1999

1.1.1.3 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes ao grupo dos flavonóides, amplamente disseminados na natureza. Como todos os outros flavonóides, as antocianinas possuem um esqueleto básico do tipo C₃C₆C₃, mas diferem dos demais por apresentarem coloração intensa, maior grau de oxidação e por serem glicosiladas. São responsáveis por inúmeras cores em plantas, como: laranja, vermelho, azul e violeta (FRANCIS, 2000).

Estruturalmente, as antocianinas são derivados glicosilados do cátion 2-fenil benzopirilium, também denominado de cátion flavílico, cuja estrutura encontra-se ilustrada na Figura 1.3 (JACKMAN *et al.*, 1987).

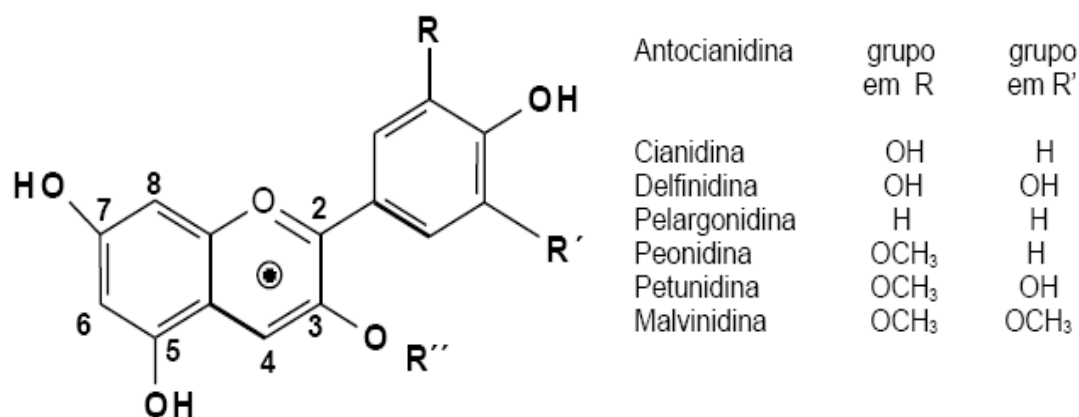


Figura 1.3. Estrutura genérica das antocianinas a partir do esqueleto das antocianidinas (agliconas). A substituição de R'' por uma ou mais unidades de açúcar na antocianidina resulta numa antocianina. Outras unidades de açúcares também podem ser ligadas pelos grupos OH nas posições 3,5 e 7.

Vinte e duas agliconas são conhecidas, das quais 18 são encontradas na natureza, mas somente seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes nos alimentos. Raramente agliconas livres ocorrem em plantas, pois estas quase sempre estão combinadas com açúcares que proporcionam maior estabilidade à molécula (FRANCIS, 2000).

As antocianinas (Tabela 1.7) são encontradas em frutas sendo todas derivadas das agliconas pertencentes a três pigmentos básicos: pelargonidinas, cianidina e delphinidina.

As antocianinas são pigmentos muito instáveis, podem ser degradadas no próprio tecido ou durante o processamento e a estocagem do alimento. Os principais fatores que influenciam a estabilidade destes compostos são: estrutura química, temperatura, atividade de água, pH, oxigênio, luz e presença de íons metálicos (FRANCIS, 2000).

Tabela 1.7. Antocianinas totais de Frutas Tropicais.

Frutas	Antocianinas Totais (mg/100g) – massa seca	Antocianinas Totais (mg/100g) – massa úmida	Malvidina (mg/100g) – massa seca
Guajiru (<i>Chrysobalanus icaco</i>)	958,0	104,0	—
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i>)	528,0	48,0	—
Jussara (<i>Euterpe edulis</i>)	2956,0	290,0	—
Jamelão (<i>Syzygium cumini</i>)	771,0	79,0	166,0

Fonte: BRITO *et al.*, 2007.

De acordo com Wesche-Ebeling *et al.* (1996) as variações de pH e incidência de luz são os fatores que mais contribuem para a degradação da cor das antocianinas, sendo maximizada pela associação destes fatores com o oxigênio. Outro importante fator relacionado à degradação das antocianinas é a interação destes pigmentos com o ácido L-ascórbico, causando a perda da cor e formação de pigmentos marrons.

1.1.1.4 Vanilina

O 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído, vulgarmente conhecido como vanilina (Figura 1.4), é um dos sabores e produtos antioxidantes mais valiosos devido à uma gama de aplicações industriais (KAYGORODOV *et al.*, 2010).

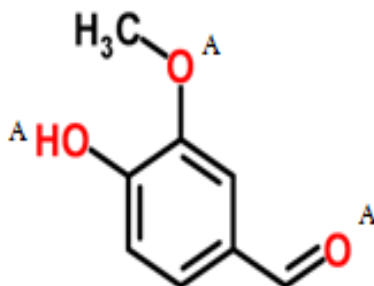


Figura 1.4. Estrutura química da vanilina. Sítios receptores de ligação de pontes de hidrogênio marcados com “A”. Fonte: <http://www.chemspider.com>

A vanilina é uma biomolécula relevante para diversas finalidades, cuja recuperação e purificação por processos de baixo custo e ambientalmente seguros ainda são de grande interesse e pouco explorados. Portanto, a vanilina é uma das substâncias mais apreciadas visando à criação de aromas artificiais em uma ampla escala de produtos comerciais. É atualmente utilizada na preparação de sorvetes, chocolates, bolos, refrigerantes, licores, produtos farmacêuticos, na indústria de perfumaria, e em nutracêuticos (NOUBIGH *et al.*, 2010; TARABANKO *et al.*, 2007), bem como na indústria de cosméticos com o objetivo de criar perfumes, mascarar odores desagradáveis, e na obtenção de produtos de limpeza (ESPOSITO *et al.*, 1997).

Além destas aplicações em aromas e fragrâncias, a vanilina é usada também como um intermediário químico na produção de produtos farmacêuticos e produtos de química fina para uso em biocidas (devido à sua estrutura fenólica) e produtos químicos especiais para aplicações técnicas (NOUBIGH *et al.*, 2010; HOCKING, 1997).

A vanilina é adicionada em muitos gêneros alimentícios e bebidas para melhorar seu sabor e qualidade. Ela pode ser adicionada na forma de um extrato de baunilha, que se assemelha a forma mais palatável, mas também caro, ou puro, no caso da vanilina sintética.

Segundo Lomascolo (1999), mais de 12.000 toneladas de vanilina eram produzidas por ano. Desse total, apenas 1% foram extraída de planta, sendo o restante sintetizado. Os custos da vanilina natural oscilam entre US\$ 1.200,00 e 4.000,00 por quilo, em contraste com o preço da vanilina sintética, cujo quilo custa menos de US\$ 15,00. Devido à escassez da vanilina em fontes naturais, a síntese e rotas complexas para a extração deste composto são exploradas (HOCKING, 1997), como por exemplo, a síntese da vanilina a partir do método do ácido sulfito. Também deve ser salientado que é possível a obtenção de vanilina realizando extrações com um álcool (HEARON, 1980).

1.1.1.5 Rutina

A rutina (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona-3-β-D-rutinosídeo ou quercetina-3-rutinosídeo), é um bioflavonóide não-tóxico sintetizado em plantas como um protetor contra a radiação ultravioleta e doenças (GHIASI *et al.*, 2010), cuja estrutura é mostrado na Figura 1.5.

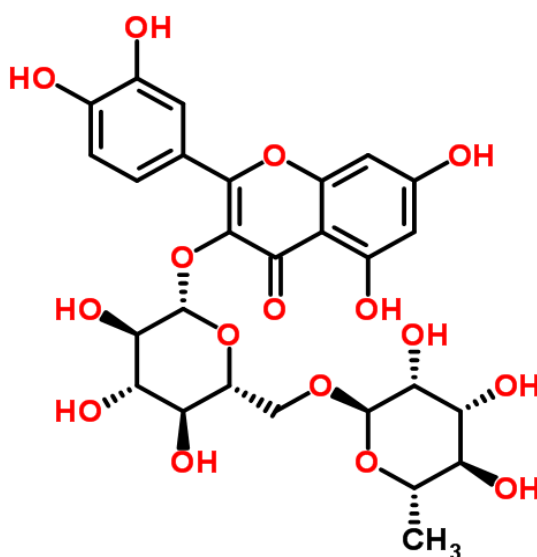


Figura 1.5. Estrutura química da rutina. Fonte: <http://www.chemspider.com>

A rutina é extraída da fava d'anta por laboratórios e comercializadas por empresas exportadoras como a Merck Nordeste, Sanrisil, Fitol e PVP, sendo utilizada como um eficaz vaso dilatador. Estas empresas exportam US\$ 20 milhões anuais de rutina. O mercado mundial consome 2.100 toneladas por ano da substância. A indústria vende por US\$ 25 o quilo de rutina para compor remédios, vitaminas e complementos alimentares.

O refinamento da rutina em subprodutos aumenta seu valor agregado em até 25 vezes (PAIVA, 1998).

Como composto flavonóide, a rutina têm recebido muita atenção, porque provou ser um antioxidante potente e têm importantes atividades biológicas, propriedades farmacológicas e medicinais (IACOPINI *et al.*, 2008). Este flavonóide é encontrado em diversas fontes de alimentos como uva, cebola, trigo, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como o vinho tinto e o chá preto (THOMSON *et al.*, 1999), e também em frutas tropicais, principalmente na acerola (*Malpighia emarginata* DC) , como mostra a Tabela 1.8.

Tabela 1.8. Teores de rutina em vários tipos de amostras de acerola.

Amostras	Rutina (mg/L)
Polpa	0,58±0,06
Acerola espremida	0,90±0,15
Acerola esmagada	1,05±0,10
Suco de acerola	1,71±0,02

Fonte: MEZADRI *et al.*, 2008.

A atividade antioxidante da rutina na acerola é um tema que vêm se destacando, mas poucos dados têm sido relatados. Uma grande variedade de métodos analíticos foram criados para determinação da rutina em vegetais (MEZADRI *et al.*, 2008). Até agora, os produtos mais comercializados de acerola no Brasil têm sido o próprio fruto, a polpa congelada e o suco pasteurizado. No entanto, novos produtos aparecem no mercado, tais como misturas de suco de acerola (caju, acerola e laranja), refrescos em pó e sumo concentrado (MARTINELLI, 1998).

Um grande número de frutas tropicais, como da acerola, contêm biomoléculas que exibem propriedades antioxidantes como as vitaminas, bioflavonóides e vários outros biocompostos.

1.2 Frutas Tropicais

Algumas frutas chamam a nossa atenção por possuírem sabores e odores inigualáveis. De acordo com Schottler e Hamatschek (1994), a atração por essas frutas é devida à sua aparência e sabor exótico. Assim, a produção, comércio e consumo de frutos tropicais exóticos, têm aumentado significativamente nos mercados nacionais e internacionais devido às suas propriedades sensoriais atraentes e um crescente reconhecimento de seu valor nutritivo e terapêutico.

O comércio mundial de frutas frescas é estimado para ganhar cerca de 20 bilhões de dólares a cada ano, e o Brasil tem um grande destaque neste mercado particular, uma vez que o país é o terceiro maior produtor de frutas tropicais em todo o mundo (MAIA *et al.*, 2009). A produção mundial de frutas tropicais vem crescendo em um ritmo considerável e a cada dia novos mercados são conquistados. No mundo a produção de frutas chega a ser superior a 540 milhões de toneladas. No Brasil, a fruticultura ocupa uma área de 2,5 milhões de hectares, com uma produção superior a 43 milhões de toneladas em 2009. Em Sergipe a produção é superior a 36 mil toneladas no ano de 2009 (IBRAF, 2012).

O Brasil tem-se destacado na produção mundial de frutas tropicais, principalmente devido a sua grande extensão territorial e clima favorável (GRANADA *et al.*, 2004). Na região Nordeste dentre as frutas tropicais nativas mais conhecidas destacam-se: cajá (*Spondias lutea L.*), umbu (*Spondias tuberosa Arruda Câmara*), seriguela (*Spondias purpurea L.*), mangaba (*Hancornia speciosa Muell*), pitanga (*Eugenia uniflora L.*), jaca (*Artocarpus integrifolia L.*), carambola (*Averrhoa carambola L.*), caju (*Anacardium occidentale L.*), graviola (*Annona muricata L.*), acerola (*Malpighia emarginata D.C.*), goiaba (*Psidium guajava L.*) e jamelão (*Syzygium cumini*).

Essas frutas são importantes devido às suas características antioxidantes associadas à sua ampla variedade de biomoléculas (ácido L-ascórbico, ácido gálico, rutina, antocianinas, dentre outras), as quais vêm despertando um crescente interesse nas áreas de alimentos e farmacêuticas. Dentre estas, a acerola, goiaba e o jamelão, vem se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia, devido à sua grande quantidade de biomoléculas, fontes naturais de antioxidantes.

1.2.1 Acerola

A acerola — *Malpighia emarginata* D.C. (Figura 1.6), pertencente à família *Malpighiaceae*, é originária da América Central e foi introduzida no Brasil na década de 50. É uma pequena fruta de cor vermelha, laranja ou roxa, que apresenta peso médio variando entre 2 a 10g e contém elevado teor de ácido L-ascórbico, variando de 1.000 até 4.000 mg/100g, em média (GONZAGA NETO *et al.*, 1999).

As indústrias alimentícias que utilizam frutas tropicais processavam no Brasil cerca de 34,40 mil toneladas de acerolas por ano, o que equivalia a 7,16% do total de frutas processadas. O processamento de acerolas gerou, aproximadamente, 18 mil toneladas de sucos e polpas por ano, concentrando-se esta produção na região nordeste (ASTN e APEX, 2001).

Neste sentido, o Nordeste brasileiro é um dos maiores produtores e exportadores do fruto no país, pois dispõem de condições climáticas ideais para o desenvolvimento da aceroleira que se adapta muito bem ao clima tropical, produzindo três ou mais safras durante o ano, concentradas principalmente na primavera e verão, que dependem da disponibilidade de água no solo. Além disso, a partir do 3º ou 4º ano do plantio, pode chegar a produzir acima de 40 kg de frutos/planta/ano, correspondendo a uma produtividade em torno de 16 t/ha (VIGLIO, 1993).



Figura 1.6. Aspecto do fruto da acerola em estágio maduro.

A fruta pode ser ingerida na forma natural, mas também em preparações como sucos, compotas, geléias, doces, entre outras. Alguns autores determinaram o conteúdo de vitamina C na acerola produzida no Brasil, tendo sido encontrados teores variando de 1040 mg/100g (LEME, 1973) a 1790 mg/100g de parte comestível (VISENTAINER *et al.*, 1997).

Segundo Soares *et al.* (2001), o fruto acerola apresenta a seguinte composição química em média: $1,34 \pm 0,03\%$ de ácido tânico (tanino); $1,14 \pm 0,11\%$ de pectato de cálcio (pectina); $1,27 \pm 0,05\%$ de proteína; $0,21 \pm 0,04\%$ de lipídios; $0,46 \pm 0,03\%$ de cinzas; $5,49 \pm 0,15\%$ de açúcares redutores; $2,76 \pm 0,16\%$ de amido e traços de fibra. Recentemente, muita atenção tem sido dada ao seu conteúdo em carotenóides e bioflavonóides com suas propriedades antioxidantes (MEZQUITA e VIGOA, 2000). Os carotenóides estão presentes em níveis entre 3,2 e 406,0 mg/kg (LIMA *et al.*, 2005). Mezadri *et al.* (2005) identificou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 17 pigmentos carotenóides da fruta acerola.

Diversos são os trabalhos encontrados na literatura enfocando os elevados teores de ácido L-ascórbico na acerola: seleção de plantas (MOURA *et al.*, 1997), método de extração (SANTINI JR. e NEVAREZ, 1955), estabilidade da polpa ou suco (GARDNER *et al.*, 2000), entre outros.

O teor de vitamina C e outras características atribuídas à qualidade da acerola, tais como coloração, peso e tamanho dos frutos, teor de sólidos solúveis totais e pH do suco, além de serem afetadas pela variabilidade genética dos pomares, sofrem influência de vários outros fatores, como precipitações pluviais, temperatura, altitude, adubação, irrigação e a ocorrência de pragas e doenças (NOGUEIRA *et al.* 2002).

Em relação aos flavonóides, os componentes principais do fruto da acerola são as antocianinas (37,9 – 597,4 mg/Kg) e flavonóis (70,0 – 185,0 mg/Kg) (LIMA *et al.*, 2003). Hanamura *et al.* (2005) identificou duas antocianinas (cianidina e pelargonidina) e um flavonol (quercetina) na fruta.

A cor vermelha da acerola, no estágio maduro, decorre da presença de antocianinas (SILVA, 1999). Silva (1999) cita que as principais antocianidinas presentes na acerola são a pelargonidina e cianidina. Paiva *et al.* (1999) relatam que em diferentes seleções de acerola os teores de antocianinas totais variaram de 1,97 mg/100g a 46,44 mg/100g. Freitas *et al.* (2006) citaram estudos que analisaram acerolas e polpas congeladas de acerolas que identificaram antocianinas derivadas de cianidina e pelargonidina, e o flavonol quercetina glicosilado nas concentrações de 17,6 mg/100g; 2,7 mg/100g e 5,36 mg/100g (base úmida) para a fruta, e 9,8 mg/100g; 1,1 mg/100 g e 3,2 mg/100g (base úmida) para a polpa.

Outro composto fenólico encontrado no fruto da acerola é a rutina. Mezadri *et al.* (2008) determinou os teores de rutina presente na polpa congelada e no fruto esmagado, e verificaram uma concentração 0,58 e 0,96 mg/L, respectivamente.

1.2.2 Jamelão

O jameleiro (*Eugenia jambolana* e atualmente *Syzygium cumini*) é uma árvore nativa dos trópicos, particularmente da Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar, que pode alcançar vários metros de altura (MARTINS *et al.*, 2002). Com a exploração territorial no século XV a planta foi introduzida em muitos países tropicais localizados na África e América Latina. No Brasil é encontrado em diversos estados das regiões Sudeste, Nordeste e Norte, entretanto pode também ser encontrada em alguns países como Estados Unidos, Argélia e Israel. A frutífera pertence à família das *Myrtaceae*, e é denominada popularmente de jameirão ou jambolão (MIGLIATO *et al.*, 2006).

O jameirão é um fruto do tipo baga que se assemelha à azeitona pequena (Figura 1.7). Possui forma ovóide e se torna roxa escura quando completamente madura. Sua pele é fina, lustrosa e aderente, já a polpa, também é roxa, carnosa e envolve um caroço único e grande. O sabor apesar de adstringente é agradável ao paladar e a cor apresenta grande impacto visual. Esta coloração é devida ao alto teor de pigmentos antociânicos, o que desperta o interesse pelos seus efeitos nutricionais e terapêuticos, associados à ação antioxidante (LAGO *et al.*, 2006).



Figura 1.7. Aspecto do fruto do jameirão (*Syzygium cumini*) em estágio maduro.

Brito *et al.* (2007) verificaram que entre as frutas tropicais o fruto jameirão incluiu a mais larga variedade de compostos antociânicos: delphinidina, cianidina, petunidina peonidina e malvidina, todos apresentando-se como diglicosídeos. O composto majoritário no jameirão foi delphinidina 3,5- diglicosídeo (256 mg/100g de peso seco), seguido por petunidina 3,5-diglicosídeo (245 mg/100g), a malvidina 3,5-diglicosídeo

(166 mg/100g), peonidina 3,5-diglicosídeo (75 mg/100g), e cianidina 3,5-diglicosídeo (29 mg/100g).

Segundo Lago *et al.* (2006) o fruto jamelão apresenta a seguinte composição química: cinzas, 0,34%; lipídeos, 0,30%; proteínas, 0,67%; carboidratos, 10,07%; fibras, 0,28%; umidade, 87,75%; frutose, 0,4%; glicose, 0,6%; antocianinas totais, 0,276%; substâncias pécticas, 0,245%; acidez titulável, 5,91%; sólidos solúveis, 9,00%; e pH, 3,9.

Em um estudo de diferentes sistemas para sequestrar o radical livre, observou-se que as cascas do fruto do jamelão apresentaram atividade antioxidante significativa, o que foi atribuído em parte às vitaminas antioxidantes, compostos fenólicos e taninos, e/ou antocianinas (BANERJEE *et al.*, 2005).

1.2.3 Goiaba

A Goiabeira, *Psidium guajava* L, pertencente à família das *Myrtaceae*, é originária da América Tropical, possivelmente entre o México e o Peru, onde ainda pode ser encontrada em estado silvestre. Sua capacidade de dispersão e rápida adaptação a diferentes ambientes possibilitaram a propagação desta *Myrtaceae* por amplas áreas tropicais e subtropicais do globo, sendo até considerada uma praga em algumas regiões (MENZEL, 1985).

O fruto da goiabeira, a goiaba (Figura 1.8), denominado na Espanha e nos Estados Unidos por “guayabo” e “guava”, respectivamente, é uma baga de forma arredondada ou ovalada, polpa de coloração branca ou avermelhada com numerosas pequenas sementes (JIMÉNEZ-ESCRIG *et al.*, 2001). Essa fruta de sabor e aroma agradáveis possui quantidade regular de ácidos, açúcares, e pectinas, além de taninos, flavonóides, óleos essenciais, alcoóis sesquiterpenóides e ácidos triterpenóides (IHA *et al.*, 2008).

Segundo Gongatti Netto *et al.* (1996), a goiaba é um dos frutos de maior importância nas regiões subtropicais e tropicais, não só devido ao seu elevado valor nutritivo, mas também pela excelente aceitação para o consumo *in natura* e grande aplicação industrial, além de se desenvolver em condições adversas de clima.



Figura 1.8. Aspecto do fruto da goiaba (*Psidium guajava* L.).

A produção brasileira nos últimos anos tem sido relativamente estável. Em 2001, a produção foi de 281.102 Toneladas, apresentando discreto aumento, chegando a atingir, em 2011, 342.528 Toneladas. No território nacional, a plantação de goiabas concentra-se, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste, as quais se configuram como as mais produtoras (IBGE, 2012). Vale ressaltar que a produção brasileira de goiaba destina-se quase que totalmente ao mercado interno que, nos últimos sete anos, vêm experimentando significativo aumento de oferta.

Esse fruto é bastante consumido na forma *in natura* (cultivares *Kumagai*, *Pedro Sato*, *Sassaoka* e *Ogawa*), no entanto a maior parte da produção brasileira é destinada à indústria para a produção de doce, suco, geléia, polpa congelada, entre outros. O processamento de goiaba para obtenção de polpa é uma atividade agroindustrial importante na medida em que agrega valor econômico à fruta, evitando desperdícios e minimizando as perdas que podem ocorrer durante a comercialização do produto *in natura* (FURTADO *et al.*, 2000). Além disso, esse produto é bastante utilizado como matéria prima para indústrias secundárias.

Vale destacar que a agroindústria brasileira é um dos principais segmentos da economia nacional, com importância tanto para abastecimento interno como para o desempenho exportador do País. Neste contexto, o processamento de produtos agrícolas tem gerado uma grande quantidade de subprodutos oriundos do tratamento industrial, a exemplo de semente e cascas de vegetais (SILVA FILHO *et al.*, 1999). No caso da goiaba utilizada na produção de sucos e doces são gerados, aproximadamente, 30% de seu peso em resíduos que é constituído principalmente por sementes, representando uma quantia estimada em 19.000 toneladas de resíduo descartado anualmente (CÔRREA *et*

al., 2005). Por serem estes subprodutos caracterizados frequentemente como potenciais poluidores ambientais, ações que minimizem o volume desses resíduos pode se apresentar como uma alternativa bem sucedida para a indústria de alimentos e bebidas (AMANTE *et al.*, 1999; HENNINGSSON *et al.*, 2004).

Vários estudos vêm demonstrando que este material ainda contém quantidades significantes de fitoquímicos, dentre os quais se destacam os polifenóis. Segundo Hassimotto *et al.* (2005), o teor de fenólicos totais em polpa de goiaba vermelha (124,0 mg/100g) foi menor do que o encontrado na pele desta fruta (420 mg/100g). Soong e Barlow (2004) relatam que os fenólicos totais de sementes de várias espécies de frutos, como manga, “longan, abacate, e jaca” foram maiores do que os da polpa. Em função da presença destes fitoquímicos, os resíduos agroindustriais de frutos apresentam-se como fonte potencial antioxidante, conforme demonstrado por Bocco *et al.* (1998) ao determinar a ação antioxidante de sementes de citrus; Wolfe *et al.* (2003) ao estudar o potencial antioxidante de casca de maçã; Shui e Leong (2006) ao investigar a ação antioxidante de resíduo de carambola; Mielnik *et al.* (2006) ao determinar a atividade antioxidante de sementes de uvas, Caetano *et al.* (2009) ao estudar a ação antioxidante de resíduo agroindustrial de acerola, entre outros.

Devido à grande variedade de biocompostos presentes nestas frutas tropicais, ao elevado valor econômico atribuído aos antioxidantes, o desenvolvimento de um processo recuperação simples, barato e compatível para a extração e determinação destas biomoléculas é, portanto, de grande importância e deve ser proposto.

1.3 Extração e Purificação de Biomoléculas

Para a aplicação de biomoléculas em setores industriais faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de extração e, dependendo do grau de pureza exigido da aplicação, um procedimento de purificação adequado deve ser desenvolvido. A extração é o passo mais importante em isolar os diferentes tipos de compostos bioativos de frutas. O método ideal de extração deve ser quantitativo, não destrutivo para a biomolécula e economicamente viável. Existem diversos métodos para a extração de compostos antioxidantes em vegetais e frutas. Muitos autores propõem métodos de extração, separação e identificação de biomoléculas a partir da biomassa ou matrizes

complexas que utilizam solventes orgânicos, tais como etanol (ZHANG *et al.*, 2013). Técnicas mais modernas, como a extração supercrítica (DIMITRIESKA-STOJKOVIC e ZDRAVKOVSKI, 2003; PANIWNYK *et al.*, 2001), extração assistida por micro-ondas (ZHANG *et al.*, 2009), micro-extração em fase sólida (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2008) e extração assistida por ultrassom (YANG e ZHANG, 2008).

A extração com solventes orgânicos é a forma tradicional da extração de compostos bioativos de tecidos de vegetais, essa técnica de extração depende em grande parte do tipo de solvente, agitação empregada para melhorar a solubilidade e eficiência do processo de transferência de massa. Normalmente, a extração convencional requer longo tempo de contato e muitas vezes com baixo rendimento. O método ainda é popular e amplamente utilizado porque foi bem estabelecido, já que é fácil de executar e barato para operar (YANG *et al.*, 2008a). Na extração com solventes orgânicos a frio ou a quente, o tipo de solvente utilizado depende da polaridade das biomoléculas, entretanto o processo é limitado devido à capacidade dos solventes em isolar a molécula alvo (MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997).

A extração com fluido supercrítico utiliza um fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico modificando as propriedades, como a densidade do fluido supercrítico sendo similar a dos líquidos e sua viscosidade com valores próximos aos determinados para os gases. Devido às alterações dos valores destas propriedades verifica-se a capacidade de difusão do fluido. O estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual o líquido e o gás são indistinguíveis entre si, apresentando assim características tanto de um gás como de um líquido (HERRERO *et al.*, 2006). O dióxido de carbono (CO₂) é o fluido mais utilizado devido à sua baixa temperatura (31,3°C) e pressão crítica (72,9 atm), entretanto, o CO₂ supercrítico (pela sua baixa polaridade) possui um menor efeito nas extrações de moléculas de alta polaridade, podendo ser solucionado com a adição co-solventes como metanol e etanol nos processos (RAVENTÓS *et al.*, 2002).

A utilização do ultra-som em processo de extração evoluiu para um rápido desenvolvimento, demonstrando uma gama de aplicações para a extração de metabólitos de plantas (KNORR, 2003), polissacarídeos (YANG *et al.*, 2008b), compostos fenólicos (PRASAD *et al.*, 2009), dentre outros. Inicialmente o ultra-som foi utilizado para limpeza de materiais, mas devido às suas propriedades, começou a ser aplicado para preparação de emulsão e suspensão, esterilização, desgaseificação de solventes e extração de plantas (BARBOZA e SERRA, 1992; CHEMAT *et al.*, 2011).

O ultra-som faz uso de fenômenos físicos e químicos que são fundamentalmente diferentes em comparação com técnicas convencionais aplicadas no processamento de extração oferecendo vantagens em termos de rendimento, produtividade e seletividade. As ondas ultra-sonoras de alta potência produzidas no banho de ultra-som causam mudanças físicas e químicas devidas à variação de pressão, produzindo cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (CHEMAT *et al.*, 2011).

Os principais fatores que interferem na cavitação no processo de ultra-som são: a intensidade e a frequência produzidas pelo ultra-som. Dependendo desses fatores a produção de bolhas pode ocorrer com tamanhos diferentes, podendo provocar maior ruptura na superfície dos sólidos, acelerar o aquecimento e aumentar o fenômeno de transferência de massa, fazendo com que o método seja mais ou menos eficiente (BREITBACH *et al.*, 2003).

No entanto, estes métodos alternativos de extração citados acima requerem geralmente condições mais drásticas, isto é, temperaturas e pressões elevadas, e eles também dependem de um equipamento mais sofisticado transformando a extração em um processo caro e complexo.

A escolha do processo de extração e purificação de algumas substâncias bioativas deve ser feita levando em consideração o grau de purificação necessário. 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, apesar de não ser ainda aplicado industrialmente. Pois, eles têm sido estudados em escala piloto com sucesso na extração de várias biomoléculas tais como enzimas (SOUZA *et al.*, 2010), alcalóides (FREIRE *et al.*, 2010), antibióticos (WANG *et al.*, 2010) e compostos de aromáticos (CLÁUDIO *et al.*, 2010). Este vasto leque de aplicações é justificado pela facilidade de aumento de escala do processo, e geralmente atinge elevada eficiência e rendimentos de extração (ALBERTSSON *et al.*, 1990).

1.3.1 Sistema Aquoso Bifásico

Os sistemas aquosos bifásicos são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel. Posteriormente,

pesquisadores como Ostwald e Hertel, e Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram sobre esses sistemas, porém, foi apenas com os trabalhos de Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação desta técnica para a partição/purificação de biocompostos (ALBERTSSON *et al.*, 1990; ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010).

De forma geral, os sistemas aquosos bifásicos são formados pela mistura de dois polímeros (SARAVANAN *et al.*, 2008) ou de um polímero e um sal (ZHAO *et al.*, 2011) acima de certas concentrações críticas e em equilíbrio resultando em duas fases imiscíveis, onde as duas fases líquidas são formadas contendo uma certa proporção de água e diversos solutos, como macromoléculas biológicas, podendo estar distribuídas desigualmente em cada fase (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). É também possível usar um solvente orgânico e um sal (REIS *et al.*, 2012), líquido iônico e açúcares (CHEN *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2011), líquido iônico e sais (GUTOWSKI *et al.*, 2003), e líquidos iônicos como um adjuvante no processo de separação (PEREIRA *et al.*, 2010). A Tabela 1.9 classifica as composições do sistema aquoso bifásico (SAB) em sete grupos, os quais são aplicados de acordo com a biomolécula a ser extraída e/ou purificada.

A aplicação do sistema aquoso bifásico (SAB) na separação de vários biocompostos tem sido estudada por diversos pesquisadores, porém a quantidade de reagentes químicos consumidos, como sais e polímeros, determinam a competitividade entre a extração com SAB e as outras técnicas de bioseparação (COIMBRA *et al.*, 2003).

Os SAB's formados por PEG + dextrana ou PEG + sais são amplamente utilizados, pela disponibilidade, por não serem tóxicos, possuir alta seletividade e possibilidade de reciclagem dos reagentes (FERREIRA *et al.*, 2009). Todavia, apresentam algumas limitações como a desnaturação de proteínas em altas concentrações de sais (SILVA e MEIRELLES, 2000).

Os sistemas compostos por solventes orgânicos (alcoóis) e sais (sais de potássio) têm sido usados para separação de biomoléculas, e apresentam como vantagem a baixa viscosidade, alta polaridade e a fácil recuperação dos alcoóis, enquanto que os sais podem ser recuperados através da eletrodialise ou precipitação, por tudo isto, o custo associado a estes sistemas é mais reduzido (OOI *et al.*, 2009).

Tabela 1.9. Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico.

<i>Grupos do SAB</i>	<i>Exemplos</i>
Dois polímeros não iônicos	Poli(etil)enoglicol (PEG)/Ficoll PEG/Dextrana PEG/Polivinil álcool Polipropilenoglicol (PPG)/dextrana Metil celulose/hidroxipropildextrana Ficoll/dextrana.
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 Metoxipoli(etil)enoglicol/fosfato de potássio PPG/glicose PEG/glicose PEG/sulfato de magnésio PEG/citrato de sódio
Líquido Iônico e composto de baixa massa molecular (Sal)	Líquido Iônico/fosfato de potássio
Líquido Iônico e composto de alta massa molecular	Líquido Iônico/Açúcares
Solventes orgânicos e compostos de baixa massa molecular (Sal)	Alcoóis/fosfato de potássio

Fonte: Pessoa Junior e Kilikian, (2005) (adaptado).

Na aplicação industrial o principal sal utilizado é o fosfato devido ao seu baixo custo e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas, porém altas concentrações deste sal podem acarretar problemas no equilíbrio do SAB (YAN-MIN *et al.*, 2010).

Algumas biomoléculas extraídas pelos sistemas aquosos bifásicos são descritas na Tabela 1.10. Além disso, esta técnica de separação vem sendo aplicada em outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI *et al.*, 2003). São também utilizados na remoção de íons metálicos (GRABER *et al.*, 2000), compostos aromáticos de óleo cru (WAZIRI *et al.*, 2003) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS *et al.*, 1998).

Tabela 1.10. Exemplos de diferentes componentes utilizados na formação de sistema aquoso bifásico para a extração de diversas biomoléculas.

Componente 1	Componente 2	Biomolécula	Referência
Líquido Iônico	Carboidratos	β -caroteno	Freire <i>et al.</i> , 2011
Líquido Iônico	K_3PO_4	β -caroteno	Louros <i>et al.</i> , 2009
Alcoóis	Sais de potássio	Antioxidantes	Reis <i>et al.</i> , 2012
Alcoóis	K_2HPO_4 e Na_2HPO_4	Rodamina B	Wang <i>et al.</i> , 2011
Etanol	$(NH_4)_2SO_4$	Ácido litospérmico B	Guo <i>et al.</i> , 2012

Diferentes modelos termodinâmicos têm sido desenvolvidos para a modelagem de SAB. Dentre estes o modelo da equação virial, baseada no conhecimento da pressão osmótica de um solvente, NRTL (*Non Random Two Liquid*) e o de Wilson. Estes modelos são frequentemente utilizados para correlação e predição do equilíbrio de SAB constituído por polímero e sal (ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010). Devido ao alto teor de água, a representação gráfica dos dados termodinâmicos do SAB é geralmente feita por meio de diagramas retangulares (Figura 1.9). A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal (x), e o teor do outro componente, no eixo vertical (y). A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

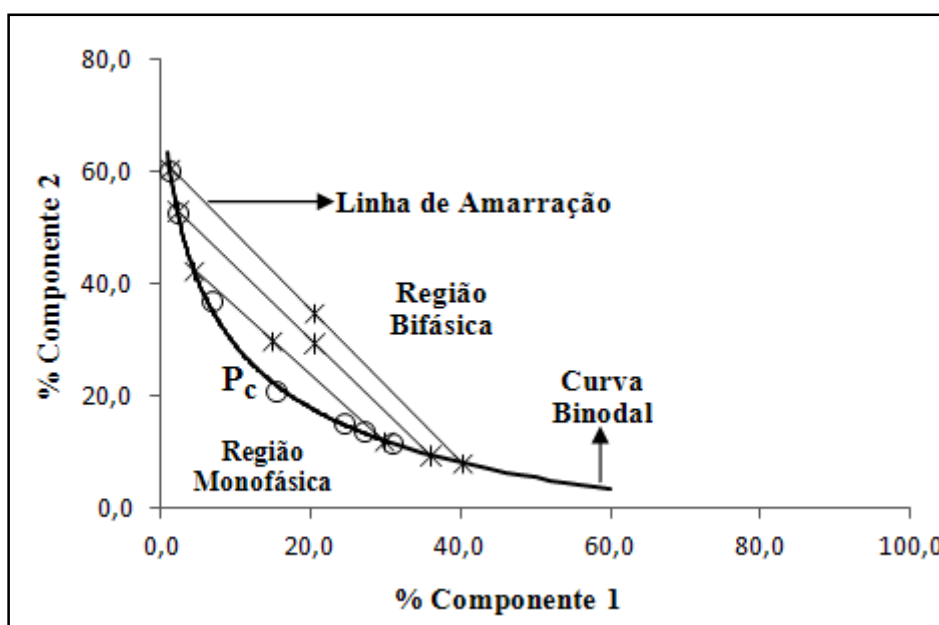


Figura 1.9. Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio.

Utilizando estes diagramas podemos obter em quais composições globais o sistema é monofásico ou bifásico, sendo estas duas regiões demarcadas por uma linha denominada curva binodal. Também são representadas as linhas de amarração ou do inglês *Tie-Lines* (TL), que são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases de topo e fundo com a mesma composição final, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA e LOH, 2006). Outra particularidade dos diagramas de fases é o ponto crítico (Pc), onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).

O comprimento da linha de amarração (usualmente referido como TLL do inglês *Tie Line Length*) é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição. De acordo com Malpiedi *et al.*(2009), o aumento da TLL ocasiona uma diminuição do volume livre na fase de fundo do sistema, promovendo a partição da proteína para a fase de topo. Segundo Silva e Loh (2006), o comprimento da linha de amarração pode ser calculado por meio da equação 1.3.

$$TLL = [(\Delta C_1)^2 - (\Delta C_2)^2]^{0,5} \quad (1.3)$$

onde, ΔC_1 e ΔC_2 são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente.

As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, pressão, temperatura e composição. Mas, como as duas fases dos SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

A distribuição desigual da biomolécula entre as duas fases é resultante de um complexo balanço de interações entre componente 1 – biomolécula, componente 2 – biomolécula, componente 1 – componente 2, componente 1 – água, componente 2 – água e biomolécula – água presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio

(LUECHAU *et al.*, 2010). De acordo com Mageste *et al.* (2009), a distribuição de biomoléculas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição (K), definido pela equação 1.4:

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (1.4)$$

onde, C_T e C_F são, respectivamente, as concentrações da biomolécula nas diferentes fases (T= topo ou F= fundo).

Entretanto, os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos ainda não são entendidos por completo. Segundo Johansson *et al.* (2008), a partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos pode ser descrita com base na repulsão entrópica ($\log K_S$), interações eletrostáticas ($\log K_{el}$) e hidrofóbicas ($\log K_{hy}$), e a força motriz eletroquímica proveniente do sal do sistema, sendo a partição total (K_{tot}) dada pela equação 1.5:

$$\log K_{tot} = \log K_S + \log K_{el} + \log K_{hy} + \log K_{salt} \quad (1.5)$$

Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química, tipo e concentração dos componentes formadores do SAB, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica, pH, temperatura e a adição de sais inorgânicos como eletrólitos (CHAIWUT *et al.*, 2010).

Assim, a adição de novos sais e a variação do pH e temperatura têm sido alternativas que podem corroborar com a partição das biomoléculas. A adição de sais, como cloreto de sódio (NaCl), pode aumentar a diferença de hidrofobicidade entre as fases, assim a partição de biomoléculas depende do balanço hidrofobicidade/hidrofilicidade e a carga dos compostos (GÜNDÜZ e KORKMAZ, 2000). Zaslavsky *et al.* (1978) descreveram níveis de concentração molar de NaCl correlacionados com a força motriz que controla o processo de partição: abaixo de 0,1 M de NaCl, a partição é determinada pela carga e o balanço de hidrofobicidade/hidrofilicidade; entre 0,1 e 0,2 M de NaCl, a partição é altamente depende da carga do composto e, acima de 0,2 M, o balanço de hidrofobicidade/hidrofilicidade governa o processo, portanto o NaCl como também

outros eletrólitos podem contribuir para o aumento ou diminuição da recuperação de biocompostos que se deseja purificar (ROSA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2002).

Mokhtarani *et al.* (2008) observaram que o aumento da concentração de sal no sistema aquoso bifásico formado por PEG + Na₂SO₄ + água, aumenta a força iônica do sistema e consequentemente o antibiótico ciprofloxacina tem tendência a particionar-se para fase rica em sal (fase de fundo). Ferreira *et al.* (2011) estudaram o efeito de diferentes eletrólitos na partição de diversas moléculas, em sistemas aquosos bifásicos formado por PEG 8000 e sulfato de sódio e observaram que o aumento da concentração de NaCl permitiu o aumento do coeficiente de partição de aproximadamente 1,6 (sem adição de NaCl) a 2,2 (com cerca de 5,0% de NaCl). Segundo Ooi *et al.* (2009), quando a lipase possui carga negativa a adição do NaCl cria um potencial eletrostático que a particiona fortemente para a fase de topo e melhora a sua recuperação. Em oposição, estudos realizados por Yang *et al.* (2010) mostraram que o aumento da concentração do NaCl em sistema aquoso bifásico, composto por 27% de PEG 1000 e 13% de NaH₂PO₄, não foram significantes na partição da molécula esterase.

Li *et al.* (2010) investigaram a influência de diferentes sais (KCl, KBr, KI, K₂SO₄, NaCl, Na₂SO₄, NH₄Cl e (NH₄)₂SO₄) e concentrações (10 a 80 mM) na partição da lipase pura em sistema aquoso bifásico. Seus resultados mostraram que os efeitos do sal fosfato na partição da lipase são muito melhores em comparação ao sódio e amônio, isso devido a diferença de potencial elétrico entre as duas fases. Segundo Rawdkuen *et al.* (2011), a efetividade do sal é determinada principalmente pela natureza do componente e segue a seguinte ordem da série de Hofmeister: para ânions SO₄²⁻ > HPO₄²⁻ > CH₃COO⁻ > Cl⁻ e para cátions NH₄⁺ > K⁺ > Na⁺ > Li⁺ > Mg²⁺ > Ca²⁺.

Comparado com os sistemas de extrações tradicionais contendo solventes orgânicos, o SAB é um sistema de extração líquido-líquido mais complexo. Ambas as fases do sistema aquoso bifásico é formada por uma mistura ternária dos constituintes do sistema (componente 1 e componente 2) e água. Os fatores que influenciam não só afetam a partição da biomolécula, mas também afetam a formação do SAB (WANG *et al.*, 2010). A Figura 1.10 mostra a influência do tipo de sal, álcool e da molécula alvo no efeito hidrofílico, enquanto isso, o pH também afeta a sua partição para o meio hidrofílico e/ou hidrofóbico, alterando as propriedades da carga da biomolécula alvo. De acordo com Wang *et al.* (2010), o efeito do pH sobre a partição da molécula alvo é principalmente devido ao seu efeito sobre a forma da carga elétrica da biomolécula (positivo/negativo/neutro), pois a alteração da forma da carga elétrica da biomolécula

irá afetar a sua hidrofobicidade/hidrofilicidade e influenciar na sua solubilidade. Já as concentrações de sal e álcool em uma determinada temperatura produzem um efeito sobre a solubilidade da biomolécula, alterando as composições dos constituintes de ambas as fases.

A substância com alta hidrofobicidade é mais fácil de ser excluída da fase rica em sal para a fase rica em álcool. O efeito *salting-out* é a força motriz para a formação do SAB e a partição desigual da molécula alvo para a fase de topo. Portanto, a biomolécula alvo pode particionar-se para a fase rica em álcool, na sua forma catiônica hidrofilica (WANG *et al.*, 2010).

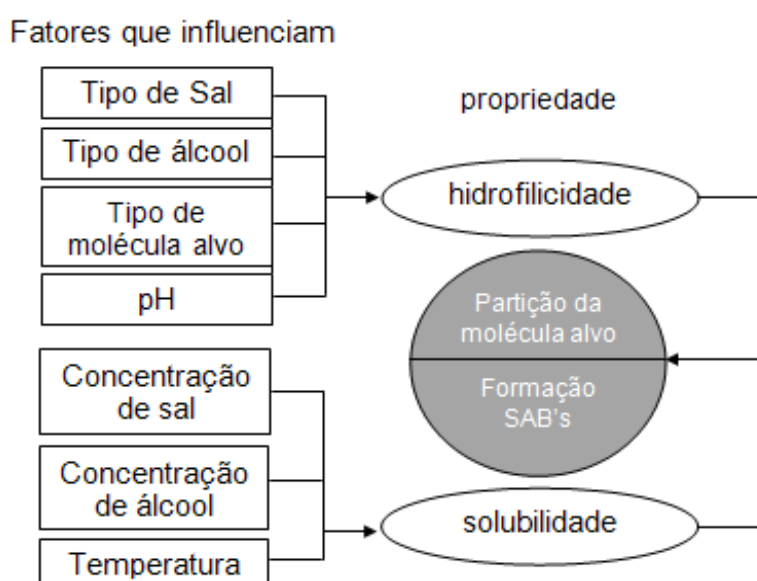


Figura 1.10. Fatores que influenciam o Sistema Aquoso Bifásico (SAB). Fonte adaptada: WANG *et al.*, 2010.

Muitos pesquisadores investigam a correlação do pH em sistemas aquosos bifásicos. A concentração hidrogeniônica afeta a transferência das biomoléculas, porque estes biocompostos contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes pK_a , resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da biomolécula pode modificar o potencial elétrico, bem como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema. Todos estes processos que ocorrem com a biomolécula modificam sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição. O pH também pode modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal ou o comprimento das linhas de amarração (SILVA e LOH, 2006).

O efeito da temperatura no SAB varia de acordo com o tipo dos componentes. Sistemas PEG e dextrana quando submetidos a temperaturas elevadas necessitam de uma maior concentração dos polímeros para que haja a separação das fases, por este motivo este tipo de sistema normalmente é submetido a temperaturas inferiores a ambiente. Já para sistema PEG e sal o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração do PEG na fase de topo e conseqüentemente ocorre a redução da concentração do polímero na fase de fundo (PESSOA-JUNIOR e KILIKIAN, 2005). De acordo com Coimbra *et al.* (2003), sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido a instabilidade inerente à região do ponto crítico. A influência da temperatura nos sistemas aquosos bifásicos tem relação direta com o tipo de biomolécula que será empregada. Portanto, o efeito da temperatura na extração depende muito da biomolécula a ser particionada. Wang *et al.* (2010) apresentam um aumento de até 5% na eficiência de extração de tetraciclina quando a temperatura aumenta em sistemas formados por 2-propanol e sulfato de amônia.

A miscibilidade dos alcoóis metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol com água também foram estudados por Wang *et al.* (2010) e observaram que estes alcoóis miscíveis em água também podem formar SAB com sais cosmotrópicos, tais como Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , Na_2CO_3 , K_2CO_3 , K_3PO_4 .

Os principais efeitos que podem ocorrer no SAB são: o volume de exclusão e o efeito *salting out* (Figura 1.11). O efeito de volume de exclusão é ocasionado pelo aumento da massa molar ou concentração do polímero, que ocupa os espaços intersticiais da fase de topo ocasionando a diminuição da solubilidade e aumento da viscosidade da biomolécula na fase polimérica, respectivamente (RAWDKUEN *et al.*, 2011). O efeito *salting out* deve-se ao aumento da concentração do sal, resultando na diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase de fundo e conseqüentemente o aumento da sua partição para a fase de topo (BABU *et al.*, 2008). Segundo Wang *et al.* (2010), o efeito *salting-out* dos sais pode levar à exclusão de pequenas moléculas de alcoóis miscíveis em água.

Ribeiro *et al.* (2007) notaram a diminuição do coeficiente de partição utilizando diferentes massas molares de PEG (300 à 1500) na purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). O aumento da massa molecular do PEG proporcionou o aumento da G6PD na fase de fundo do sistema, sugerindo uma maior hidrofobicidade desta enzima.

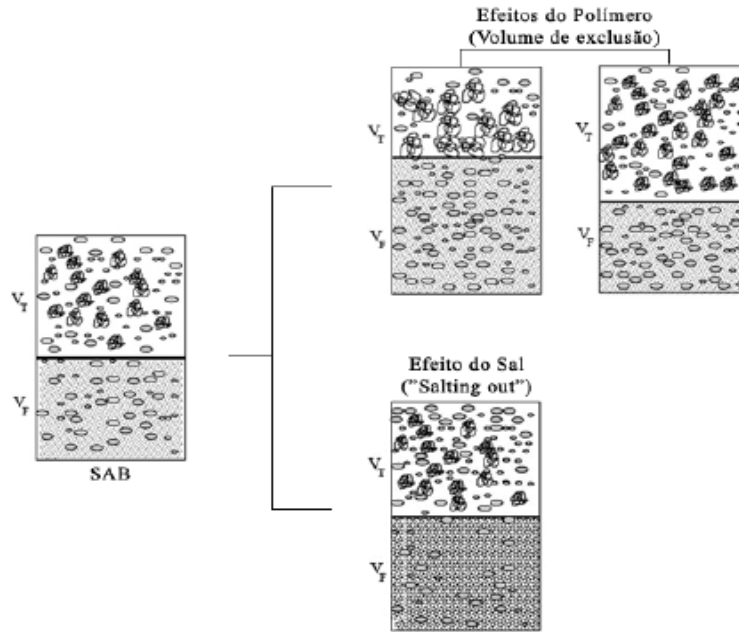


Figura 1.11: Representação esquemática da partição dos biocompostos no SAB: (X) Polímero; (○) Biomolécula; (●●●) Sal; V_T : volume da fase de topo; V_B : volume da fase de fundo. Fonte: BABU *et al.*, 2008 (adaptado).

Oliveira *et al.* (2001) realizaram a partição da G6PD em sistema aquoso bifásico formado por PEG e o sal citrato, variando a massa molecular e concentração do polímero bem como a concentração do sal. Os resultados obtidos mostraram que o maior coeficiente de partição, $K = 184$, foi obtido com extrações conduzidas com 22% de PEG 400 e 20% de citrato. Sendo assim, de todas as variáveis testadas a baixa massa molar do PEG associada à elevada concentração do sal citrato favoreceram a transferência da biomolécula para a fase de topo no sistema aquoso bifásico (SAB).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar e utilizar sistemas aquosos bifásicos formados por álcoois (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4 - solução tampão) na extração de antioxidantes encontrados em frutas tropicais da região Nordeste do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- ◆ Construir curvas binodais utilizando alcoóis: metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol e sais de potássio: K_3PO_4 , K_2HPO_4 e tampão (KH_2PO_4/K_2HPO_4);
- ◆ Ajustar modelo matemático proposto por Merchuck para as curvas binodais nos sistemas formados por alcoóis e sais de potássio determinados;
- ◆ Estudar e otimizar o processo de extração de antioxidantes como ácido L-ascórbico, vanilina, rutina, ácido gálico, malvidina nos sistemas modelos formados por alcoóis e sais de potássio;
- ◆ Estudar o processo de extração de ácido gálico nos sistemas modelos e reais formados por PEG e sais de potássio.
- ◆ Estudar a extração de antioxidantes, como ácido L-ascórbico, vanilina, rutina, ácido gálico, malvidina, presentes nas frutas tropicais (acerola, goiaba e jamaelão), nos sistemas aquosos bifásicos propostos;
- ◆ Estudar a partição de rutina da acerola em extrações convencionais utilizando solventes a frio e por ultra-som.

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III, IV, V, VI e VII

Os capítulos III, IV, V, VI e VII são apresentados em forma de artigos científicos, e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Estes capítulos trazem uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões de cada etapa.

No primeiro artigo (Capítulo III – “Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds”), foram estudados a formação e o uso de sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis/sais de potássio para extrair o ácido L-ascórbico e a vanilina como um modelo para antioxidantes a partir de resíduos de alimentos e outras fontes. Este artigo está publicado no periódico *Food Chemistry*, v. 135, p. 2453–2461, 2012. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.010.

O segundo artigo (Capítulo IV – “Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems”) avalia as melhores condições de extração de rutina a partir de resíduos de acerola utilizando sistema aquoso bifásico. Este artigo foi submetido ao periódico *Separation Science and Technology*.

O terceiro artigo desta tese (Capítulo V – “Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied to the extraction of gallic acid from guava”) estudou os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) constituídos por sal fosfato de potássio + álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) ou polietileno-glicol (1500, 4000 e 8000 g/gmol) para extrair o ácido gálico em resíduos da goiaba. Este artigo será submetido ao periódico *Food Research International*.

O quarto artigo (Capítulo VI – “Rutin extraction from acerola residue assisted by ultrasound combined with biphasic aqueous system”) avalia a eficiência de extração de rutina a partir de resíduos da acerola empregando vários métodos de extração (convencional, assistido por ultra-som e sistema de duas fases aquosas). Este artigo será submetido ao periódico *Ultrasonics Sonochemistry*.

O quinto artigo desta tese (Capítulo VII – “Recuperação de compostos antioxidantes a partir de resíduos da fruta jamelão: Extração de malvidina usando sistema de duas fases aquosas formados por alcoóis e sais de fosfato de potássio”) foi estudado a extração e identificação da malvidina e dos fenóis totais de resíduos do jamelão utilizando sistemas de duas fases aquosas formados por álcool-sal fosfato de potássio. Este artigo será submetido ao periódico *Química Nova*.

Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds

Igor A. O. Reis^a, Samuel B. Santos^a, Ludmila A. Santos^a, Naiana Oliveira^a, Mara G. Freire^b, Jorge F. B. Pereira^b, Sónia P. M. Ventura^b, João A. P. Coutinho^b, Cleide M. F. Soares^{a,c}, Álvaro S. Lima^{a,c,*}

Food Chemistry 135 (2012) 2453–2461

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

^bDepartamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

^cInstituto 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

A single-step selective separation of two food additives was investigated using alcohol-salt aqueous two-phase systems (ATPS). The selective partitioning of two of the most used additives from a processed food waste material, vanillin and L-ascorbic acid, was successfully accomplished. The results obtained prove that alcohol-salt ATPS can be easily applied as cheaper processes for the selective recovery of valuable chemical products from food wastes and other sources.

As a first approach, the phase diagrams of ATPS composed of different alcohol + inorganic salt + water were determined at 298 (\pm 1) K and atmospheric pressure. The influence of methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol and K_3PO_4 , K_2HPO_4 or KH_2PO_4/K_2HPO_4 in the design of the phase diagrams was addressed. After the evaluation of the phase diagrams behavior, the influence of the phase forming constituents was assessed towards the partition coefficients and recovery percentages of vanillin and L-ascorbic acid among the coexisting phases. Both model systems and real processed food waste materials were employed. Using these ATPS as partitioning systems it is possible to recover and separate vanillin, that migrates for the alcohol-rich phase, from L-ascorbic acid, that preferentially partitions for the salt-rich phase.

Keywords: food waste, selective separation, aqueous two-phase system, alcohol, inorganic salt, flavor, antioxidant, L-ascorbic acid, vanillin

1. Introduction

"Roughly one-third of the edible parts of food produced for human consumption gets lost or wasted globally, which is about 1.3 billion ton per year" is one of the main highlights described in the report "Global Food Losses and Food Waste – Extent, Causes and Prevention" presented recently by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Gustavsson, Cederberg, Sonesson, van Otterdijk, & Meybeck, 2011). The management of these food wastes is becoming extremely difficult due to legislative restrictions on landfill. These are however an incredible source of raw materials or added-value compounds and there is, therefore, the need to develop new recovery and reuse technologies, along with the development of sustainable

ideas/technologies/processes to avoid those disposals or, at least, to restrain the loss of added-value compounds attached to these wastes.

Processed food that has passed its validity time is an immense source of priceless and valuable chemical compounds, where different sugars, fats, flavors, and antioxidants are included. Taking this into account, this work aims at the development of a sustainable and economical process for the recovery of valuable products from food wastes, namely flavors and antioxidants.

An antioxidant compound can be defined as a substance that, when present in low concentrations compared to that of the oxidizable substrate, significantly delay or inhibit the oxidation of that substrate (Atoui, Mansouri, Boskou, & Kefalas, 2005; Moreira & Mancini Filho, 2003). The 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde, commonly known as vanillin, is one of the most valuable flavor and antioxidant products obtained from waste sources (Kaygorodov, Chelbina, Tarabanko, & Tarabanko, 2010). Indeed, vanillin as a natural flavor, occupies a prominent market place and is commonly used in the preparation of ice creams, chocolates, cakes, soft drinks, pharmaceuticals, and liquors, in the perfumery industry, and in nutraceuticals (Noubigh, Mgaidi, & Abderrabba, 2010; Ranadive, 1994; Tarabanko, Chelbina, Sokolenko, & Tarabanko, 2007). Since this product has a large range of applications, the development of new techniques for its separation and purification, while keeping unchanged its functional characteristics, is still ongoing. Some publications have demonstrated different approaches to perform the separation of vanillin from different matrices (Converti, Aliakbarian, Domínguez, Bustos-Vázquez, & Perego, 2010; Hocking, 1997; Tarabanko, Chelbina, Sokolenko, & Tarabanko, 2007). L-Ascorbic acid is the main biologically active form of Vitamin C. This chemical compound is mostly present in plant cells where it plays a crucial role in their growth and metabolism. As an effective antioxidant, L-ascorbic acid has the capacity to eliminate several reactive oxygen species, acts as a cofactor maintaining the activity of a number of enzymes, appears to be the substrate for oxalate and tartrate biosynthesis, and contributes for the stress resistance (Arrigoni & De Tullio, 2002; Davey, et al., 2000; Klein & Kurilich, 2000; Lee, et al., 2004). Also, given the essential role played in the human diet, L-ascorbic acid (E300) and its salt derivatives (E301-303) are commonly used as food additives due to their antioxidant and flavor enhancing properties. Due to the high economical value attributed to vanillin and L-ascorbic acid, the development of a simple, cheap and compatible recovery process from food wastes is thus of utmost importance.

Aqueous two-phase systems (ATPS) are vital techniques used for the extraction, or even purification, of several compounds and biomolecules, due to their versatility, high effectiveness, high yield, improved degree of purification, selectivity, low cost and technological simplicity. Moreover, ATPS usually allow the combination of the recovery and purification steps (Cláudio, Freire, Freire, Silvestre, & Coutinho, 2010; Malpiedi, Romanini, Picó, & Nerli, 2009). ATPS are generally described as two aqueous liquid phases that are immiscible at critical concentrations of the phase forming components. In the past decades, these systems have been widely applied in the separation/purification of proteins, enzymes, antibiotics, among other biomolecules of interest (Albertsson, 1986; Lima, Alegre, & Meirelles, 2002; Wang, Han, Xu, Hu, & Yan, 2010). To promote the formation of ATPS, several compounds can be used, such as different polymers (Azevedo, et al., 2009; Silva & Meirelles, 2000), inorganic salts (Lima, Alegre, & Meirelles, 2002; Silva, Coimbra, Rojas, & Teixeira, 2009; Souza, Barbosa, Zanin, Lobão, Soares, & Lima, 2010), sugars (Chen, Meng, Zhang, Zhang, Liu, & Yang, 2010; Wu, Zhang, Wang, & Yang, 2008; Wu, Zhang, & Wang, 2008), and more recently, ionic liquids (Freire, et al., 2012; Gutowski, et al., 2003; Neves, Ventura, Freire, Marrucho, & Coutinho, 2009; Ventura, Neves, Freire, Marrucho, Oliveira, & Coutinho, 2009). However, several of these ATPS forming components present some crucial disadvantages, when the objective is to apply them as separation systems for products that can easily suffer irreversible chemical alterations, and lose thus their main characteristics (for example, their antioxidant capacity). The high viscosity of polymer-based systems, the low window of potential ATPS based in sugars, and the high cost of ionic liquids, are some of the additional disadvantages that should be taking into account for a number of ATPS (Ooi, et al., 2009). Thus, in this work, the use of polar hydroalcoholic ATPS was considered (Broinizi, et al., 2007; Roesler, Malta, Carrasco, Holanda, Sousa, & Pastore, 2007; Wang, Han, Xu, Hu, & Yan, 2010). These systems have already shown to be successful in the separation of enzymes, antibiotics, and nucleic acids (Broinizi, et al., 2007; Louwrier, 1999).

In this work, four alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and three salting-out ionic species (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and KH_2PO_4/K_2HPO_4) were studied through the formation of ATPS. Their phase diagrams, tie-lines and tie-line lengths were determined at 298 K and atmospheric pressure. Subsequently, these systems were evaluated toward their application as liquid-liquid separation processes for two antioxidants: vanillin and L-ascorbic acid. The results gathered highlight a selective

partitioning of both antioxidants, while maintaining their main chemical characteristics unchanged. Thus, it is possible to realize that the application of these alcohol-salt-based ATPS can be promising techniques for the extraction of valuable compounds from simple or even more complex sources, such as food wastes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and potassium phosphate (K_3PO_4) were purchased at Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The alcohols have purities higher than 99 %. The phosphate salts present a purity level higher than 98 wt %. The L-ascorbic acid (> 98 wt %) was acquired at Labsynth (São Paulo, Brazil) and vanillin (> 99 wt %) was purchased at Sigma-Aldrich. Ultrapure water, double distilled, passed by a reverse osmosis system and further treated with a Milli-Q plus 185 water purification apparatus, was used.

The vanilla diet pudding Dr. Oetker was purchased at a regular supermarket in Aracaju, Brazil (see ("<http://www.oetker.com.br/?actA=2111&produtoID=138>,")).

2.2. Phase diagrams and tie-lines

The ATPS were formed using aqueous solutions of alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) at 80 wt % and distinct aqueous solutions of inorganic potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and the phosphate buffer solution KH_2PO_4/K_2HPO_4 - Henderson-Hasselbalch equation equivalents = 1.087) at *circa* 40 wt %. The phase diagrams were determined through two different experimental methodologies well described in literature, the cloud point titration method (Merchuck, Andrews, & Asenjo, 1998; Neves, Ventura, Freire, Marrucho, & Coutinho, 2009; Ventura, Neves, Freire, Marrucho, Oliveira, & Coutinho, 2009; Ventura, Sousa, Serafim, Lima, Freire, & Coutinho, 2011 in press) and the turbidometric titration method ("Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols (Methods in Biotechnology) (Ed.: R. Hatti-Kaul), Humana Press, Totowa, 2000.,"; Freire, et al., 2012) at (298 ± 1) K and atmospheric pressure.

The tie-lines (TLs) were obtained using a gravimetric method originally applied by Merchuck and co-workers (Merchuck, Andrews, & Asenjo, 1998) and already validated in previous studies (Neves, Ventura, Freire, Marrucho, & Coutinho, 2009; Ventura,

Neves, Freire, Marrucho, Oliveira, & Coutinho, 2009). Each tie-line (TL) was determined by the application of the lever-arm rule. For that purpose, the experimental solubility curves were correlated using the following Equation (1),

$$Y = A \exp[(B X^{0.5}) + (C X^3)] \quad (1)$$

where Y and X , are respectively, the alcohol and salt mass fraction percentages, and A , B and C are the regression constants.

2.3. Partitioning of antioxidants

The partitioning systems for L-ascorbic acid were prepared using graduated centrifuge tubes by weighing the appropriate amounts of alcohol (at *ca.* 50 wt %), inorganic salt (at *ca.* 15 wt %) and L-ascorbic acid (2.8 mg). To prepare the vanillin partitioning systems, vials with the same weight fractions of alcohol and inorganic salt were prepared. An aqueous solution of vanillin (concentration of *ca.* 1.0 g.dm⁻³) was used as the aqueous phase. Then, the mixtures were gently stirred and centrifuged at 3,000 g for 10 minutes. The extraction systems were placed at (298 ± 1) K, for at least 18 h, to reach the equilibrium and the consequent and complete partitioning of the antioxidants. The vials were closed during this period to avoid the alcohol vaporization. Finally, both phases were carefully separated and weighted, the volume of each phase was measured, and the biomolecules were quantified in each one of the phases. Their quantification was performed in triplicate being the final concentrations reported the average of the three assays (accompanied by the respective standard deviations).

The quantification of L-ascorbic acid was performed using the volumetric Tillman's method (Lutz, 2008), which is based on the oxidation of 2,6-dichlorophenolindophenol-sodic (DCPIP). The vanillin was quantified through UV-spectroscopy, using a SHIMADZU UV-1700, Pharma-Spec Spectrometer, at two different wavelength values, namely 280 nm and 347 nm. These two wavelengths were considered, since the significant variation in the pH of the phases is responsible for alterations on the surface charge of vanillin, and consequently, these differences promote the variation of the maximum peaks of absorption. Thus, to guarantee that the totality of vanillin is quantified, its absorbance was measured in the two maximum peaks of absorption for these pH conditions. Calibration curves were properly

established for each wavelength considered, and the mass balance of vanillin was calculated and confirmed in each experiment.

The partition coefficients of each antioxidant were estimated according to Equation (2)

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

where K is the partition coefficient, C represents the concentration of vanillin or L-ascorbic acid, and the subscripts T and B denote the top and bottom phases, respectively. It should be remarked that in all the extraction systems, the top phase corresponds to the alcohol-rich phase while the bottom phase is the inorganic-salt-rich phase.

The recovery percentages of each biomolecule for the top (R_{i-T}) and bottom (R_{i-B}) phases are determined accordingly to the following equations,

$$R_{i-T} = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_v \cdot K}} \quad (3)$$

$$R_{i-B} = \frac{100}{1 + R_v \cdot K} \quad (4)$$

where 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 represents the partition coefficients of each biomolecule, and the subscripts T and B denote the top and bottom phases, respectively. The subscript i describes each biomolecule, being substituted by *van* for vanillin and *AA* for L-ascorbic acid.

2.4. pH determination

The pH (± 0.02) of the top and bottom phases was measured at 298 (± 1) K using an HI 9321 Microprocessor pH meter (HANNA instruments). The compositions adopted at the biphasic region mixture correspond to 50 wt % of alcohol and 15 wt % of inorganic salt, being these compositions similar to those used in the partitioning experiments. All mixtures were gravimetrically prepared within $\pm 10^{-4}$ g. After the separation of the equilibrated phases the pH was measured.

2.5. Selective recovery of vanillin and L-ascorbic acid from a food sample

The selective recovery of both biomolecules (vanillin and L-ascorbic acid) was carried out in a real food waste sample, namely in the vanilla diet pudding Dr. Oetker

("http://www.oetker.com.br/?actA=2111&produtoID=138,"). According to the product specifications both vanillin and L-ascorbic acid are presented as constituents.

The composition of the preferred ATPS to selectively extract the two antioxidants was chosen taken into account the partition coefficients and recovery efficiencies obtained with the model systems. Thus, the system composed of ethanol (50 wt%) + K_2HPO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) was used with the intent of maximizing the concentration of vanillin in the top phase, while the system composed of 2-propanol (50 wt%) + K_2HPO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) was employed based on enhanced partition coefficients obtained for L-ascorbic acid at the bottom phase.

The pudding powder samples (5 g of total mass) were dissolved in 23.3 mL of aqueous solutions of alcohol (ethanol or 2-propanol at 50 wt%) and at (298 ± 1) K. The inorganic salts (K_2HPO_4 or K_3PO_4 at 15 wt%) and water were then added to prepare the respective ATPS in the required concentrations up to a total volume of 14 mL. Then, the mixtures were gently stirred during 5 minutes and finally centrifuged at 2,000 rpm for 5 minutes. The extraction systems were placed at (298 ± 1) K for 18 h to reach the equilibrium. The vials were closed during this period to avoid the alcohol vaporization. Finally both phases were carefully separated and weighted, the volume of each phase was measured, and the biomolecules were quantified in each phase by the standard methods described before. The pH of both phases was also measured according to the experimental methodology described above. The biomolecules quantification was performed in triplicate, and the average of the three assays and respective standard deviations are reported.

3. Results and Discussion

3.1. Phase diagram and tie-lines

The ATPS formation capacity of four alcohols, using three different potassium inorganic salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 , and $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) was assessed in the present study. All phase diagrams were determined at $298 (\pm 1)$ K and at atmospheric pressure. The mass fraction solubility data for all systems are presented in Supporting Information (Tables S1 to S5). The set of solubility curves obtained is depicted in Figure 1 and Figure S1 (see Supporting Information), according to two different criteria, namely, (a) the effect of alcohols while maintaining the inorganic salt, and (b) the influence of the inorganic salts against one alcohol. All the phase diagrams are

presented in molality units to avoid discrepancies in the phase diagrams behaviour which could be a direct result of the differences between the alcohol and salt molecular weights.

According to Fig. 1, it is possible to conclude that alcohols with longer alkyl chains have, in general, a higher ability for ATPS formation, as described by the trend: 1-propanol (370 K) > 2-propanol (356 K) > ethanol (351 K) \geq methanol (337 K). It should be stressed that the boiling temperatures of each alcohol are presented in parenthesis. It is well-known that the solubility of an aliphatic alcohol in water depends on its chain length, and decreases while increasing the number of carbon atoms. Therefore, alcohols with a lower affinity for water are easily separated from aqueous media by the addition of salting-out inorganic salts (Ventura et al., in press). Particularly, for the systems composed of K_2HPO_4 and K_3PO_4 , the alcohol with a branched-alkyl chain, 2-propanol, is less effective for undergoing liquid–liquid demixing, when compared with its isomer, 1-propanol. These results are in good agreement with the literature (Greve & Kula, 1991; Ooi et al., 2009; Shekaari, Sadeghi, & Jafari, 2010; Wang, Wang, Han, Hu, & Yan, 2010; Wang et al., 2010; Zafarani-Moattar, Banisaeid, & Beirami, 2005), where ternary systems based in the same alcohols and organic citrate salts (sodium- and potassium-based) were used. This trend can be explained by the higher hydrophobicity of 1-propanol. Generally, the solvent with the higher hydrophobicity has a lower capacity for dissolving in water, and thus, it is easily excluded from the salt-rich media for an alcohol-rich phase. The higher hydrophobicity of the 1-propanol isomer is also confirmed by its higher octanol–water partition coefficient ($K_{ow} = 1.78$) (Oliferenko et al., 2004) when compared with 2-propanol ($K_{ow} = 1.12$) (Oliferenko et al., 2004). Wang and co-authors (Wang et al., 2010) also pointed out that, despite the idea that the phase separation is driven by the competition of alcohol-water and salt-water interactions, those were still not sufficient to explain the phase formation behaviour. The authors justified the capacity of these four alcohols in promoting the phase formation by showing clear correlation of the acting forces of the alcohol molecules with themselves, and that this condition is well described by their “boiling points” (Lide, 2008) (shown above).

The authors justified the capacity of these four alcohols in promoting the phase formation by showing clear correlation of the acting forces of the alcohol molecules with themselves, and that this condition is well described by their “boiling points” (Lide, 2008) (shown above).

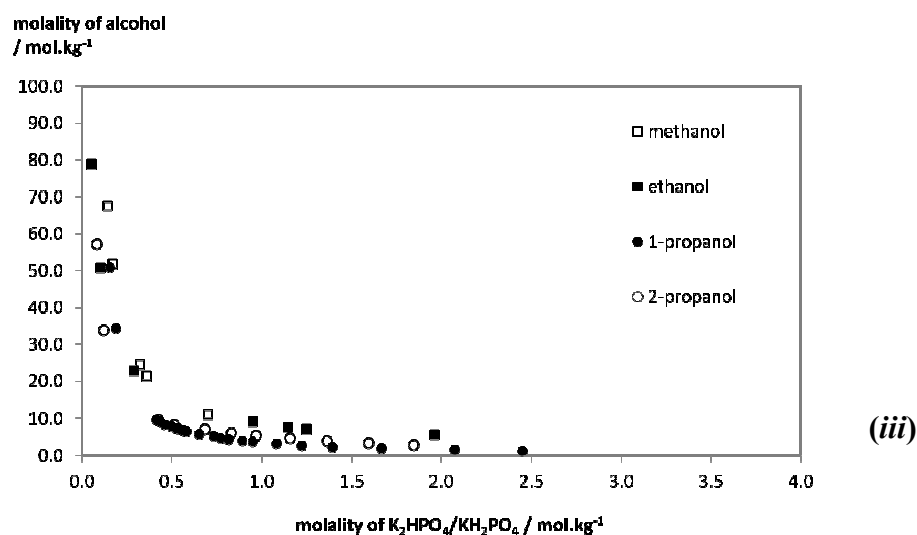
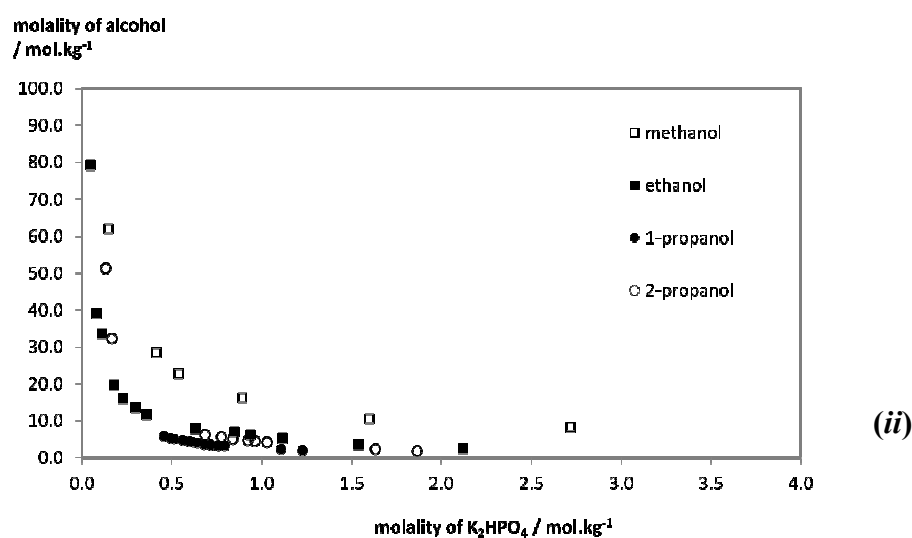
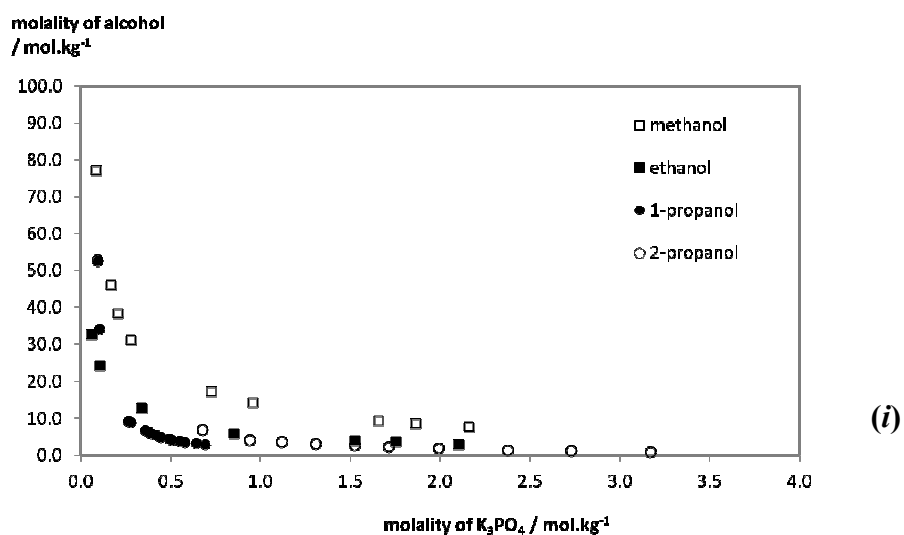


Fig. 1. Phase diagrams of all the ternary systems studied composed of four alcohols (□) methanol, (■) ethanol, (●) 1-propanol, and (○) 2-propanol, and three inorganic salts: (i) K₃PO₄, (ii) K₂HPO₄, and (iii) KH₂PO₄/K₂HPO₄.

The same correlation is obtained here, meaning that the forces established between the alcohol molecules are also crucial interactions, which rule the phase behaviour. It is also mentioned that the difference of 15 K in the “boiling points” of the isomers reflects the enhanced capacity of 1-propanol to establish van der Waals forces, and which further facilitates the exclusion of this alcohol from the salt- to the alcohol-rich phase (Wang et al., 2010). The same argument is given to explain the small difference on ATPS formation by ethanol and 2-propanol. In fact, these two systems have similar alcohol-alcohol forces described by their close “boiling points”.

For a better understanding of the phenomenon included in the formation of alcohol-salt ATPS, the same binodal curves were also considered aiming to focus the influence of the three inorganic salts on the ATPS formation (Figure S1). The decrease in the capacity of the inorganic salts to promote ATPS formation is as follows:

methanol: $K_2HPO_4/KH_2PO_4 > K_3PO_4 \geq K_2HPO_4$

ethanol: $K_3PO_4 \approx K_2HPO_4/KH_2PO_4 > K_2HPO_4$

1-propanol: $K_3PO_4 > K_2HPO_4 > K_2HPO_4/KH_2PO_4$

2-propanol: $K_3PO_4 \approx K_2HPO_4 \approx K_2HPO_4/KH_2PO_4$

The capacity of these specific inorganic salts to promote the phase separation was already investigated as part of different ternary systems (Ventura et al., 2011; Ventura et al., in press), and, in general, the effect of these inorganic salts follows the Hofmeister series: $K_3PO_4 > K_2HPO_4 > K_2HPO_4/KH_2PO_4$ (Ventura et al., 2011). However, this trend was only verified for systems composed of 1-propanol. The remaining systems do not follow the accepted trend in what concerns the position of K_2HPO_4/KH_2PO_4 . In fact, it is possible to confirm that between K_2HPO_4 and K_3PO_4 , the latter inorganic salt has the highest capacity to induce the phase separation, although in some cases, only a small difference is observed. This behaviour can be easily supported by literature data and it is related to the idea that the strong salting-out inducing anions, PO_4^{3-} and HPO_4^{2-} , exhibit a stronger capability for creating ionhydration complexes by excluding water from the alcohol-rich phase, and thus favouring the formation of ATPS (He, Li, Liu, Li, & Liu, 2005). Also, according to literature, the K_2HPO_4/KH_2PO_4 salts have a lower ability for the ATPS formation, due to the presence of KH_2PO_4 , which tends towards the salting-in

regime. Indeed, it was already described that KH_2PO_4 is not capable by itself to promote the formation of alcohol-based ATPS. Here the “usual” behavior of $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ was only detected for the 1-propanol system. Searching for an explanation for this behaviour, the pH of both phases of each system were measured (Table 1).

Table 1

pH values of the top (*T*) and bottom (*B*) phases for the extraction systems composed of alcohol + inorganic salt + water, at 298 K and atmospheric pressure.

Ternary System		pH (<i>T</i>) \pm 0.02	pH (<i>B</i>) \pm 0.02
K_3PO_4	methanol	12.79	13.20
	ethanol	12.80	13.22
	1-propanol	12.38	12.69
	2-propanol	12.61	12.83
K_2HPO_4	methanol	10.34	9.76
	ethanol	9.78	9.52
	1-propanol	9.69	9.01
	2-propanol	9.85	9.15
$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$	methanol	8.68	8.99
	ethanol	7.70	8.01
	1-propanol	7.88	7.64
	2-propanol	8.08	7.31

According to Table 1, it is observed that the pH is salt dependent and alcohol-independent. The addition of some of these alcohols is responsible for the destruction of the buffer condition, which is demonstrated by significant differences in the expected pH values of the phases. The buffer condition was lost in most of the systems, with the exception of the 1-propanol. Thus, for the ternary systems with $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ and methanol, ethanol and 2-propanol, the effect is not driven by the phosphate buffer ionic strength and respective interactions, but it is induced by the presence of two different inorganic salts, K_2HPO_4 and KH_2PO_4 , as individual ionic species, and which partition in different directions of the system. Since ATPS making use of $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ were not found in literature, a comparison between our results and those in the literature was not possible. Evidently, the use of these ternary systems

for extraction purposes should be cautiously carried out since the pH value is not neutral for systems composed of methanol, ethanol or 2-propanol.

The solubility curves described before, were correlated using the mathematical approach originally described in literature (Merchuck et al., 1998), by the application of Eq. (3.1). The regression parameters A , B and C , the respective standard deviations (std), and the correlation coefficients (R^2), are reported in Table S6 in Supporting Information. To complete the phase diagrams, the tielines (TLs), and respective tie-line lengths (TLLs), were determined. Their values are reported in Table S7 in Supporting Information, along with the compositions of inorganic salt and alcohol at the top (T) and bottom (B) phases. The graphical representation of the phase diagrams of all the systems studied is depicted in Supporting Information (Figures S2 to S12). The TLs information is crucial for the extraction process of any compound when using ATPS. Usually, as the concentrations of alcohol and salt used to form the biphasic system increases, the TLL becomes longer, and the top and bottom phases become increasingly different in composition (Guo et al., 2002; Neves et al., 2009; Pereira, Lima, Freire, & Coutinho, 2010; Salabat & Hashemi, 2006; Ventura et al., 2011; Ventura et al., in press; Willauer, Huddleston, & Rogers, 2002). Thus, the partitioning of common molecules in ATPS depends on the TLL considered, which reflects the hydrophilicity/hydrophobicity of the phases (Willauer et al., 2002).

3.2. Partitioning of antioxidants in model systems

In this part of the work we focused on the possibility of using alcohol-salt ATPS to promote the selective partition of two compounds, namely vanillin and L-ascorbic acid, found in some food matrices. Several mixture compositions using alcohol-salt ATPS were prepared according to the following weight percentages: 50 wt.% of alcohol + 15 wt.% of salt + 35 wt.% of biomolecule aqueous solution (L-ascorbic acid or vanillin). The exact mass fraction composition percentages used in the preparation of the mixture points and the respective partition coefficients and corresponding standard deviations are reported in Tables S8 and S9 in the Supporting Information.

The L-ascorbic acid was quantified by the Tillman's method, and the influence of the alcohols and inorganic salts in the antioxidant quantification was assessed before the partition assays. Thus, several saline (40, 20, 10, 5 and 1 wt.%) and alcoholic aqueous solutions (80, 60, 40, 20 and 10 wt.%) were prepared, in combination with three

concentrations of L-ascorbic acid (5, 50 and 200 mg.L⁻¹). The results suggest that the alcohols' effect in the antioxidant quantification using the Tillman's method is insignificant (results provided in Supporting Information – Figure S13). On the other hand, higher deviations are observed between the real and the quantified concentration of L-ascorbic acid at the salt-rich phase. Thus, the acid concentration was only measured at the alcohol-rich phase (top phase), with its concentration in the other phase estimated by the difference between the initial concentration used to prepare the partition systems, and its concentration in the top phase.

To appreciate the influence of the phase forming components of the ATPS on the vanillin quantification, its UV–Vis spectra were evaluated under different compositions of these alcohols and inorganic salts. It is well known that vanillin changes its surface charge and chemical structure at different pH values because of the deprotonation of its hydroxyl group (Li, Jiang, Mao, & Shen, 1998) (Figure S14 in Supporting Information). Vanillin has a pKa of 7.4, indicating that for pH values above 7.4, this biomolecule is preferentially negatively charged. The difference in its structural conformation at different pH values and UV–Vis spectra was already verified by Li and co-workers (Li et al., 1998). Thereby, two different calibration curves were prepared considering the maximum absorbance peaks observed for the biomolecule at different pH values (280 and 347 nm). To achieve the mass balance, the total amount of vanillin was determined using one or both the calibration curves depending on the vanillin structures present in the media.

After the validation of the methods used for the quantification of the biomolecules, their partition coefficients were addressed. The partition analysis of these ATPS was assessed making use of the logarithmic function of the partition coefficient (log K). According to Figure 2, it is observed that vanillin and L-ascorbic acid preferentially migrate to opposite phases, the top and bottom phases, respectively. While vanillin preferentially migrates to the alcohol- rich phase (log K > 0), L-ascorbic acid has a higher affinity for the salt-rich phase (log K < 0).

Aiming at explaining the preference of the acid for the salt-rich phase, some assumptions can be taken into account. The first is related to the L-ascorbic acid chemical structure (depicted in Figure 2). This biomolecule is highly polar and has the capacity to establish a vast number of hydrogen bonds with water, having more affinity to the more hydrophilic (salt-rich) phase.

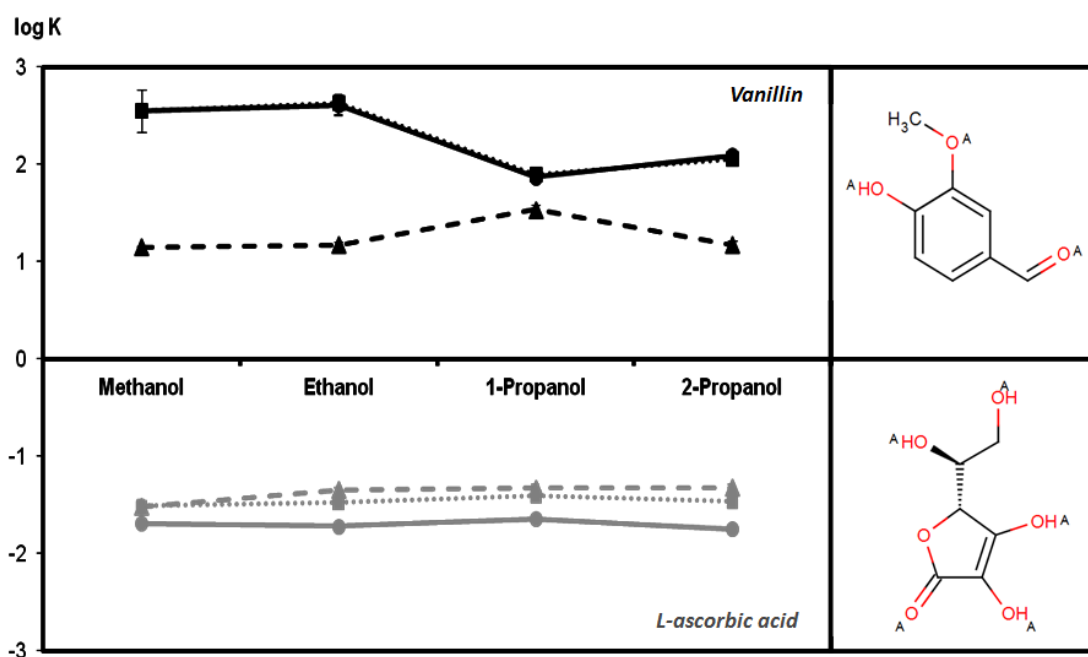


Fig. 2. Logarithm function of the partition coefficients ($\log K$) of the two compounds, vanillin (black lines) and L-acid ascorbic (gray lines), for all the extraction systems composed of methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol, and the inorganic salts: K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 (triangles - dashed line). The chemical structures of each one of the biomolecules are also shown in this figure to help the results' interpretation.

In an opposite way, vanillin is less polar since it presents a lower number of hydrogen-bond acceptors, and has a consequently higher aptitude for the hydrophobic (alcohol-rich) phase. This trend is also in close agreement with the 1-octanol–water partition coefficients reported in literature for each biomolecule. Reported experimental values of this parameter, $\log K_{ow} = 1.19$ (Noubigh et al., 2010) for vanillin and $\log K_{ow} = -1.85$ (Takács-Novak & Avdeef, 1996) for L-ascorbic acid, show that these molecules have a different hydrophilic/lipophilic aptitude. L-ascorbic acid is more hydrophilic ($\log K_{ow} < 0$), while vanillin is more hydrophobic ($\log K_{ow} > 0$). The partition results obtained here are indeed in good agreement with the $\log K_{ow}$ values (Noubigh et al., 2010; Takács-Novak & Avdeef, 1996), suggesting that the molecules' hydrophobicity control the partition nature of these ATPS. Moreover, in order to evaluate the alcohol and salt influence in the partitioning of both biomolecules, the recovery percentages of vanillin

in the top phase (R_{van-T}) and L-ascorbic acid in the bottom phase (R_{AA-B}), were also evaluated and are presented in Figure 3.

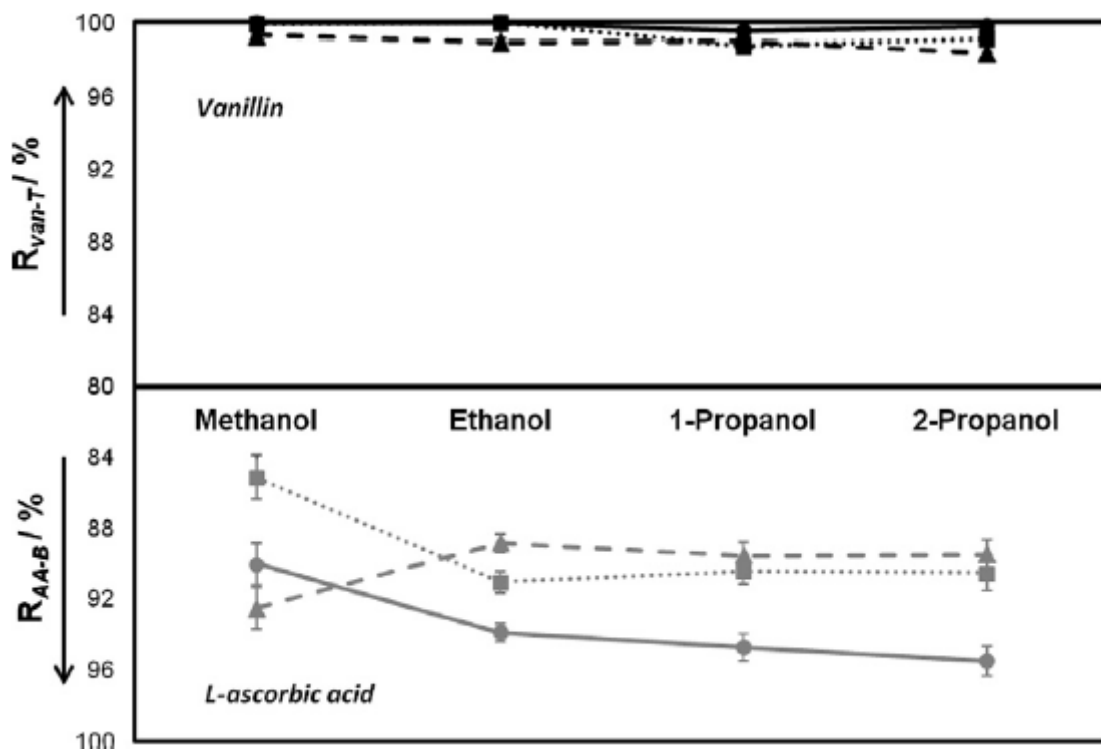


Fig. 3. Recovery percentages of vanillin (dark lines) and L-ascorbic acid (gray lines) obtained in each one of the extraction systems studied. The ternary systems are composed of different alcohols, namely methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol, with the inorganic salts: K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 (triangles - dashed line).

For all the aqueous systems studied, the recovery of vanillin for the alcohol-rich phase is between $(98.37 \pm 0.08)\%$ and $(99.94 \pm 0.01)\%$, while the recovery of L-ascorbic acid for the salt-rich phase is between $(85.15 \pm 1.27)\%$ and $(95.50 \pm 0.19)\%$. Finally, the recovery results obtained also show that the effect of the alcohol molecular structure on the extraction of both antioxidants is marginal; yet, stronger saltingout inducing inorganic salts, namely K_3PO_4 and K_2HPO_4 , largely enhance the recovery achieved at each phase.

Summing up, the selective partitioning of the two biomolecules is envisaged taking into account the results obtained with the model systems. Therefore, the next stage of this work was to employ the enhanced systems for the selective partitioning of vanillin and ascorbic acid in real food samples.

3.3. Selective recovery of vanillin and L-ascorbic acid from a food sample

The success of a new methodology or process is only proven when the final goal behind the optimisation studies is accomplished. In this context, the capacity of these new alcohol-salt ATPS to simultaneously separate vanillin and L-ascorbic acid from a food waste source was evaluated in this work as a real separation. Thus, the vanilla diet pudding Dr. Oetker was used here as the food waste source of vanillin and L-ascorbic acid. The choice of this food matrix was based on the fact that both biomolecules are present in significant (non-residual) quantities, providing the necessary conditions for their accurate quantification. Since our goal is to demonstrate the separation capacity of the ATPS investigated here for real systems, this part of the investigation was carried out using the best two partition systems identified above, described by the two ATPS with higher partition coefficients and recoveries of both biomolecules into opposite phases. The two systems selected were: ethanol (50 wt.%) + K₂HPO₄ (15 wt.%) + H₂O (35 wt.%) and 2-propanol (50 wt.%) + K₂HPO₄ (15 wt.%) + H₂O (35 wt.%). The ATPS systems were prepared using an alcohol solution of the pudding samples (Table S10 - see Supporting Information).

To study the capacity of the selected ATPS in the separation of vanillin and L-ascorbic acid from the vanilla diet pudding, the following parameters were evaluated: the partition coefficient logarithmic function, the recovery percentage in the top (vanillin) and bottom (L-ascorbic acid) phases, and the pH of each phase. The results are shown in Figure 4.

Despite the smaller values obtained for K of vanillin and L-ascorbic acid, Figure 4 shows that both systems are capable of promoting the separation of the biomolecules. In this context, it is observed that in the real separation, as in the optimisation study described above, vanillin is migrating almost completely for the top phase (log K > 0 with recovery > 95%) while L-ascorbic acid is concentrated in the bottom phase.

The smaller values of K_{AA-B} , obtained in the real extraction from the pudding powder, can be explained by the complexity of the pudding sample. Nevertheless the

high recovery values obtained for vanillin, and good recoveries (above 50%) for the L-ascorbic acid in 2-propanol, prove the success of this selective separation process.

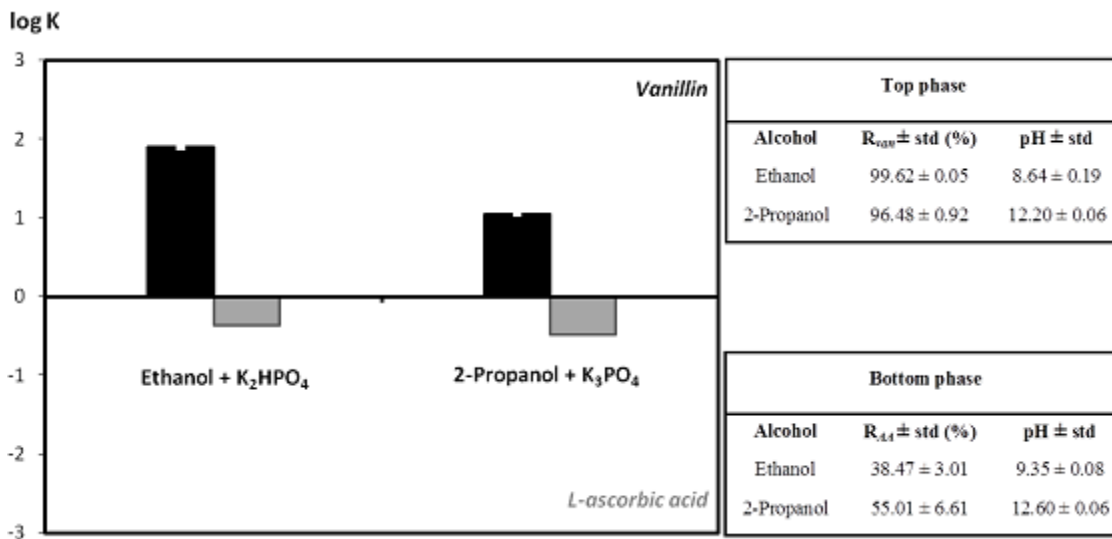


Fig. 4. Extraction parameters (recovery percentages and pH values for the top and bottom phases) and partition coefficients of vanillin (dark bars) and L-ascorbic acid (gray bars) from the vanilla diet pudding Dr. Oetker, obtained using the optimised ATPS: 2-propanol (50 wt.%) + K_2HPO_4 (15 wt.%) + H_2O (35 wt.%) and ethanol (50 wt.%) + K_2HPO_4 (15 wt.%) + H_2O (35 wt.%). The pH values together with the respective standard deviations are also reported.

To the best of our knowledge, this is the first time that a selective separation is optimised and successfully applied to simultaneously extract two distinct biomolecules from a food waste raw material into different phases. In this context, alcohol-salt-based ATPS can be envisaged as novel and alternative extractive procedures for the recovery of added-value compounds from several raw materials.

4. Conclusions

Alcohol-salt aqueous two-phase systems (ATPS) were successfully applied to the selective partitioning of two biomolecules, namely vanillin and L-ascorbic acid, from a real food waste matrix. In this context, novel phase diagrams to perform the partitions were determined at $298 (\pm 1)$ K and at atmospheric pressure. The main results showed that alcohols with longer aliphatic chains (higher hydrophobicity) enhance the phase separation.

The capacity of these ATPS to be used in the separation of two biomolecules studied was proven, with vanillin being preferentially concentrated in the alcohol-rich phase, whereas L-ascorbic acid migrates for the salt-rich phase. This behaviour is in close agreement with the hydrophilicity/lipophilicity balance of each biomolecule. The optimised systems in what concerns the selective partitioning of vanillin and L-ascorbic acid are: 50 wt.% ethanol + 15 wt.% K_2HPO_4 + 35 wt.% H_2O ($K_{van} = 430 \pm 46$ and $R_{van-T} = (99.93 \pm 0.01)\%$) and 2-propanol (50 wt.%) + K_2HPO_4 (15 wt.%) + H_2O (35 wt.%) ($K_{AA} = 0.018 \pm 0.001$ and $R_{AA-B} = (95.50 \pm 0.19)\%$).

From the application of the optimised ATPS to real food samples, it was concluded that it is possible to design cheaper and simple separation processes capable of promoting the simultaneously separation of two different biomolecules. Thus, this work shows for the first time the successful use of alcohol-salt ATPS in the selective recovery of valuable products from food waste sources, with their application being envisaged in other raw material sources.

Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC, for the scholarships of I.A.O. Reis and S.B. Santos, and Fundação para a Ciência e a Tecnologia, for the project Pest-C/CTM/LA0011/2011 and the post-doctoral Grant SFRH/BPD/79263/2011 of S.P.M. Ventura and PhD Grant SFRH/BD/60228/2009 of J.F.B. Pereira.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.010>.

References

- Albertsson, P. A. (1986). *Aqueous polymer-phase systems*. New York: Wiley.
- Aqueous two-phase systems: Methods and protocols (Methods in Biotechnology) (Ed.: R. Hatti-Kaul), Humana Press, Totowa, 2000.
- Arrigoni, O., & De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569, 1–9.

- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27–36.
- Azevedo, A. M., Rosa, P. A. J., Ferreira, I. F., Pisco, A. M. M. O., Vries, J., Korporaal, R., et al. (2009). Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. *Separation and Purification Technology*, 65, 31–39.
- Broinizi, P. R. B., Andrade-Wartha, E. R. S., Silva, A. M. O., Novoa, A. J. V., Torres, R. P., Azeredo, H. M. C., et al. (2007). Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Food Science and Technology*, 27, 902–908.
- Chen, Y., Meng, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Liu, X., & Yang, J. (2010). Liquid–liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 3612–3616.
- Cláudio, A. F. M., Freire, M. G., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Coutinho, J. A. P. (2010). Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75, 39–47.
- Converti, A., Aliakbarian, B., Domínguez, J. M., Bustos-Vázquez, G., & Perego, P. (2010). *Microbial production of biovanillin Braz. J Microbiol*, 41, 519–530.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., et al. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of Science Food and Agriculture*, 80, 825–860.
- Freire, M. G., Pereira, J. F. B., Francisco, M., Rodríguez, H., Rebelo, L. P. N., Rogers, R. D., et al. (2012). Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids. *Chemistry—A European Journal*, 18, 1831–1839.
- Greve, A., & Kula, M. R. (1991). Phase diagrams of new aqueous phase systems composed of aliphatic alcohols, salts and water. *Fluid Phase Equilibra*, 62, 53–63.
- Guo, Z., Li, M., Willauer, H. D., Huddleston, J. G., April, G. C., & Rogers, R. D. (2002). Evaluation of polymer-based aqueous biphasic systems as improvement for the hardwood alkaline pulping process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41, 2535–2542.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., & Meybeck, A. (2011). Global Food Losses and Food Waste - Extent, Causes and Prevention,

- International Congress Save Food!, http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/GFL_web.pdf.
- Gutowski, K. E., Broker, G. A., Willauer, H. D., Huddleston, J. G., Swatloski, R. P., Holbrey, J. D., et al. (2003). Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of American Chemical Society*, 125, 6632–6633.
- He, C., Li, S., Liu, H., Li, K., & Liu, F. (2005). Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. *J Chromatography A*, 1082, 143–149.
- Hocking, M. B. (1997). Vanillin: Synthetic Flavouring for Spent Sulfite Liquor. *J. Chem. Educ.*, 74, 1055-1059. <http://www.oetker.com.br/?actA=2111&produtoID=138.1>.
- Kaygorodov, K. L., Chelbina, Y. V., Tarabanko, V. E., & Tarabanko, N. V. (2010). Extraction of vanillin by aliphatic alcohols. *Journal of Siberian Federal University*, 3, 228–233.
- Klein, B. P., & Kurilich, A. C. (2000). Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 35, 580–584.
- Lee, J. S., Kim, J. W., Han, S. H., Chang, I. S., Kang, H. H., Lee, S., et al. (2004). The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. *Journal of Cosmetic Science*, 55, 1–12.
- Li, R., Jiang, Z., Mao, L., & Shen, H. (1998). Adsorbed resin phase spectrophotometric determination of vanillin or/and its derivatives. *Talanta*, 47, 1121–1127.
- Lide, D. R. (2008). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th ed., internet version; 2007. <http://www.hbcpnetbase.com>.
- Lima, A. S., Alegre, R. M., & Meirelles, A. J. A. (2002). Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, 50, 63–68.
- Louwrier, A. (1999). Model isolations of nucleic acids from prokaryotic and eukaryotic sources using an organic/ aqueous biphasic system. *Biotechnology Techniques*, 13, 329–330.
- Lutz, A. (2008). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (4ª Ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

- Malpiedi, L. P., Romanini, D., Picó, G. A., & Nerli, B. B. (2009). Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. *Separation and Purification Technology*, 65, 40–45.
- Merchuck, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711, 285–293.
- Moreira, A. V. B., & Mancini Filho, J. (2003). Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquosos e lipídicos. *Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition*, 25, 31–46.
- Neves, C. M. S. S., Ventura, S. P. M., Freire, M. G., Marrucho, I. M., & Coutinho, J. A. P. (2009). Evaluation of cation influence on the formation and extraction capability of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 5194–5199.
- Noubigh, A., Mgaidi, A., & Abderrabba, M. (2010). Temperature effect on the distribution of some phenolic compounds: an experimental measurement of 1-octanol/water partition coefficients. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 488–491.
- Oliferenko, A. A., Oliferenko, P. V., Huddleston, J. G., Rogers, R. D., Palyulin, V. A., Zefirov, N. S., et al. (2004). Theoretical scales of hydrogen bond acidity and basicity for application in QSAR/QSPR studies and drug design. partitioning of aliphatic compounds. *Journal of Chemical Informaton and Computer Sciences*, 44, 1042–1055.
- Ooi, C. W., Tey, B. T., Hii, S. L., Kamal, S. M. M., Lan, J. C. W., Ariff, A., et al. (2009). Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt based aqueous two-phase systems. *Proceedings of the Biochemical Society*, 44, 1083–1087.
- 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 Chemistry*, 12, 1661–1669.
- Ranadive, A. S. (1994). Vanilla - cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. In G. Charalambous (Ed.), *Spices, herbs and edible fungi* (pp. 517–577). Amsterdam: Elsevier.

- Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S., & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutos do cerrado. *Food Science and Technology*, 27, 53–60.
- Salabat, A., & Hashemi, M. (2006). Temperature effect on the liquid–liquid equilibria for some aliphatic alcohols + water + K₂CO₃ systems. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 51, 1194–1197.
- Shekaari, H., Sadeghi, R., & Jafari, S. A. (2010). Liquid–liquid equilibria for aliphatic alcohols + dipotassium oxalate + water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55, 4586–4591.
- Silva, C. A. S., Coimbra, J. S. R., Rojas, E. E. G., & Teixeira, J. A. C. (2009). Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44, 1213–1216.
- Silva, L. H. M., & Meirelles, A. J. A. (2000). Bovine serum albumin, alfa-lactoalbumin and beta-lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, 42, 279–282.
- Souza, R. L., Barbosa, J. M. P., Zanin, G. M., Lobão, M. W. N., Soares, C. M. F., & Lima, A. S. (2010). Partitioning of Porcine Pancreatic Lipase in a Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol/Potassium Phosphate Aqueous. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 16, 288–300.
- Takács-Novak, K., & Avdeef, A. (1996). Interlaboratory study of logP determination by shake-flask and potentiometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 1405–1413.
- Tarabanko, V. E., Chelbina, Y. V., Sokolenko, V. A., & Tarabanko, N. V. (2007). A study of vanillin extraction by octylamine. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 25, 99–107.
- Ventura, S. P. M., Neves, C. M. S. S., Freire, M. G., Marrucho, I. M., Oliveira, J., & Coutinho, J. A. P. (2009). Evaluation of anion influence on the formation and extraction capacity of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 9304–9310.
- Ventura, S. P. M., Sousa, S. G., Freire, M. G., Serafim, L. S., Lima, Á. S., & Coutinho, J. A. P. (2011). Design of ionic liquids for lipase purification. *Journal of Chromatography B*, 879, 2679–2687.

- Ventura, S. P. M., Sousa, S. G., Serafim, L. S., Lima, Á. S., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (2011). Ionic liquids based aqueous two-phase systems with pH controlled by phosphate buffer: The cation effect. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56, 4253–4260.
- Ventura, S. P. M., Sousa, S. G., Serafim, L. S., Lima, Á. S., Freire, M. G., & Coutinho, J. A. P. (in press). Ionic Liquids Based Aqueous Two-Phase Systems with pH Controlled by Phosphate Buffer: The Anion Effect. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 57, 507–512.
- Wang, Y., Han, J., Xu, X., Hu, S., & Yan, Y. (2010). Partition behaviour and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75, 352–357.
- Wang, Y., Wang, J., Han, J., Hu, S., & Yan, Y. (2010). Liquid-liquid equilibrium of novel aqueous two-phase systems and evaluation of salting-out abilities of salts. *Central European Journal of Chemistry*, 8, 886–891.
- Willauer, H. D., Huddleston, J. G., & Rogers, R. D. (2002). Solute partitioning in aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol and salt: the partitioning of small neutral organic species. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41, 1892–1904.
- Wu, B., Zhang, Y., Wang, H., & Yang, L. (2008). Temperature dependence of phase behaviour for ternary systems composed of ionic liquid + sucrose + water. *Journal of Physical Chemistry B*, 112, 13163–13165.
- Wu, B., Zhang, Y. M., & Wang, H. P. (2008). Aqueous biphasic systems of hydrophilic ionic liquids + sucrose for separation. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53, 983–985.
- Zafarani-Moattar, M. T., Banisaeid, S., & Beirami, M. A. S. (2005). Phase diagrams of some aliphatic alcohols + potassium or sodium citrate + water at 25°C. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 50, 1409–1413.

(Anexo A)

Supporting Information

Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds

Igor A. O. Reis^a, Samuel B. Santos^a, Ludmila A. Santos^a, Naiana Oliveira^a, Mara G. Freire^b, Jorge F. B. Pereira^b, Sónia P. M. Ventura^b, João A. P. Coutinho^b, Cleide M. F. Soares^{a,c}, Álvaro S. Lima^{a,c,*}

Food Chemistry 135 (2012) 2453–2461

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

^bDepartamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

^cInstituto 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.

Table S1. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of methanol (1) + salt (2) + water (3) at 298 K

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
77.761	1.119	77.459	1.271	76.819	1.591
71.190	1.759	66.454	2.502	68.362	2.165
59.623	3.453	47.671	6.694	62.376	2.603
55.068	4.196	42.179	8.584	43.984	4.766
49.930	5.623	33.943	13.458	40.683	5.312
35.409	13.345	25.035	21.786	26.260	9.866
30.958	16.904	20.706	32.120		
22.804	26.022				
21.269	28.328				
19.528	31.402				

Table S2. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of ethanol (1) + salt (2) + water (3) at 298 K

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
60.138	1.341	78.476	0.762	78.382	0.809
52.740	2.227	64.258	1.426	69.996	1.533
37.034	6.745	60.604	1.845	51.200	4.270
20.875	15.301	47.554	3.007	29.370	12.899
15.267	24.453	42.300	3.820	25.961	15.169
13.704	27.097	38.373	4.940	24.682	16.304
11.526	30.820	34.967	5.905	20.351	23.440
		26.540	9.882		
		23.790	12.840		
		21.849	14.043		
		19.301	16.259		
		14.201	21.136		
		10.116	26.963		

Table S3. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of 1-propanol (1) + salt (2) + water (3) at 298 K

K₃PO₄		K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
75.966	2.017	25.481	7.336
67.157	2.194	24.007	7.879
35.465	5.302	22.778	8.173
34.651	5.573	21.455	8.911
28.667	7.097	20.266	9.372
27.300	7.411	19.415	9.705
25.721	7.634	18.657	10.058
24.585	8.183	17.742	10.578
23.306	8.426	17.376	11.034
22.126	8.666	16.943	11.086
20.727	9.427	16.288	11.686
19.328	9.693	16.022	11.694
18.066	10.505	15.652	12.114
16.815	10.924	11.502	16.197
15.553	12.022	10.265	17.582
14.330	12.806		

Table S4. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of 1-propanol (1) + K₂HPO₄/KH₂PO₄ (2) + water (3) at 298 K

KH₂PO₄/K₂HPO₄			
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
33.330	6.670	75.336	2.332
30.252	7.605	67.423	2.856
28.011	8.284	36.421	6.075
25.494	9.222	35.320	6.375
23.454	10.248	32.464	7.166
22.019	10.710	30.086	7.692
20.680	11.277	29.417	7.921
19.175	12.187	28.685	8.116
17.950	12.863	10.287	20.607
15.949	14.418	8.112	24.408
13.873	16.024	6.390	27.628
12.177	17.855		

Table S5. Experimental binodal mass fraction data for the system composed of 2-propanol (1) + salt (2) + water (3) at 298 K.

K₃PO₄		K₂HPO₄		KH₂PO₄/K₂HPO₄	
100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂	100 w₁	100 w₂
76.040	1.980	75.480	2.260	77.449	1.276
29.226	12.604	65.908	2.824	66.984	1.816
19.924	16.607	27.032	10.638	36.671	6.221
17.517	19.203	24.824	11.858	33.497	7.366
15.280	21.730	23.327	12.746	29.687	9.595
13.110	24.430	21.718	13.849	26.655	11.486
11.486	26.655	20.954	14.339	24.430	13.110
9.595	29.687	19.826	15.172	21.730	15.280
7.366	33.497	11.548	22.134	19.203	17.517
6.221	36.671	9.225	24.513	16.607	19.924
4.760	40.190			14.192	22.334

Table S6. Adjusted parameters and respective standard deviations (*std*) obtained from the regression of Eq. (1), at 298 K and atmospheric pressure.

Ternary System		Regression parameters			R^2
Alcohol	Inorganic Salt	$A \pm std$	$B \pm std$	$C \pm std$	
methanol	K ₃ PO ₄	105.6 ± 2.0	-0.304 ± 0.010	2.3 × 10 ⁻¹⁴ ± 2.1 × 10 ⁻⁶	0.9981
	K ₂ HPO ₄	109.3 ± 3.2	-0.315 ± 0.014	6.2 × 10 ⁻¹⁴ ± 3.2 × 10 ⁻⁶	0.9967
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	162.2 ± 5.8	-0.592 ± 0.023	1.5 × 10 ⁻¹⁵ ± 6.0 × 10 ⁻⁵	0.9988
ethanol	K ₃ PO ₄	91.0 ± 2.5	-0.359 ± 0.016	2.1 × 10 ⁻⁶ ± 3.5 × 10 ⁻⁶	0.9985
	K ₂ HPO ₄	112.4 ± 4.8	-0.462 ± 0.027	1.2 × 10 ⁻¹³ ± 2.1 × 10 ⁻⁵	0.9923
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	108.8 ± 1.9	-0.362 ± 0.011	8.8 × 10 ⁻¹⁴ ± 5.6 × 10 ⁻⁶	0.9990
1-propanol	K ₃ PO ₄	219.5 ± 10.0	-0.774 ± 0.027	4.3 × 10 ⁻¹³ ± 4.6 × 10 ⁻⁵	0.9958
	K ₂ HPO ₄	135.4 ± 10.2	-0.620 ± 0.027	1.5 × 10 ⁻¹⁵ ± 9.7 × 10 ⁻⁶	0.9973
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	218.8 ± 6.5	-0.708 ± 0.013	2.4 × 10 ⁻¹³ ± 7.3 × 10 ⁻⁶	0.9960
2-propanol	K ₃ PO ₄	146.7 ± 2.9	-0.466 ± 0.010	7.7 × 10 ⁻⁶ ± 1.9 × 10 ⁻⁶	0.9986
	K ₂ HPO ₄	170.7 ± 4.3	-0.554 ± 0.013	8.4 × 10 ⁻⁶ ± 6.7 × 10 ⁻⁶	0.9988
	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	128.1 ± 4.9	-0.470 ± 0.021	1.9 × 10 ⁻¹³ ± 1.2 × 10 ⁻⁵	0.9939

Table S7. Mass fraction compositions for the initial mixture (M), TL data and respective TLLs, in the top (T) and bottom (B) phases, for the systems composed of alcohol (Y) and inorganic salt (X), at 298 K and atmospheric pressure.

Ternary System		100 × Mass fraction composition / wt %						TLL
Alcohol	Inorganic salt	Y_M	X_M	Y_T	X_T	Y_B	X_B	
methanol	K_3PO_4	34.92	20.07	46.44	7.32	14.53	42.65	47.61
		41.95	26.08	66.47	2.32	10.83	56.23	77.47
	K_2HPO_4	38.33	19.13	55.65	4.59	15.60	38.20	52.28
		44.81	24.83	70.92	1.89	10.59	54.89	80.31
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	39.95	19.95	51.93	3.70	1.04	72.77	85.79
		30.65	15.27	39.39	5.71	2.99	45.52	53.94
		24.94	14.95	30.38	8.00	3.42	42.49	43.77
ethanol	K_3PO_4	29.92	14.95	42.52	4.49	12.17	29.70	39.45
		34.81	20.52	60.74	1.27	8.10	40.35	65.56
		29.65	20.44	53.30	2.22	9.62	35.87	55.14
	K_2HPO_4	24.84	14.87	33.48	6.86	9.15	29.43	33.19
		35.01	19.84	59.34	1.91	5.73	41.40	66.58
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	39.92	19.97	57.73	3.06	8.43	49.88	67.98
45.02		19.94	66.09	1.90	8.07	51.58	76.39	
1-propanol	K_3PO_4	49.81	14.98	83.95	1.54	2.47	33.61	87.57
		30.03	14.97	72.09	2.07	5.61	22.46	69.54
	K_2HPO_4	19.99	14.99	55.56	2.06	9.10	18.95	49.43
		21.04	19.04	65.36	1.38	6.09	25.00	63.80
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	20.05	20.03	52.94	4.02	5.49	27.12	52.77
		25.04	20.41	58.13	3.51	4.25	31.03	60.50
2-propanol	K_3PO_4	30.52	19.72	63.01	3.29	8.92	30.64	60.61
		34.27	20.72	71.38	2.39	7.10	34.14	71.69
		24.91	20.14	53.99	4.60	10.71	27.72	49.07
	K_2HPO_4	29.87	14.95	50.74	4.79	9.49	24.86	45.87
		49.91	15.04	77.55	2.03	3.94	36.68	81.36
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	34.89	24.94	48.53	4.26	2.21	74.51	84.15
25.06		14.98	41.18	5.82	15.13	20.62	29.96	

Table S8. Weight fraction compositions and partition coefficients data of L-ascorbic acid (K_{AA}), determined at 298 (± 1) K.

Ternary system		100 \times Mass fraction composition / wt %			K_{AA} (fold)
Alcohol	Inorganic salt	<i>alcohol</i>	<i>salt</i>	<i>water</i>	
methanol	K_3PO_4	49.88	15.05	35.06	0.020 ± 0.001
	K_2HPO_4	50.27	14.60	35.13	0.031 ± 0.004
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	49.99	14.99	35.03	0.030 ± 0.005
ethanol	K_3PO_4	49.97	15.06	34.97	0.019 ± 0.001
	K_2HPO_4	49.99	15.00	35.00	0.034 ± 0.001
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	50.03	15.02	34.94	0.045 ± 0.002
1-propanol	K_3PO_4	49.95	15.05	35.00	0.023 ± 0.001
	K_2HPO_4	49.90	15.04	35.05	0.039 ± 0.003
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	50.08	14.98	34.94	0.047 ± 0.004
2-propanol	K_3PO_4	49.94	15.05	35.01	0.018 ± 0.001
	K_2HPO_4	49.83	15.08	35.09	0.034 ± 0.004
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	50.03	15.02	34.96	0.047 ± 0.004

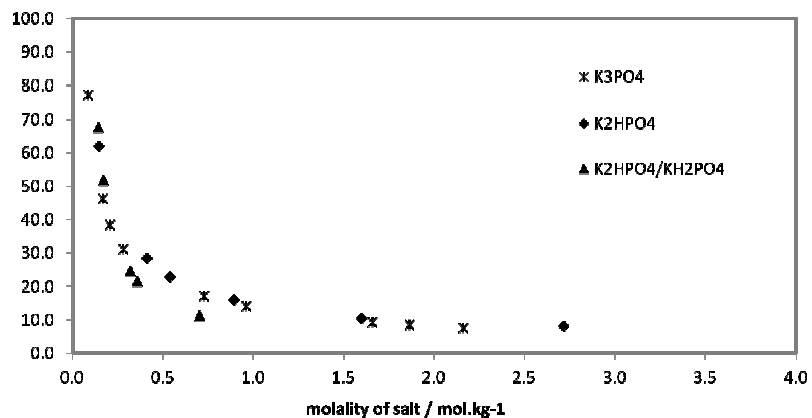
Table S9. Weight fraction composition and partition coefficient data of vanillin (K_{van}), determined at 298 (± 1) K.

Ternary system		100 \times Mass fraction composition / wt %			K_{van}
Alcohol	Inorganic salt	<i>alcohol</i>	<i>salt</i>	<i>water</i>	
methanol	K_3PO_4	50.34	14.99	34.67	166 \pm 61
	K_2HPO_4	50.03	15.00	34.37	358 \pm 8
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	49.87	14.89	35.24	14.1 \pm 0.5
ethanol	K_3PO_4	49.80	15.22	34.98	351 \pm 19
	K_2HPO_4	49.83	15.06	35.10	430 \pm 46
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	49.83	15.06	35.11	15 \pm 1
1-propanol	K_3PO_4	49.72	15.35	34.93	74 \pm 1
	K_2HPO_4	49.85	15.05	35.10	78 \pm 6
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	49.96	15.00	35.04	34 \pm 4
2-propanol	K_3PO_4	49.79	15.12	35.09	122 \pm 3
	K_2HPO_4	49.98	14.92	35.10	114 \pm 3
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	49.70	14.93	35.37	15 \pm 2

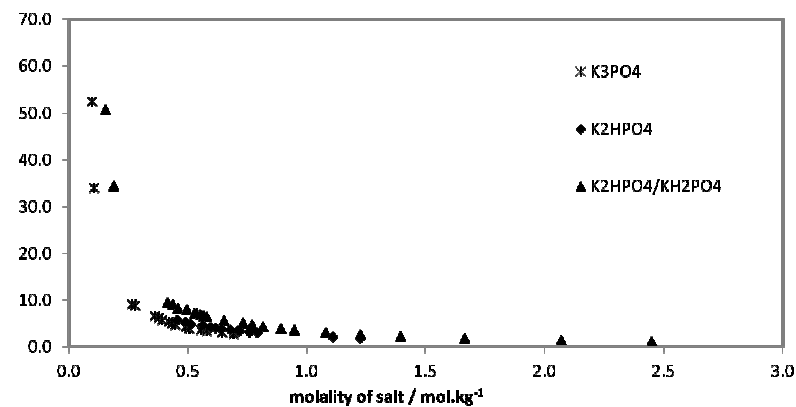
Table S10. Concentration of the antioxidants and pH values of the alcohol solution of the pudding samples for the extraction systems composed of alcohol + inorganic salt + water, at 298 (± 1) K and atmospheric pressure.

Alcohol	$C_{AA} \pm \text{std}$ (g.L⁻¹)	$C_{van} \pm \text{std}$ (g.L⁻¹)	pH \pm std
ethanol	5.95 \pm 0.00	3.49 \pm 0.42	5.31 \pm 0.04
2-propanol	4.76 \pm 0.00	5.88 \pm 0.26	5.06 \pm 0.01

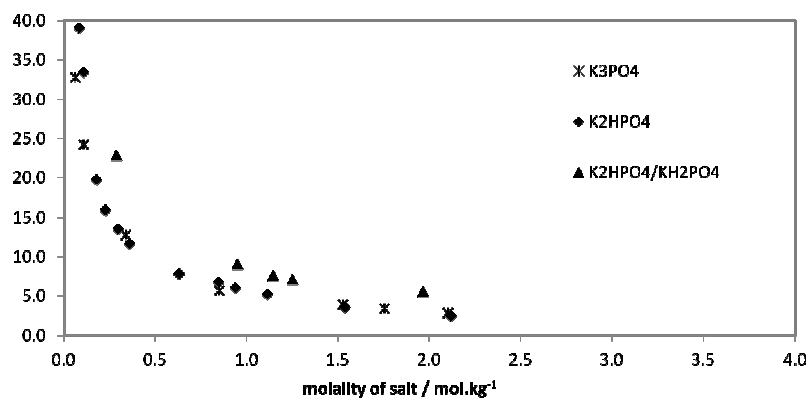
molality of
methanol / mol.kg⁻¹



molality of 1-
propanol / mol.kg⁻¹



molality of ethanol
/ mol.kg⁻¹



molality of 2-
propanol / mol.kg⁻¹

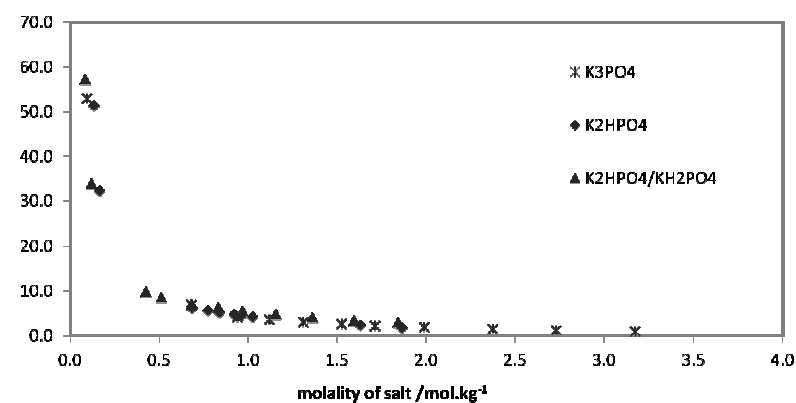


Fig. S1. Phase diagrams of all the ternary systems studied composed of four inorganic salts (*) K₃PO₄, (▲) K₂HPO₄, and (●) KH₂PO₄/K₂HPO₄, and four alcohols: (i) methanol, (ii) ethanol, (iii) 1-propanol, and (iv) 2-propanol.

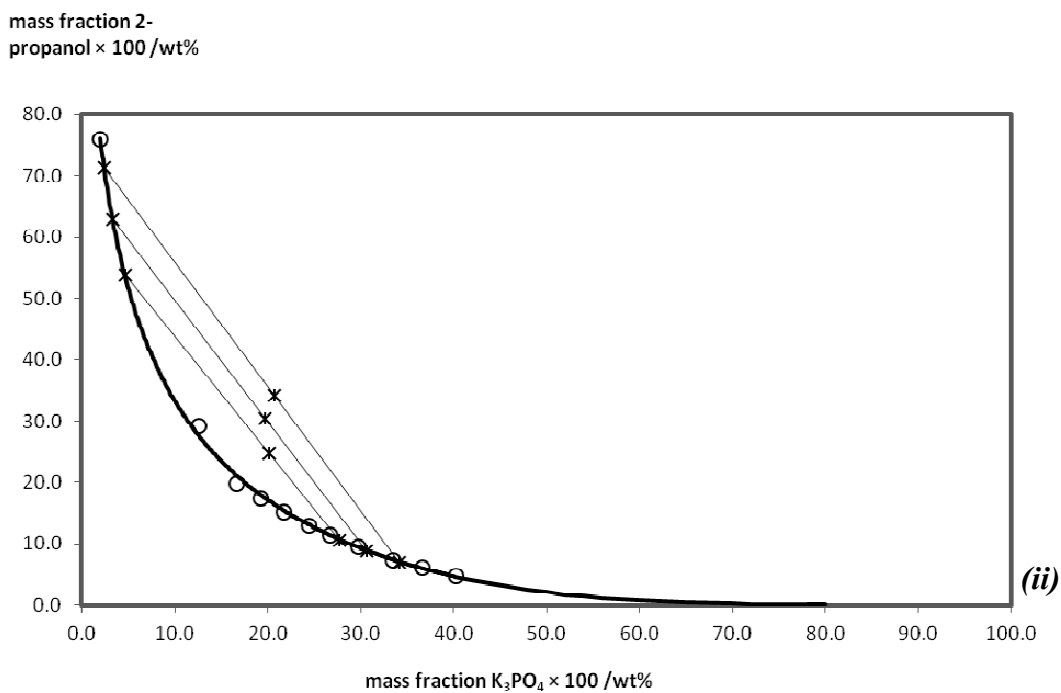
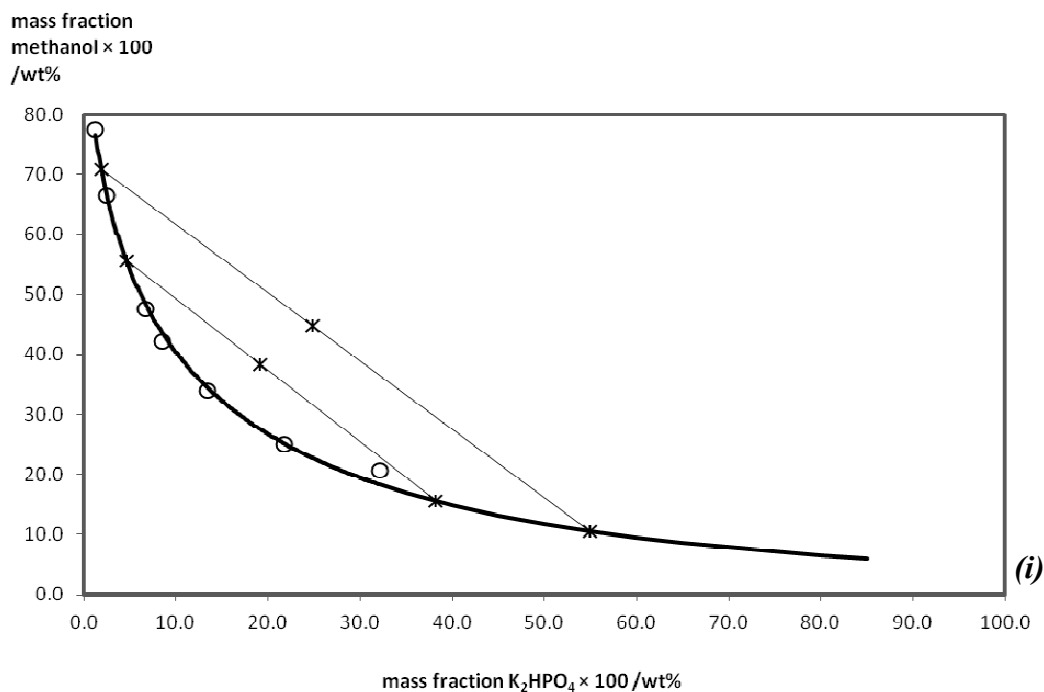


Fig. S2. Phase diagrams for two ternary system composed of: **(i)** methanol + K₂HPO₄ + water and **(ii)** 2-propanol + K₃PO₄ + water. The data presented was prepared at 298 (\pm 1) K and is described by: (○) experimental phase diagram data; (*) TL data. The solid line represents the fit of the experimental data by Equation (1).

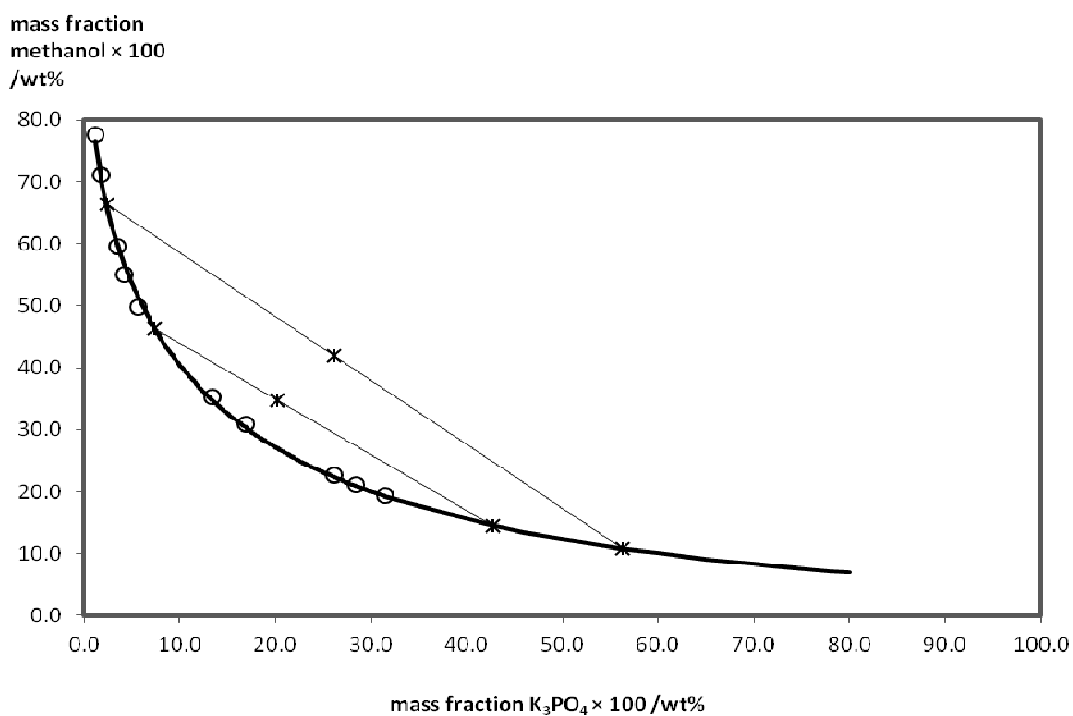


Fig. S3. Phase diagram for the ATPS composed of methanol + K_3PO_4 + water at $298 (\pm 1)$ K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The solid line represents the fitting of the experimental data by Equation (1).

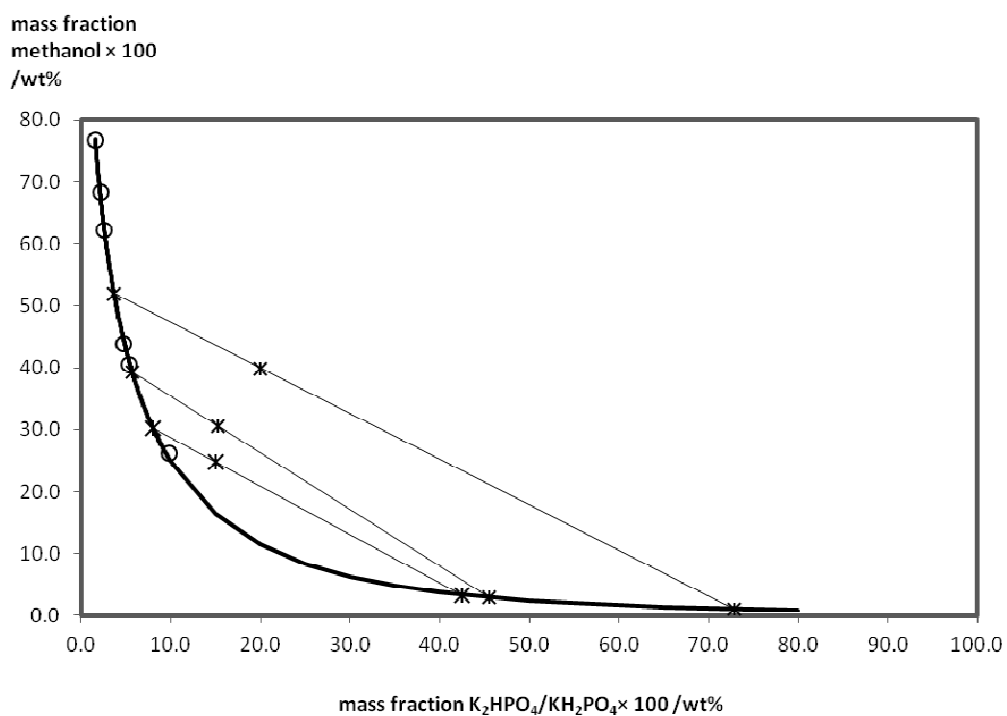


Fig. S4. Phase diagram for the ATPS composed of methanol + K₂HPO₄/KH₂PO₄ + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

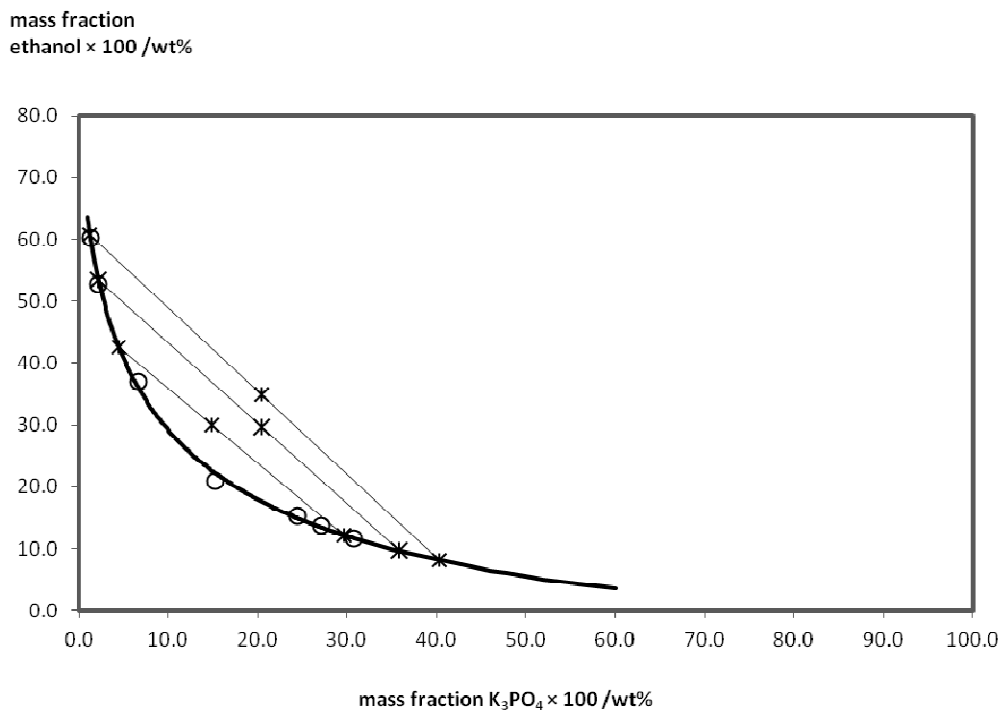


Fig. S5. Phase diagram for the ATPS composed of ethanol + K₃PO₄ + water at 298 (± 1) K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

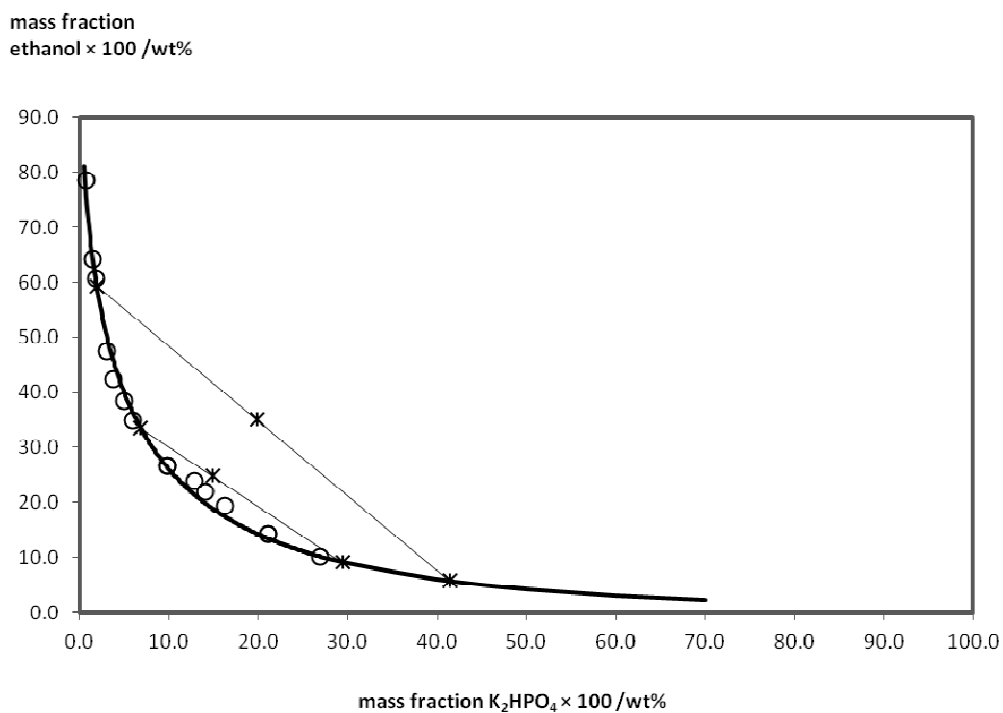


Fig. S6. Phase diagram for the ATPS composed of ethanol + K_2HPO_4 + water at 298 K: (\circ) solubility curve experimental data, ($*$) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

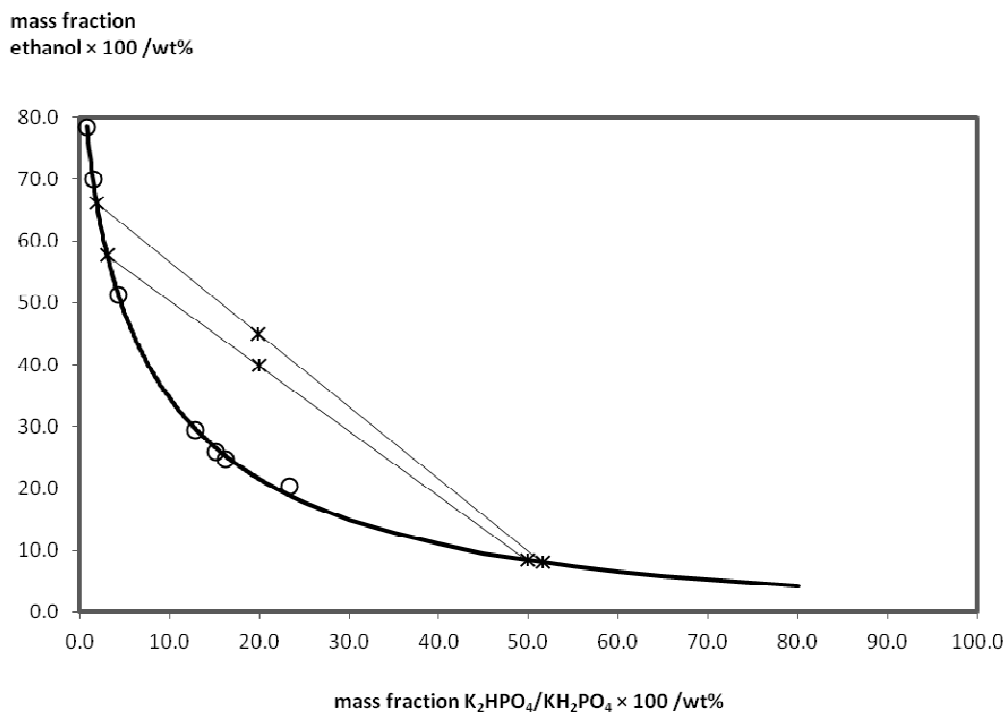


Fig. S7. Phase diagram for the ATPS composed of ethanol + K₂HPO₄/KH₂PO₄ + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

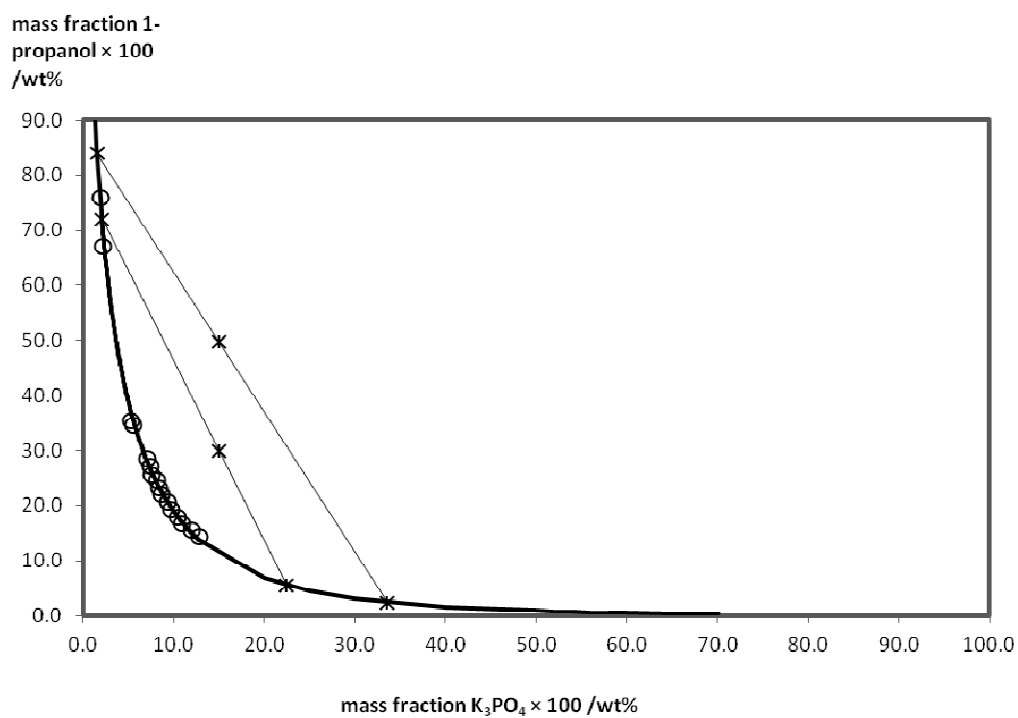


Fig. S8. Phase diagram for the ATPS composed of 1-propanol + K₃PO₄ + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

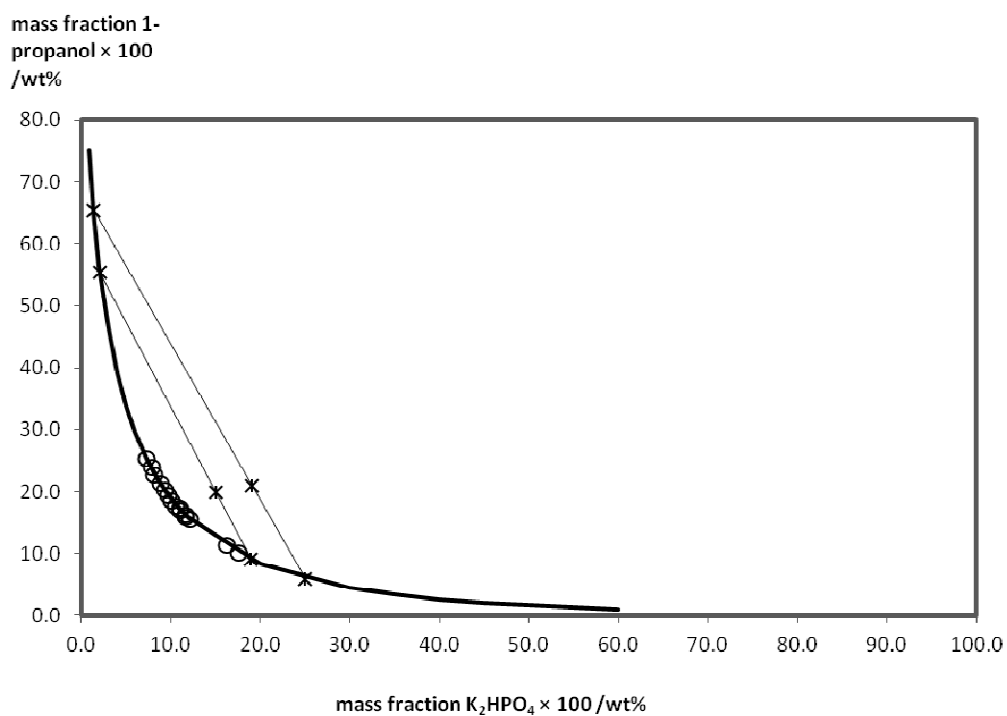


Fig. S9. Phase diagram for the ATPS composed of 1-propanol + K₂HPO₄ + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

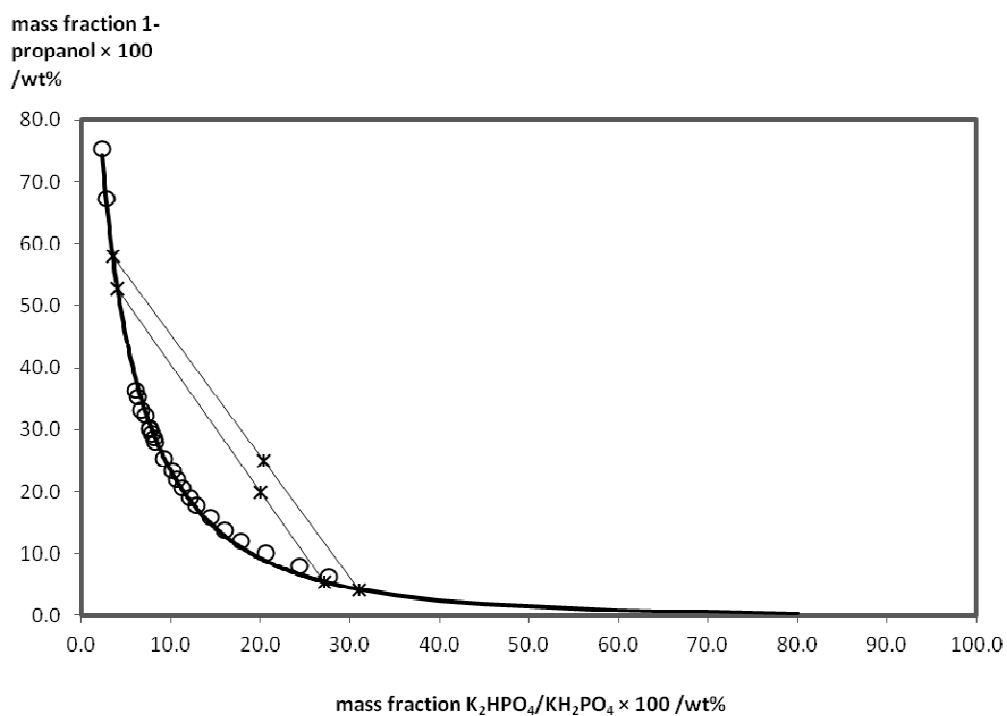


Fig. S10. Phase diagram for the ATPS composed of 1-propanol + K₂HPO₄/KH₂PO₄ + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

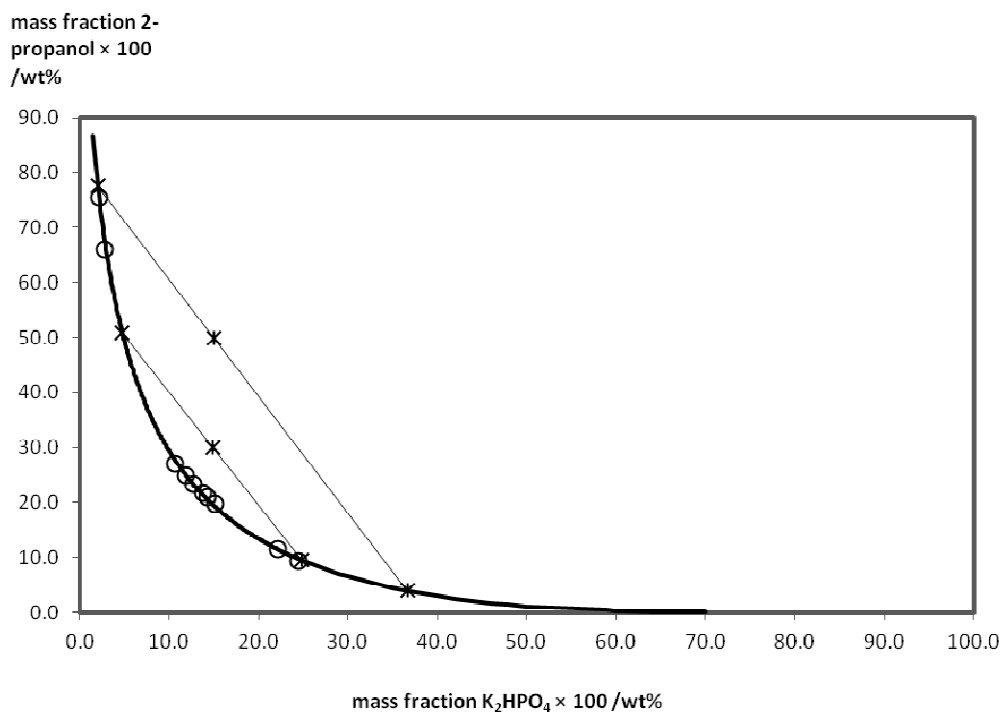


Fig. S11. Phase diagram for the ATPS composed of 2-propanol + K_2HPO_4 + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

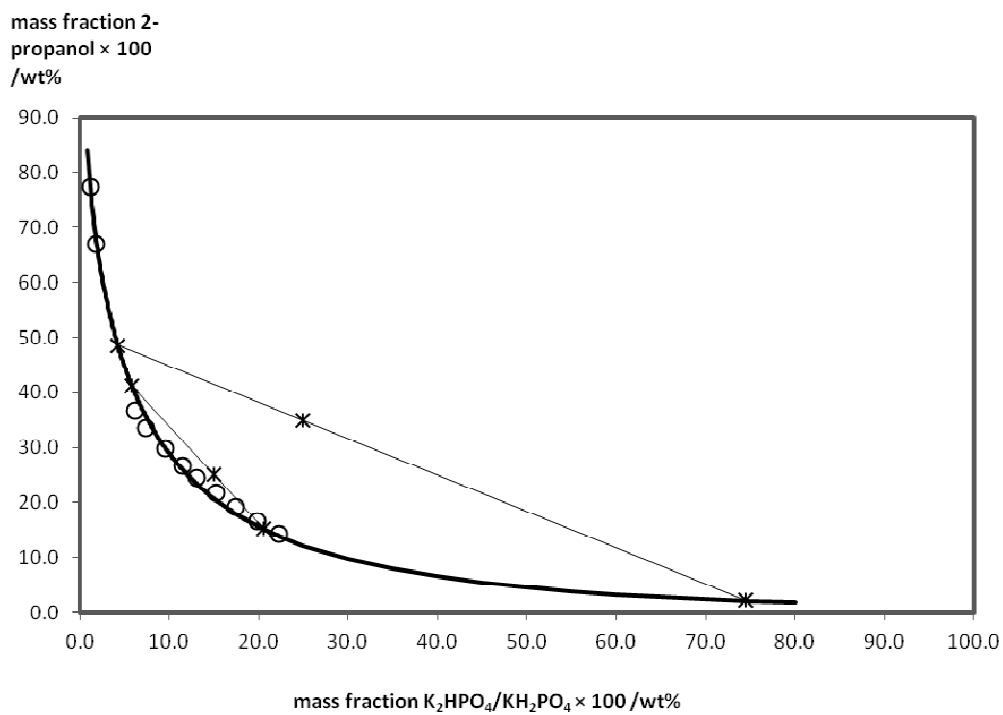


Fig. S12. Phase diagram for the ATPS composed of 2-propanol + K_2HPO_4/KH_2PO_4 + water at 298 K: (○) solubility curve experimental data, (*) TL data. The dashed line represents the fitting of the experimental data by eq (1).

Experimental L-
ascorbic acid mass
concentration /
mg.100 mL⁻¹

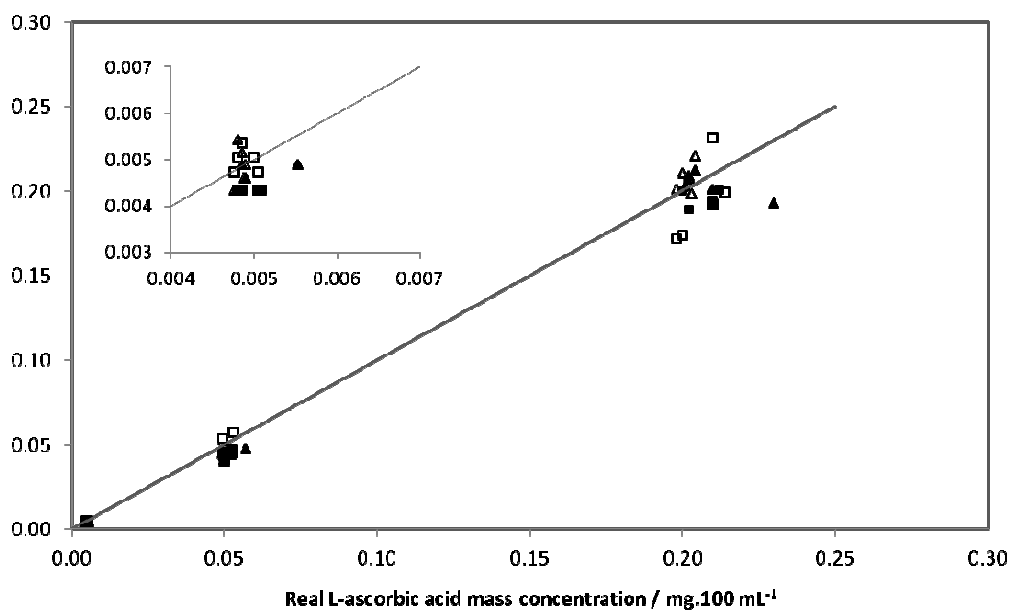


Fig. S13. Graphical representation of the data dispersion between the real mass concentration of L-ascorbic acid used in the preparation of different alcoholic solutions and the respective mass concentrations measured using the Tillman's method. (■) methanol; (□) ethanol; (▲) 1-propanol; (△) 2-propanol.

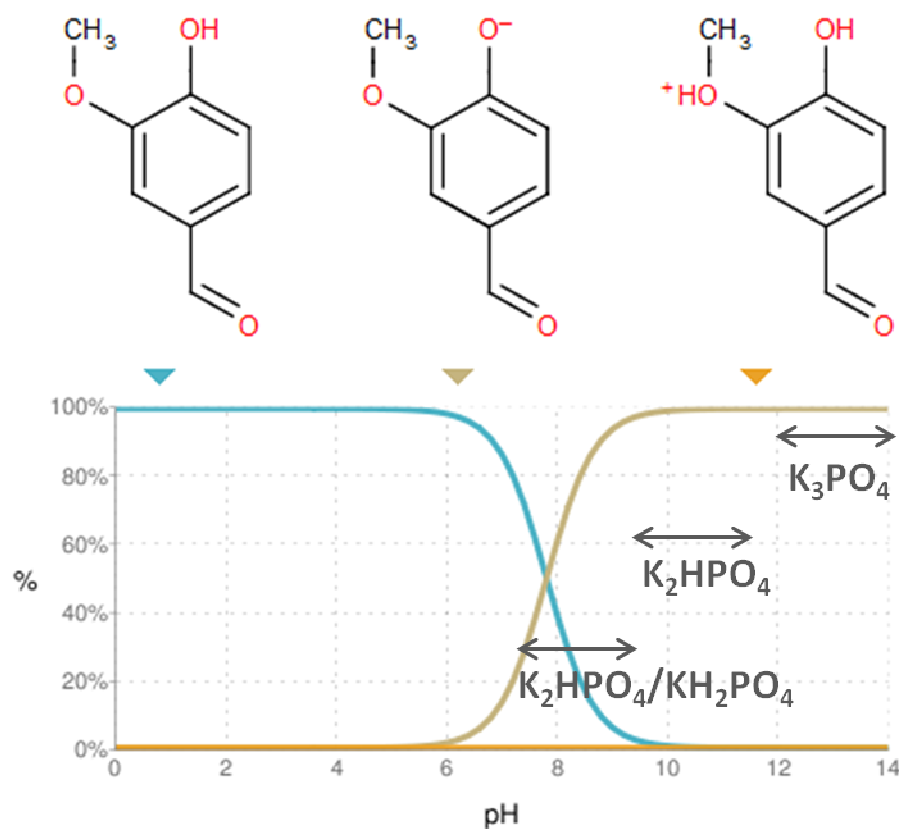


Fig. S14. Illustration of the chemical structures of vanillin obtained for different pH values. This content was adapted from the Chemspider chemical database (<http://www.chemspider.com/>).

Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems

Igor A.O. Reis^a, Samuel B. Santos^a, Frances D.S. Pereira^a, Carla R.S. Sobral^a, Mara G. Freire^b, Lisiane S. Freitas^c, Cleide M.F. Soares^{a,d}, Álvaro S. Lima^{a,d,*}

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

^bDepartamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, CEP: 49000-100, São Cristovão-SE, Brazil

^dInstituto 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

Extraction of rutin from acerola waste was investigated using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems (ATPS). Initially, the partitioning was studied using model systems with pure commercial rutin. The impact of the ATPS constituents and composition, initial amount of rutin, temperature and addition of electrolytes were evaluated. Rutin can be recovered either in the alcohol-or-salt-rich phase depending on the salt used. To validate the optimization process, rutin extraction from acerola waste was further carried out. The results obtained with the real samples are in close agreement with the model systems and validate the optimization tests and support their applicability in bioresource-related processes.

Keywords: rutin, acerola waste, extraction, aqueous two-phase system.

INTRODUCTION

Acerola, also known as West Indian cherry or Barbados cherry, is a native plant from Central America. It is also present in South America, mainly in Brazil, due to its versatile adaptation to soil and climate (1, 2). The wide chemical composition of acerola accounts with a large amount of volatile compounds, such as substances responsible for the aroma, and non-volatile compounds such as vitamin C, anthocyanins, carotenoids and flavonoids, including rutin (3).

The use of acerola as a dietary supplement by humans has positive health effects, namely protective effects against cancer, arteriosclerosis, neurodegenerative diseases and ageing (4–6). Furthermore, according to Zibadi co-workers (7), the daily consumption of bioflavonoids, phenolic acids, and anthocyanin through fruits and vegetable decreases the risk

of degenerative and chronic diseases. For this reason, the consumption of acerola as an *in natura* fruit or by juices and jams is highly recommended for human health maintenance (8).

Nowadays, as a consequence of the industrialization of some fruit-related products, agro-industrial wastes are generated in high quantities resulting in the accumulation of residues with an inherent environmental impact. Besides the fruit pulp by itself, peels and seeds do not receive an adequate attention and they are the main residues resulting from fruit processing approaches (9). Nevertheless, some works already demonstrated that some added-value components, such as antioxidant compounds, are present in higher amounts in the residues of certain fruits when compared with the pulp (10, 11). According to Freitas and co-workers (6), the Brazilian industry uses 34.4 thousand tons of acerola (7.16% of the total fruits) and produces 18.0 thousand tons of juice and pulp (52.3%) and 16.4 thousand tons of waste (47.7%). In this context, there is a large interest in finding sustainable processes to reuse and take the maximum value of those wastes.

Among the antioxidant compounds present in acerola, rutin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-3- β -D-rutinoside or quercetin-3-rutinosid) is a non-toxic bioflavonoid constituted by the flavonol quercetin and the disaccharide rutinose (12, 13). The chemical structure of rutin is depicted in Fig. 1.

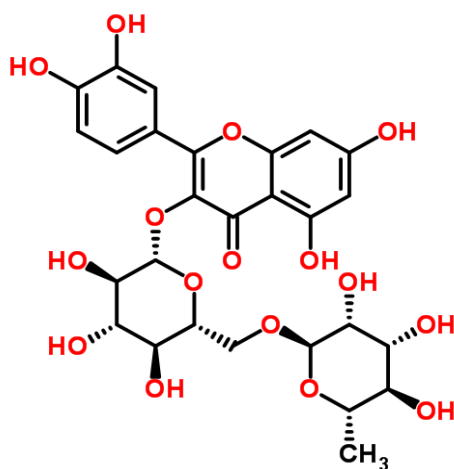


FIG. 1. Molecular structure of rutin.

Traditionally, rutin is extracted from biomass or complex matrices making use of organic solvents such as ethanol (14). More modern techniques, such as supercritical fluid extraction (15), microwave-assisted extraction (16), pressurized liquid extraction (17), solid phase micro-extraction (18) and ultrasound-assisted extraction (19, 20) have also been proposed. However, these alternatives usually require more drastic conditions, namely high temperatures and pressures, and they also depend on more sophisticated equipment turning the current extraction in an expensive and complex process.

In order to eliminate some of the disadvantages mentioned before, aqueous two-phase systems (ATPS) can be regarded as alternative liquid-liquid extraction techniques. Due to their high content in water they have been labeled as biocompatible systems. Indeed, they have been successfully applied in the extraction of several biomolecules such as enzymes (21, 22), alkaloids (23), antibiotics (24), dyes (25), lithospermic acid B (26) and aroma compounds (27). This large spectrum of applications is justified by the easiness of scaling-up the process, and high extraction efficiencies and high yields usually attained (28).

ATPS are formed in aqueous media by the dissolution of two incompatible polymers (29) or a polymer and a salt (30). In both examples there is the formation of two macroscopic liquid phases with water as the major constituent (31). Despite these conventional ATPS, more recent works have shown the possibility of forming liquid-liquid systems by the combination of an organic solvent and a salt (32) or by the addition of an inorganic salt to an aqueous ionic liquid solution (33, 34). Particularly, the use of polymer-polymer and polymer-salt systems has some disadvantages such as the high cost of the polymer, phases of high viscosity, a slow phase separation and a challenging recyclability of the phase forming components (35). On the other hand, ATPS formed by alcohols and salts are of low cost, allow the easy recovery of the alcohol by evaporation or distillation approaches, are of low

viscosity, and usually lead to high extraction efficiencies and purification levels in a single-step procedure (36).

In this work, the use of ATPS for the extraction and recovery of rutin from acerola wastes was evaluated. Different ATPS composed of alcohol + potassium phosphate salts (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol, and K_3PO_4 , K_2HPO_4 and potassium phosphate buffer composed of K_2HPO_4/KH_2PO_4), and whose phase diagrams were recently published by our group (32), were used. As a first and preliminary methodology it was investigated the partitioning behavior of commercial and high purity rutin and for which the several constituents of each ATPS, the composition of the biphasic mixture, the concentration of rutin, the temperature (278.15 to 308.15 K) and the addition of electrolytes (NaCl) were investigated and optimized. After the optimization step with model systems, the optimized conditions were further employed in the extraction of rutin from acerola waste.

EXPERIMENTAL

Materials

Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and potassium phosphate (K_3PO_4) were purchased at Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The alcohols have purities higher than 99%. The phosphate salts are more than 98% pure. Rutin (≥ 97 wt % pure) was acquired at Acros Organics (New Jersey, USA). Ultrapure and double distilled, passed by a reverse osmosis system and further treated with a Milli-Q plus 185 water purification apparatus, was used in all experiments. Acerola at a mature stage was purchased in a regular supermarket in Aracaju, Brazil. The fruit was squeezed using a domestic depulper and the waste generated was kept at 253.15 K until use.

Methods

Partitioning studies of rutin in model ATPS

The studied model ATPS are composed of different alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and several potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and the buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4). The phosphate buffer is constituted by the mixture of the two salts K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in the proper proportions (pH = 7.0; Henderson-Hasselbalch equation equivalents = 1.087).

The biphasic systems were prepared in graduated centrifuge tubes (15 mL) by weighing the appropriate amounts of alcohol (40-60 wt%) and potassium phosphate salts (10-20 wt%) taking into account the phase diagrams previously reported (32). To these systems it was added aqueous solutions containing rutin at 25, 50, 70, 100 and 200 mg/L. The total weight of each ATPS was 14.0 g. After, the mixtures were stirred for 2 min and then centrifuged at 3000 g for 10 min. The graduated tubes were then placed at the respective temperature (from 278.15 to 308.15 K), for at least 12 hours and within ± 1.0 K, using a thermostatic bath MARCONI MA-127 (Brazil). It should be remarked that the vials were kept closed during this period to avoid the alcohol vaporization. The two phases were then cautiously separated and collected for the determination of their volume and weight. Finally, rutin was quantified in both the top and bottom phases. Details on the quantification of rutin are described below. The quantification of rutin was performed in three assays and the average partition coefficients, average extraction efficiencies and respective standard deviations were calculated. It should be noted that for all studied ATPS, the top phase is the alcohol-rich phase while the bottom phase corresponds to the salt-rich phase.

The partition coefficient of rutin (K_{rut}) is defined as the ratio between the concentration of rutin in the top phase (C_T) to that in the bottom phase (C_B) according to,

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

In order to evaluate the rutin percentage extraction efficiencies ($EE_{rut}\%$) and the volume ratio (R_v) in each ATPS the following equations were used,

$$R_v = \frac{V_T}{V_B} \quad (2)$$

$$EE_{rut}\% = 100 \times \frac{K_{rut} \times R_v}{1 + K_{rut} \times R_v} \quad (3)$$

where V is phase volume and T and B correspond to the top and bottom phases, respectively.

Thermodynamic functions

The thermodynamic functions associated to the migration phenomenon of rutin, namely the Gibbs free energy (ΔG_m°), the enthalpy (ΔH_m°) and the entropy of transfer (ΔS_m°) were determined according to equations (4) and (5),

$$\ln(K_{rut}) = \frac{\tilde{\lambda}_{tr} H_m^0}{R} - \frac{1}{T} - \frac{\tilde{\lambda}_{tr} S_m^0}{R} \quad (4)$$

$$\tilde{\lambda}_{tr} G_m^0 = \tilde{\lambda}_{tr} H_m^0 - T \tilde{\lambda}_{tr} S_m^0 \quad (5)$$

where T is the temperature, K_{rut} is the partition coefficient of rutin and R is the universal gas constant ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

Extraction and partitioning of rutin from acerola waste

Acerola waste samples (10 g of peels and seeds), after a depulping process, were dispersed in 25 mL of an aqueous solution of 1-propanol at 46 or 60 wt%. The vials were kept sealed and at 298.15 K under constant agitation, at 200 rpm and for 24 h, using a shaker

Marconi MA-095. After 24 h, the samples were filtrated through 0.42 μ m microporous membranes. The inorganic salts (K_2HPO_4/KH_2PO_4 or K_3PO_4) and water were then added to prepare the respective ATPS in the required concentrations up to a total weight of 14 g. The compositions of each component in a given ATPS and the optimized conditions determined with the model systems were used in this step. In particular, the systems composed of 1-propanol (50 wt%) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) and 1-propanol (40 wt%) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (20 wt%) + H_2O (40 wt%) were employed for maximizing the concentration of rutin in the top phase and 1-propanol (50 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) was used for maximizing the partition of rutin into the bottom phase. The mixtures were then stirred for 5 min and finally centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. These systems were further placed at 298.15 K for 12 h to reach the equilibrium. Both phases were carefully separated and weighed, the volume of each phase was registered, and the rutin was quantified in the top phase by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The quantification of rutin was only determined in the alcohol-rich phase due to the high salt content in the bottom phase. Thus, the rutin concentration on the bottom phase was determined by the mass balance of the rutin concentration on the initial alcoholic extract and its concentration at the top phase.

Rutin quantification

The concentration of rutin in both phases of the model systems was determined by UV-Vis spectroscopy, using a Varian Cary-50 spectrophotometer UV-visible Bio apparatus, at 350 nm and using a calibration curve previously established. The mass balance of rutin was always confirmed and is within ± 5.5 %. Interferences of both the inorganic salt and the alcohol in the analytical method were taken into account and found to be insignificant at the dilutions performed. The quantification of rutin was carried out in three assays and the

average partition coefficients, average extraction efficiencies and respective standard deviations were calculated.

The concentration of rutin extracted from acerola waste was determined by HPLC analysis according to a method initially described by Fang and co-workers (37) with slight modifications. Chromatographic separations were performed on a Discovery[®] HS C18 (Supelco, USA) column (26.0 cm x 4.6 mm, 5 μ m). The HPLC equipment consists on a Varian Prostar (Australia) LC Detector series pumping system with an UV detector set at 360 nm and a Galaxie chromatography data system software. Two solvents with a constant flow rate of 1.0 mL/min were used: solvent A which is composed of 20% of acetonitrile and 5% of methanol in water (pH 3.0), and solvent B which is constituted by 55% of acetonitrile and 15% of methanol in water (pH 3.0). All the solvents are of HPLC grade. The gradient elution program was as follows for solvent B: 2% from 0–15 min, 2–28% from 15– 28 min, 28–36% from 28–40 min, 36% from 40–44 min, 36–80% from 44–45 min, 80% from 45–52 min. At least three quantifications were performed for each system and the respective average values and standard deviations were calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work it was investigated the use of alcohol-salt-based ATPS as an alternative platform for the extraction and recovery of rutin from acerola waste. As a first approach the extraction of rutin was studied and optimized using model systems with commercial and high purity rutin. Different parameters, namely the type of alcohol and phosphate salt, the composition of the system, the rutin concentration, the temperature of extraction and the addition of NaCl as an additional electrolyte, were evaluated regarding the partition coefficients and extraction efficiencies obtained. As a second and validation step, the optimized ATPS were further used for the partitioning of rutin extracted from acerola waste.

Partitioning Studies of Rutin in Model ATPS

The influence of the alcohol and salt, as well as the initial concentration of rutin added to each ATPS, was investigated by means of the partition coefficients and extraction efficiencies obtained. The concentration of rutin used varied between 25 and 200 mg/L. The results obtained at 298.15 K are depicted in Fig. 2.

Previously we have published (32) the pH values of the coexisting phases of the systems studied here. For the systems composed of K_3PO_4 the media is highly alkaline with pH values ranging between 12.38 and 13.22 while for the remaining systems the pH values are lower and more close to the pKa of rutin. Thus, at alkaline medium, almost all rutin is negatively charged and preferentially migrates for the most hydrophilic and ionic phase (salt-rich phase). For the remaining systems the amount of charged rutin is lower and the majority of neutral rutin partitions for the most hydrophobic alcohol-rich phase. Indeed, among the ATPS based on KH_2PO_4/K_2HPO_4 and K_2HPO_4 the partition coefficients of rutin are higher in the systems composed of the phosphate buffer – those with the lower pH values and close to 7. The choice of the salts, and subsequently the pH values that they induce in aqueous media, is a dominant parameter in the extraction of biomolecules that suffer speciation as the pH of the solution changes. In the systems considered here there are two aqueous phases of different nature: a predominant hydrophobic phase composed mainly of alcohol and a more hydrophilic and ionic phase constituted majorly by the inorganic salt. These differences in the phases' polarities coupled to the charged or non-charged nature of rutin control the preferential migration for a given phase. Indeed, this trend was already observed in the partition coefficients of gallic acid using ATPS formed by ionic liquids and different inorganic salts (40). In this work (40) it was observed that the neutral and less hydrophilic form of gallic acid, present in the acidic media, is more easily extracted into the most hydrophobic ionic-liquid-rich phase. On the other hand, gallate, the charged conjugate base of gallic acid present

in neutral or alkaline pH solutions, preferentially migrated for the charged salt-rich phase (40).

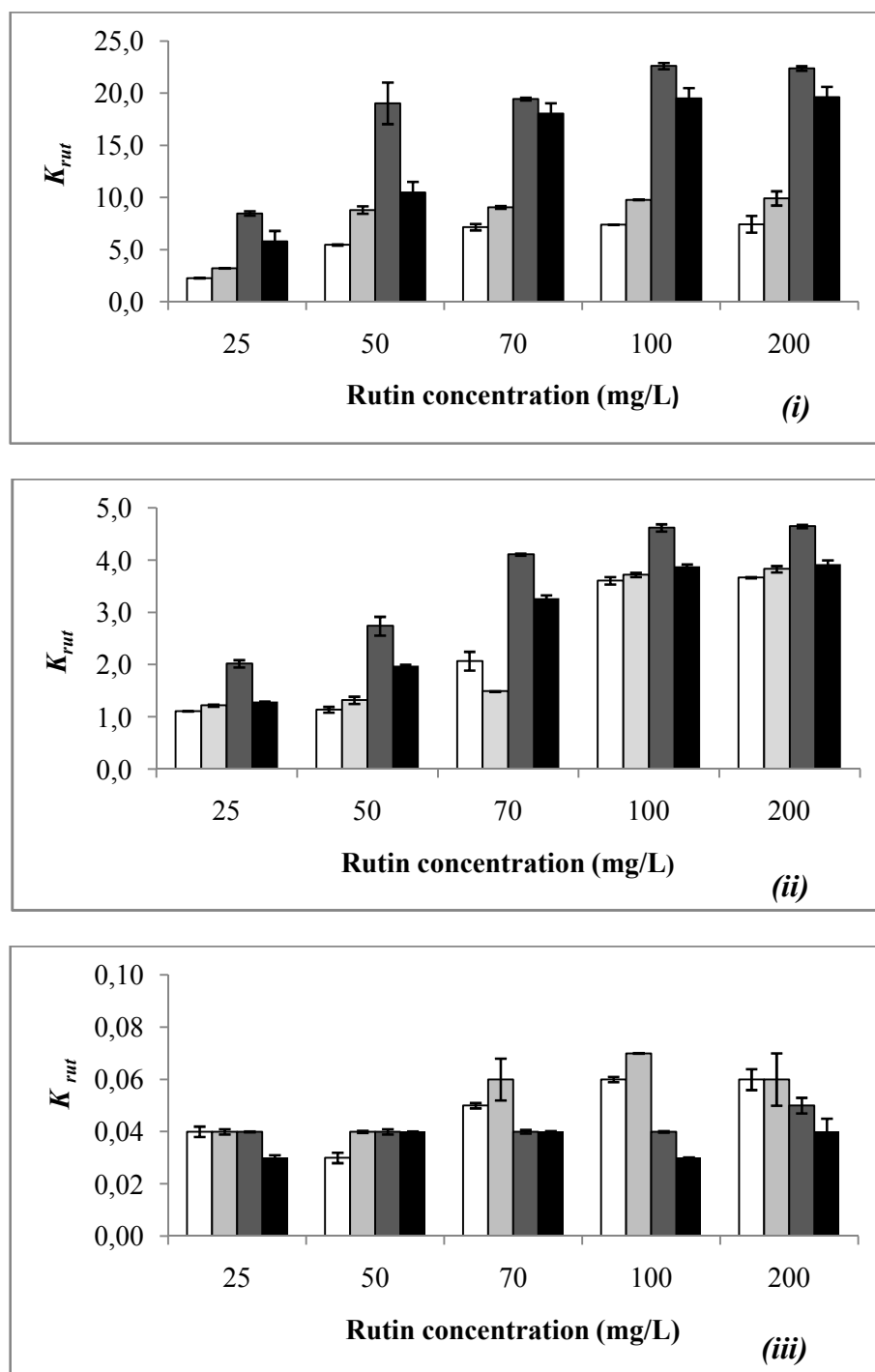


FIG. 2. Partition coefficients of rutin, K_{rut} , in the several alcohol-salt ATPS at 298.15 K as a function of initial rutin concentration. Alcohol: \square - methanol, \blacksquare - ethanol, \blacksquare - 1-propanol, \blacksquare - 2-propanol; potassium phosphate salts: (i) KH_2PO_4/K_2HPO_4 , (ii) K_2HPO_4 , and (iii) K_3PO_4 . All ATPS are composed of 50 wt% of alcohol and 15 wt% of salt.

For ATPS composed of the same salt and different alcohols, the partition coefficients of rutin decrease in the order: methanol < ethanol < 2-propanol < 1-propanol. Rutin is poorly soluble in water and highly soluble in alcohols supporting thus the preferential migration of rutin for the alcohol-rich phase in most cases. In general, the solubility of rutin increases with the alkyl chain length of the alcohol, e.g., with the increase on the alcohol hydrophobicity (41). This increased solubility in alcohols with longer aliphatic chains supports the higher partition coefficients observed in systems formed by propanol towards the lower partition coefficients observed in the systems constituted by methanol. Regarding the results obtained with ATPS constituted by the two isomers of propanol, 1-propanol and 2-propanol, the partition coefficients of rutin are higher in the 1-propanol-based systems because of its higher hydrophobicity. The higher hydrophobicity of 1-propanol isomer is sustained by its higher octanol-water partition coefficient ($K_{ow} = 1.78$) compared to that of 2-propanol ($K_{ow} = 1.12$) (42). This straight pattern is less visible in the systems composed of K_3PO_4 . Nevertheless, it should be remarked that more complex phenomena take place in these ATPS due to the charged character of rutin at alkaline medium.

The influence of the initial concentration of rutin, ranging from 25 to 200 mg/L, was also evaluated. In general, and as seen in Fig. 2, the partition coefficients of rutin increase with the concentration of the solute. This trend is independent of the alcohol or salt employed. Nonetheless, this pattern is less pronounced in the systems with K_3PO_4 . In the ATPS formed by K_2HPO_4 and K_2HPO_4/KH_2PO_4 the improved migration for the alcohol-rich phase with the increase on the initial rutin content can be a main result of solute-solute interactions such as $\blacktriangle \cdots \blacktriangle$ interactions (non-covalent interactions between the aromatic rings) and improved hydrogen-bonding ability between the hydroxyl groups. This pattern was already observed by Cláudio and co-workers (40) with the partitioning of vanillin in ATPS composed of ionic liquids and salts. Furthermore, Tavagnacco and co-workers (43) already demonstrated the

presence of $\blacktriangle \cdots \blacktriangle$ interactions in aromatic solutes when dissolved in aqueous media using molecular dynamics simulations.

In summary, it was shown that the preferential migration of rutin for a given phase is versatile and mainly depends on the pH of the aqueous media. For instance, the biomolecule can be recovered in the top phase (with extraction efficiencies ranging between 91.62% and 98.23%) or in the bottom phase (with extraction efficiencies within 8.16% and 23.04%) (data not shown).

In order to infer on the effect of the composition of the ATPS towards the partitioning of rutin, several experiments were carried out varying the concentration of 1-propanol in the total mixture, from 40 to 60 wt%, while maintaining the concentration of the $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ mixture of salts at 20 wt%. It should be noted that according to the phase diagrams published before (32) the lower limit of 1-propanol capable of ensuring the formation of two liquid phases is 40 wt%. The partition coefficient and extraction efficiency results are shown in Fig. 3.

Increasing the amount of 1-propanol leads to a slight decrease in the partition coefficients of rutin albeit no significant changes were observed in the extraction efficiencies. However, in all cases, rutin was almost completely extracted to the top phase with extraction efficiencies in the order of 98%.

After the evaluation of the 1-propanol concentration we further analyzed the effect of the concentration of the mixture of the salts $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ from 10 to 20 wt%. In these studies the concentration of 1-propanol was maintained at 40 wt%. It should be remarked that the maximum concentration of salt than can be used is 20 wt% since higher values lead to the precipitation of the salt and to fall into the solid-liquid region. The partition coefficients and extraction efficiencies of rutin are depicted in Fig. 3.

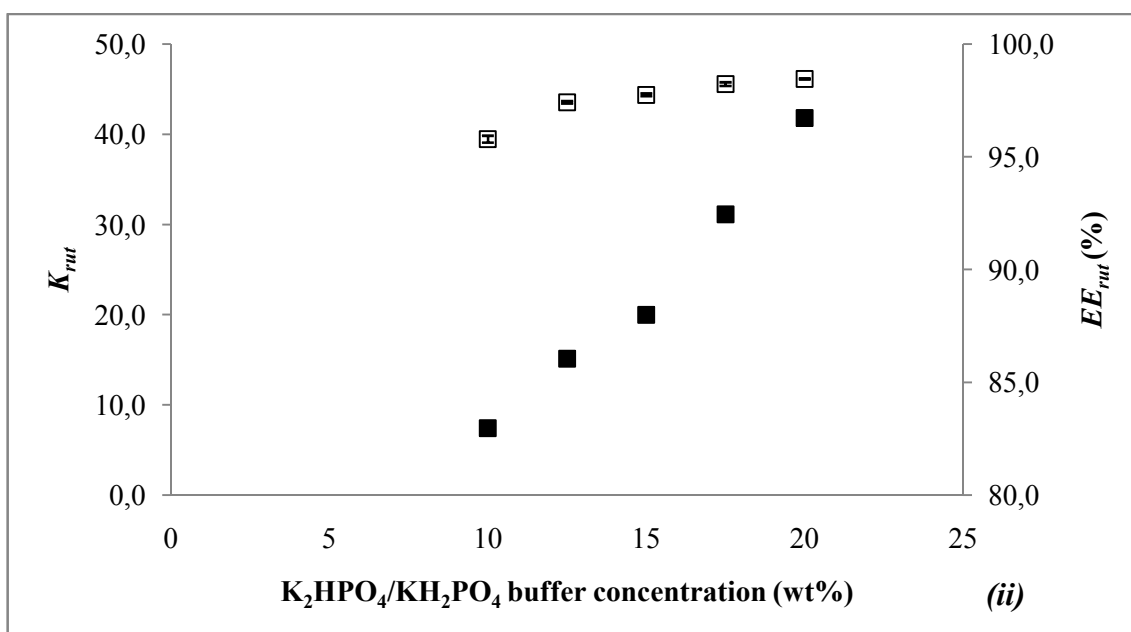
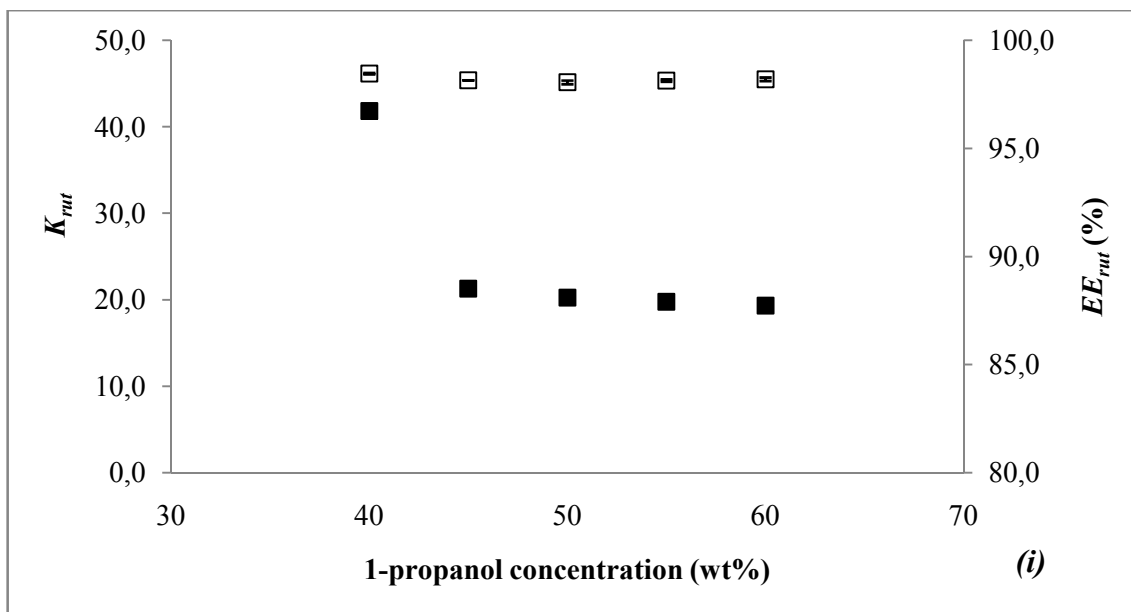


FIG. 3. Influence of the 1-propanol concentration in the ATPS containing K_2HPO_4/KH_2PO_4 at 15 wt% **(i)** and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer concentration in the ATPS containing 1-propanol at 40 wt % **(ii)** at 298.15 K in the partition coefficient (■) and extraction efficiency (□) of rutin.

Contrarily to what observed with the alcohol concentration effect, the increase of the salt concentration leads to higher partition coefficients of rutin, *i.e.*, to a higher ability of rutin to migrate for the alcohol-rich phase. In accordance, the extraction efficiencies of rutin

increased from 95.8 to 98.5%. Rutin was almost completely extracted to the alcohol-rich phase with the higher amount of salt. This phenomenon is a main result of the salting-out effect of the salt over rutin which forces the biomolecule migration for the other phase. Wu and co-workers (36) studied different solvents and reported extraction efficiencies of 13.0% (water), 80% (ionic liquid - $[C_8mim]Cl$) and 90.0% (methanol). All these values are lower than those found in this work with the enhanced ATPS.

The influence of temperature on the rutin extraction was also studied using ATPS composed of 1-propanol at 40 wt% and K_2HPO_4/KH_2PO_4 at 20 wt%. The temperature of equilibrium was changed from 278.15 to 308.15 K and the results obtained are shown in Fig. 4.

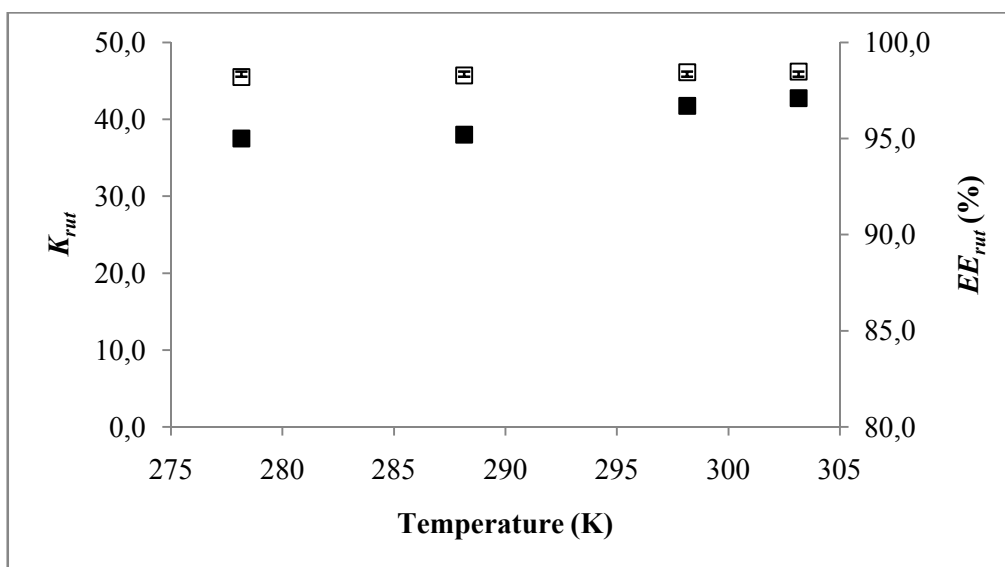


FIG. 4. Effect of temperature on the partition coefficient (■) and extraction efficiency (□) of rutin in the ATPS composed of 1- propanol at 40 wt % and K_2HPO_4/KH_2PO_4 at 20 wt%.

In general, an increase in temperature slightly favors the extraction of rutin for the alcohol-rich phase. At the highest temperature of 303.15 K the partition coefficient reaches the value of 43.1 ± 0.3 . On the other hand, the extraction efficiencies were almost constant at

all temperatures because a change in temperature also leads to different volumes of the phases.

In order to calculate the thermodynamic functions of transfer of rutin, namely the molar Gibbs energy (ΔG_m^o), the molar enthalpy (ΔH_m^o) and the molar entropy of transfer (ΔS_m^o), equations (4) and (5) were used. The calculated value for ΔG_m^o (-13.20 KJ/mol) is negative reflecting therefore the spontaneous and preferential partitioning of rutin for the alcohol rich-phase ($K_{rut} > 1$). The migration process of rutin from the salt-rich phase to the alcohol-rich phase is endothermic ($\Delta H_m^o = 3.97$ KJ/mol) and mainly governed by entropic forces ($\Delta S_m^o = 44.30$ J/mol.K) since $T \Delta S_m^o > \Delta H_m^o$.

ATPS formed by 1-propanol (40 wt%) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 (20 wt%) were chosen to study the effect of the addition of further electrolytes. The effect of the NaCl addition (from 0.5 a 10.0 wt%) in partition coefficient of rutin was investigated and the results are shown in Fig. 5.

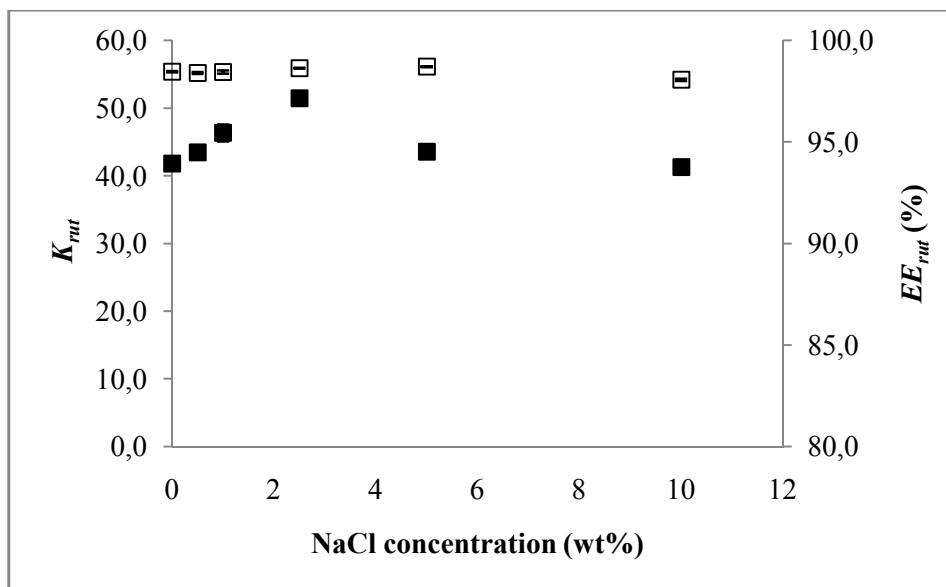


FIG. 5. Effect of the concentration of NaCl in the partition coefficient (■) and the extraction efficiency (□) of rutin in the system composed of 1-propanol (40 wt%) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 (20 wt%) at 303.15 K.

A close examination of the results indicates a slight increase of K_{rut} from 42.76 (without NaCl addition) to 51.47 when 2.5 wt% of NaCl was added. Hence, the addition of an additional electrolyte forces the migration of rutin for the alcohol-rich phase. The addition of the electrolyte is mainly expected to be retained in the salt-rich phase turning this phase into a more hydrophilic and charged one. On the other hand, for concentrations higher than 2.5 wt% of NaCl the opposite trend is observed. The addition of large amounts of NaCl decreases the partition coefficients of rutin. This result can be a direct consequence of the dissolution of NaCl that at larger concentrations tends to partition also for the alcohol-rich phase and blocking the partitioning of the biomolecule for the most hydrophobic phase. In fact, the partitioning of biomolecules depends on hydrophobicity/hydrophilicity balance of the coexisting phases as well as on the charge of the compounds (44).

Extraction and Partitioning of Rutin from Acerola Waste

To validate the optimized and model extractions using the commercial and high purity rutin, the extraction of rutin from acerola waste (peels and seeds) was further conducted. Besides the optimal conditions gathered for the extraction of rutin to the top phase with the ATPS composed of 40 or 50 wt% of 1-propanol + 20 wt% of K_2HPO_4/KH_2PO_4 it was also studied the system formed by 50 wt% of 1-propanol + 15 wt% of K_3PO_4 + 35 wt% of water. The three systems allow us to infer on the extraction of rutin for the two different phases. While in the first two systems rutin preferentially partitions for the alcohol-rich phase, in the third system with K_3PO_4 the opposite trend was observed. These three ATPS ensure that the system conditions can be manipulated and that the biomolecule can be recovered in a preferential phase. The extractions carried out with acerola waste were conducted at 298.15 K.

Firstly, the extraction of rutin from acerola waste was performed with aqueous solutions of 1-propanol at 46 wt% and 60 wt%. Then, the respective ATPS were formed by the addition of the appropriate amounts of water and salts, and the partitioning of rutin obtained from a real sample was analyzed. The results obtained from acerola waste are depicted in Fig. 6.

The extraction yields of rutin from the acerola peels and seeds with the 46 and 60 wt% aqueous solutions of 1-propanol was 0.54 ± 0.01 mg/g and 0.527 ± 0.003 mg/g, respectively. Hence, there is an almost insignificant effect of the alcohol concentration from 40 to 50 wt%. The low influence of the alcohol concentration towards the extraction yields of rutin was already verified by Peng and co-workers (45). For comparison purposes, Nunes and co-workers (46) obtained extraction yields of rutin from acerola (*Malpighia glabra* L.) of the order of 1.5 mg/g, demonstrating that 33.3 wt% of rutin is present in acerola waste.

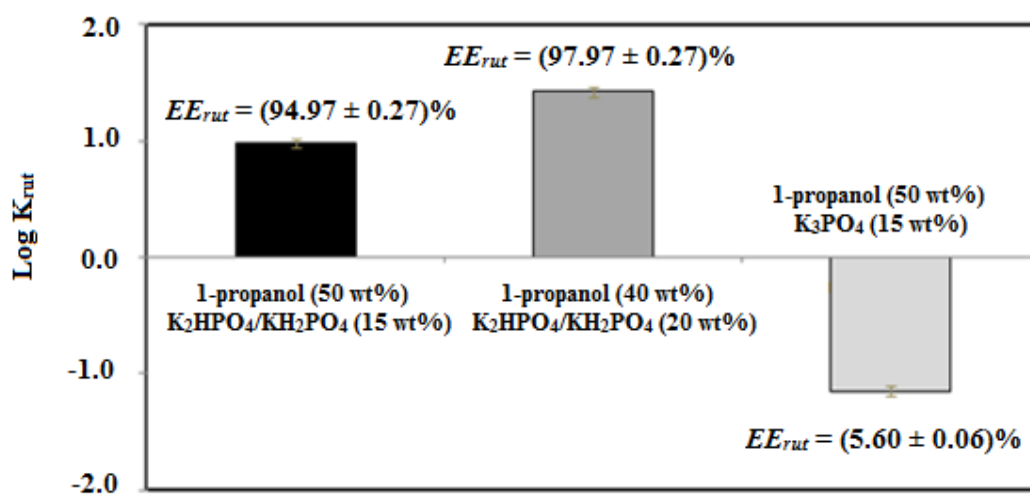


FIG. 6. Partition coefficients and extraction efficiencies of rutin extracted from the peels and seeds of acerola at 298.15 K.

Comparing the results of K_{rut} obtained for the systems composed of 1-propanol + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, it is observed that reducing the concentration of 1-propanol and increasing the amount of the salt there is an increase in the partition coefficient of rutin, and as observed before with the model systems. For instance, in the system with the optimized partition

coefficients (40 wt% of 1-propanol + 20 wt% of K_2HPO_4/KH_2PO_4), the K_{rut} in the model systems and in the ones with rutin from the biomass extractions is 26.31 and 45.58, respectively. In the same line, the extraction efficiencies are 97.67 % and 98.41 %, respectively. Hence, it seems that rutin from acerola waste is even better extracted for the alcohol-rich phase than the commercial rutin in the K_2HPO_4/KH_2PO_4 -based ATPS. The extraction efficiencies obtained with the acerola waste are also slightly superior although the results are very close and in the same order of magnitude. In this context, the optimization tests carried out with the model systems apply to the rutin extracted from the acerola samples.

In order to tailor the extraction of rutin for the salt-rich phase, the system constituted by 1-propanol (50 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + water (35 wt%) was also investigated. K_{rut} and $EE_{rut}\%$ are 0.072 and 5.60% with the model systems, whereas with rutin extracted from acerola waste these parameters are 0.068 and 12.49%, respectively. These values are in close agreement and, in general, the optimization investigations and optimal conditions gathered with the model systems can be applied to the extraction of rutin from bioresource samples.

CONCLUSIONS

In this work it was evaluated the ability of ATPS composed of alcohols and potassium phosphate salts to extract and recover rutin in one of the coexisting phases. It was observed that the studied ATPS are versatile since the biomolecule can be recovered either in the alcohol- or in the salt-rich phase. This trend is mainly dependent on the salt employed which leads to different pH values in solution. The differences in the phases' polarities coupled to the charged or non-charged nature of rutin control the preferential migration for a given phase. Indeed, it was observed that the neutral and less hydrophilic form of rutin, present in the lower pH values media, is more easily extracted into the most hydrophobic alcohol-rich phase whereas the charged conjugate base of rutin, present in highly alkaline pH solutions,

preferentially migrates for the salt-rich phase. Regarding the effect of the alcohol employed, and in general, an increase in the alkyl chain length of the alcohol or an increase in its hydrophobicity conducts to higher extraction efficiencies of rutin into the top phase. The highest partition coefficient (51.47) and extraction efficiency (98.64 %) were obtained in ATPS consisting of 1-propanol (40 wt%) + K₂HPO₄/KH₂PO₄ (20 wt%) + water (40 wt%) and 2.5 (wt%) NaCl at 298.15 K. To validate the optimization tests conducted with the model systems using commercial rutin, the extraction of rutin from acerola wastes (peels and seeds) was initially carried out with alcohol aqueous solutions which were further applied in the composition of a given ATPS. The results obtained with rutin extracted from the real samples are in close agreement with the model systems and validate all the optimization investigations and support their further applicability.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC for the financial support and scholarship of I.A.O. Reis, and CAPES/Brazil for the scholarship of S.B. Santos. The authors also thank Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT/Portugal)) for the post-doctoral grant SFRH/BPD/41781/2007 of M.G. Freire.

REFERENCES

1. Mezadri, T.; Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. (2008) Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *J. Food Compos. Anal.*, 21: 282.
2. Rosso, V.V.; Mercadante, A.Z. (2005) Carotenoid of two Brazilian genotypes of acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) from two harvest. *Food Res. Inter.*, 38: 1073.

3. Vendramini, A.L.; Trugo, L.C. (2000) Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chem.*, 71: 195-198.
4. Mercali, G.D.; Sarkis, J.R.; Jaeschke, D.P.; Tessaro, I.C.; Marczak, L.D.F. (2011) Physical properties of acerola and blueberry pulps. *J. Food Eng.*, 106: 283.
5. Oliveira, F.C.; Coimbra, J.R.S.; Silva, L.H.M.; Rojas, E.E.G.; Silva, M.C.H. (2009) Ovomucoid partitioning in aqueous two-phase systems. *Biochem. Eng. J.*, 47: 55.
6. Freitas, C.A.S.; Maia, G.A.; Costa, J.M.C.; Figueiredo, R.W.; Sousa, P.H.M. (2006) Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. *Rev. Bras. Agrociênc.*, 12: 395.
7. Zibadi, S.; Farid, R.; Moriguchi, S.; Lue, Y.; Foo, L.Y.; Tehrani, P.M.; Ulreich, J.B.; Watson, R.R. (2007) Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutr. Res.*, 27: 408.
8. Caetano, P.K.; Daiuto, E.R.; Vieites, R.L. (2012) Característica físico-química e sensorial de geléia elaborada com polpa e suco de acerola. *Braz. J. Food Technol.* 15: 191.
9. Soong, Y.Y.; Barlow, P.J. (2004) Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.*, 88: 411.
10. Ajila, C.M.; Bhat, S.G.; Prasada Rao, U.J.S. (2007) Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem.*, 102: 1006.
11. Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Li, Y.; Xu, J.; Jiang, Y. (2003) Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr. Res.*, 23: 1719.
12. Ghiasi, M.; Taheri, S.; Tafazzoli, M. (2010) Dynamic stereochemistry of rutin (vitamin P) in solution: theoretical approaches and experimental validation. *Carbohydr. Res.*, 345: 1760.

13. Kreft, I.; Fabjan, N.; Yasumoto, K. (2006) Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) food materials and products. *Food Chem.*, 98: 508.
14. Zhang, D.Y.; Zu, Y.G.; Fu, Y.L.; Wang, W.; Zhang, L.; Luo, M.; Mu, F.S.; Yao, X.H.; Duan, M.H. (2013) Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol.*, 102: 26.
15. Dimitrieska-Stojkovic, E.; Zdravkovski, Z. (2003) Supercritical fluid extraction of quercetin and rutin from Hyperici Herba. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 26: 2517
16. Zhang, F.; Yang, Y.; Su, P.; Guo, Z. K. (2009) Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus (Thunb.) Sieb.* *Phytochem. Analysis.* 20: 33.
17. Zhang, Y.; Li, S. F.; Wu, X. W. (2008) Pressurized liquid extraction of flavonoids from *Houttuynia cordata Thunb.* *Sep. Purif. Technol.*, 58: 305.
18. Michalkiewicz, A.; Biesaga, M.; Pyrzyńska, K. (2008) Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J. Chromatogr. A*, 1187: 18.
19. Yang, Y.; Zhang, F. (2008) Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus (Thunb.) Sieb.* *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 308.
20. Paniwnyk, L.; Beaufoy, E.; Lorimer, J.P.; Mason T.J. (2001) Extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica.* *Ultrason. Sonochem.*, 8: 299.
21. Ventura, S.P.M.; Sousa, S.G.; Freire, M.G.; Serafim, L.S.; Lima, A.S.; Coutinho, J.A.P. (2011) Design of ionic liquids for lipase purification. *J. Chromatogr. B.*, 87: 2679.
22. Souza, R.L.; Barbosa, J.M.P.; Zanin, G.M.; Lobão, M.W.N.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. (2010) Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 16: 288.

23. Freire, M.G.; Neves, C.M.S.S.; Marrucho, I.M.; Lopes, J.N.C.; Rebelo, L.P.N.; Coutinho, J.A.P. (2010) High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chem.*, 12: 1715.
24. Wang, Y.; Han, J.; Xu, X.; Hu, S.; Yan, Y. (2010) Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.*, 75: 352.
25. Wang, Y.; Liu, Y.; Han, J.; Hu, S. (2011) Application of Water-Miscible Alcohol-Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Dyes. *Separ. Sci. Technol.* 46: 1283.
26. Guo, Y.X.; Han, J.; Zhang, D.Y.; Wang, L.H.; Zhou, L.L. (2012) An ammonium sulfate/ethanol aqueous two-phase system combined with ultrasonication for the separation and purification of lithospermic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Ultrason. Sonochem.*, 19: 719.
27. Cláudio, A.F.M.; Freire, M.G.; Freire, C.S.R.; Silvestre, A.J.D.; Coutinho, J.A.P. (2010) Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.*, 75: 39.
28. Albertsson, P.A.; Johansson, G.; Tjerneld, F. (1990) Aqueous two-phase separations, in: Asenjo, J.A. (Ed.), *Separation Processes in Biotechnology* (pp. 287-327). New York: Marcell Dekker.
29. Saravanan, S.; Rao, J.R.; Nair, B.U.; Ramasami, T. (2008) Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*, 43: 905.
30. Zhao X.; Xie X.; Yan Y. (2011) Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(propylene glycol) and salt ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KCl, and KAc): experiment and correlation. *Thermochimica Acta*, 516: 46.

31. Garza-Madrid, M.; Rito-Palomares, M.; Serna-Saldívar, S. O.; Benavides, J. (2010). Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. *Process Biochem.*, 45: 1082.
32. Reis, I.A.O.; Santos, S.B.; Santos, L.A.; Oliveira, N.; Freire, M.G.; Pereira, J.F.B.; Ventura, S.P.M.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. (2012) Increased Significance of Food Wastes: Selective Recovery of Added-Value Compounds. *Food Chem.*, 135: 2453.
33. 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.
34. Gutowski, K.E.; Broker, G.A.; Willauer, H.D.; Huddleston, J.G.; Swatloski, R.P.; Holbrey, J.D.; Rogers, R.D. (2003) Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle metathesis, and separations. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 6632.
35. Ooi, C.W.; Tey, B.T.; Hii, S.L.; Kamal, S.M.M.; Lan, J.C.W.; Ariff, A.; Ling, T.C. (2009) Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochem.*, 44: 1083.
36. Wu, H.; Chen M.; Fan Y.; Elsebaei F.; Zhu Y. (2012) Determination of rutin and quercetin in Chinese herbal medicine by ionic liquid-based pressurized liquid extraction–liquid chromatography–chemiluminescence detection. *Talanta*, 88: 222.
37. Fang, F.; Li, J-M.; Pan, Q-H.; Huang, W-D. (2007) Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chem.*, 101: 428.
38. Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 24: 247.

39. Shpak, A.P.; Gorbyk, P.P. (2009) *Nanomaterials and supramolecular structures: physics, chemistry and applications*. Heidelberg: Springer.
40. 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.
41. Zi, J.; Peng, B.; Yan, W. (2007) Solubilities of rutin on eight solvents at T= 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15 K. *Fluid Phase Equilib.*, 261: 111.
42. Oliferenko, A. A.; Oliferenko, P. V.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D.; Palyulin, V. A.; Zefirov, N.S.; Katritzky, A.R. (2004) Theoretical scales of hydrogen bond acidity and basicity for application in QSAR/QSPR studies and drug design, Partitioning of aliphatic compounds. *J. Chem. Inf. Model.*, 44: 1042.
43. Tavagnacco, L.; Schnupf, U.; Mason, P. E.; Saboungi, M-L.; Cesàro, A.; Brady, J. W. (2011) Molecular dynamics simulation studies of caffeine aggregation in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B*, 115: 10957.
44. Gündüz, U.; Korkmaz, K. (2000) Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system; effect of pH and sodium chloride concentration. *J. Chromatogr. B*, 743: 255.
45. Peng, B.; Li, R.; Yan, W. (2009) Solubility of rutin in ethanol + water at (273.15 to 323.15) K. *J. Chem. Eng. Data*, 54: 1378.
46. Nunes, R.S.; Kahl, V.F.S.; Sarmiento, M.S.; Richter, M.F.; Costa-Lotufo, L.V.; Rodrigues, F.A.R.; Abin-Carriquiry, J.A.; Martinez, M.M.; Ferronato, S.; Ferraz, A.B.F.; Silva, J. (2011) Antigenotoxicity and antioxidant activity of acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) at two stages of ripeness. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 66: 129.

Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied to the extraction of gallic acid from guava

Igor A.O. Reis¹, Andressa F. Campos¹, Patrícia H.S. Santos¹, Samuel B. Santos¹, Cleide M.F. Soares^{1,2} Álvaro S. Lima^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brasil

²Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brasil

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

Abstract

An aqueous two-phase system (ATPS) consisting of potassium phosphate salt + alcohol (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) or polyethylene glycol (1500, 4000 and 8000 g.gmol⁻¹) to extract gallic acid from guava (*Psidium guajava* L) was investigated in this study. As a first approach, the partitioning process of the biomolecule was studied using model systems with commercial and high-purity gallic acid. In this stage, the impacts of the ATPS constituents and composition, the temperature of extraction and the addition of further electrolytes were evaluated. Manipulation of the ATPS constituents promoted the partition of gallic acid to the bottom or top phases, thus, the system was versatile to the recovery of gallic acid. The kind of potassium phosphate salt influenced the value of the pH phase, consequently the deprotonation of gallic acid and the migration of biomolecules by a specific phase, acted as a driving force for the partitioning process. The results obtained with the real samples (gallic acid from guava) are in close agreement with the model systems and validate all the optimisation tests, thus, supporting their further applicability in real bioresource-related processes.

Keywords: galic acid, aqueous two-phase system, guava, extraction.

1. Introduction

The world production of the major tropical fruits reached 62 million tons in 2010, corresponding to 33% overproduction since 2000 (FAO, 2012). The significant growth in production was associated with rapidly developing consumption and trade in domestic and international markets, which in turn, is due to the recognised nutritional and therapeutic

effects of the constituents of these fruits (Bicas et al., 2011). Several constituents (for example phenolic compounds, terpenes and alkaloids) originate from the secondary metabolites of plants to act in different functions, such as growth regulators, antioxidants, enzyme inhibitors, pigments and UV light screens (Ning et al., 2012).

One of these substances is gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), a phenolic compound tri-hydroxylate (Fig. 1) with antioxidant properties (Hernández & Prieto González, 1990), and therefore it is commonly applied in food additives (Sergediene et al., 1999). The pharmaceutical industry is showing a heightened interest because of the applications of gallic acid in the treatment of gastric disorders due to its antioxidant activities at stomach pHs (Yilmaz & Toledo, 2003), anorexia, flatulence, gout, urinary diseases, skin repair haemostasis and as a sedative (Gil-Longo & Gonzáles-Vásquez, 2010; Daneshfar et al., 2008). These biomolecules are found in some vegetables, such as pomegranate (Lu et al., 2007), green and black tea (Zuo et al., 2002) and tropical fruits (mango - Soong and Barlow, 2006; guava - Gorinstein et al., 1999).

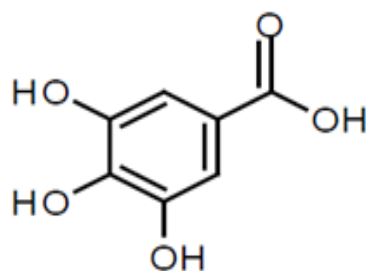


Figure 1: Chemical structure of gallic acid.

Guava (*Psidium guajava* L) is a fruit widely distributed in tropical America, from Mexico to Brazil, as well as in Asia (India), Africa (Algeria, Tunisia and South Africa), mainly in zones of warm climate (Castro-Vargas et al., 2010). The fruit is round, ranging from 3 to 10 cm in diameter and has a yellow or pink peel at maturity in some species (Lee et al.,

2010). Guava is industrially processed to obtain jams, juices and "goiabada" (kind of Brazilian sweet), generating about 4 to 12% of waste, consisting mainly of seeds and peel (Mantovani et al., 2004). The secondary metabolites of plants as gallic acid can be extracted from agroindustrial waste (Puoci et al., 2012), and interestingly, according to Guo et al. (2003) the peel and seed fractions of some fruits possess higher antioxidant activity than the pulp fractions. In this context, wastes resulting from the beneficiation process of fruits are a rich source of bioactive phenolic. Therefore, simple, fast and efficient methods for the extraction of compounds of added values, such as gallic acid, are of great industrial importance.

The design and development of efficient processes for the production, extraction, recovery and purification of biological products is an area of major importance for the biotechnology industry (Graza-Madrid et al., 2010). Several extraction methods are carried out using solid-liquid equilibrium procedures with pure organic solvents, such as methanol and ethanol (Roesler et al., 2007). Some drastic processes, namely the use of supercritical fluids (Manpong et al., 2011) and microwave- and ultrasound-assisted extraction (Amirah et al., 2012) have also been reported as alternative recovery methods. However, while these processes require drastic conditions, such as high temperatures and pressures, they were also dependent on special and sophisticated equipment, turning the extraction into an expensive and complex process. According to Pan et al. (2002), the yield and purity of products of interest is relatively low, and the solvent consumption and processing costs are high.

Among the extraction processes, the aqueous two-phase system (ATPS), which was first used in Sweden in the 1950s, is useful for the separation of macromolecules and cells (Albertson, 1986). The application of ATPS to extract and purify biomolecules is largely studied due to biocompatibility, process integration and intensification capability, and scaling-up feasibility (Benavides et al., 2008).

The ATPS is formed by mixing two water-soluble polymers (Saravanan et al., 2008) or a single polymer and specific salt (Zhao et al., 2011) above a certain critical concentration or temperature (Garza-Madrid et al., 2010). As a result, two immiscible aqueous phases are formed (Ferreira et al., 2011). Nowadays, it is possible to form an ATPS using an organic solvent and salts (Ooi et al., 2009; Reis et al., 2012), ionic liquids and salts (Gutowski et al., 2003, Ventura et al., 2012) and acetonitrile and sugar (Cardoso et al., 2013).

The use of alcohols and PEG as components of the system is of great interest for the extraction of biomolecules due to the low interfacial tension between the combined phases, the rapid attainment of equilibrium partitioning, and availability of commercial separators, which could easily be expanded (Bassani et al., 2010; Ooi et al., 2009), and the use of potassium phosphate salts is related to the low cost and salting-out characteristics required for phase separation (Ventura et al., 2012). In this context, ATPSs have been largely explored in the separation, recovery, and purification of the most distinct biomaterials, such as proteins (Asenjo & Andrews, 2011), enzymes (Lima et al., 2002; Souza et al., 2012), nucleic acids (Gomes et al., 2009), antibodies (Rosa et al., 2009), antibiotics (Wang et al., 2010; Bora et al., 2005), antioxidants (Wu et al., 2011) and flavour compounds (Reis et al., 2012).

The goal of this work was to use different alcohol-salts, recently published by our group (Reis et al., 2012), and PEG-salts ATPS, for the partition of gallic acid as a target biomolecule. This study shows the versatility of ATPS to extract gallic acid to the top or bottom phase simply by manipulation of the system's constituents, such as alcohol (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol), inorganic salt type (potassium phosphate salts, namely K_3PO_4 , K_2HPO_4 and potassium phosphate buffer composed of K_2HPO_4/KH_2PO_4) and different molecular weights of PEG (1500, 4000, 8000 $g \cdot mol^{-1}$) at 25 °C. The main aim of this study is to prove that the partition of gallic acid in potassium phosphate salt-based ATPS can be applied to extract gallic acid from guava waste.

2. Material and Methods

2.1. Material

Methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) and potassium phosphate (K_3PO_4) were purchased at Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). The alcohols have purities higher than 99%. The phosphate salts are more than 98% pure. Polyethylene glycol (PEG) with molecular weights of 1500, 4000 and 8000 $g \cdot mol^{-1}$ were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Gallic acid (> 98% pure), was acquired from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water, double distilled, passed by a reverse osmosis system and further treated with a Milli-Q plus 185 water purification apparatus, was used throughout the experiments. All chemicals were of analytical grade. The guava fruit at mature stage was purchased at a regular supermarket in Aracaju, Brazil. The fruit was peeled, and the peel, pulp and seed were kept at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until further use.

2.2. Gallic acid partition in the aqueous two-phase system

The model systems studied are comprised by different potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4), alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and PEG (1500, 4000 and 8000 $g \cdot mol^{-1}$) were previously prepared. The solutions of a phosphate buffer (PB) were composed with the two inorganic salts K_2HPO_4 and KH_2PO_4 (pH = 7.0; Henderson-Hasselbalch equation equivalents = 1.087).

The partition systems were prepared using graduated centrifuge tubes (15 ml) by weighing the appropriate amounts of alcohol (50 wt%) and potassium phosphate salts (15 wt%) (Reis et al., 2012) or PEG (20 wt%) and potassium phosphate salts (10 wt%). The aqueous solution containing the gallic acid at $500\text{ mg} \cdot L^{-1}$ was used to form 14.0 g of the system.

Then, the mixtures were gently stirred and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The graduated tubes were placed at room temperature (25 °C) and atmospheric pressure, for at least 18 hours, using a thermostatic bath MARCONI MA-127, to reach the equilibrium and to promote the complete partition process of gallic acid. The vials were closed during this period to avoid alcohol vaporisation. The two phases were then cautiously collected for the determination of their volume and weight, and finally the gallic acid was quantified in both the top and bottom phases. Its quantification was performed in triplicate, and the final partition coefficients and extraction efficiencies reported the average of the three assays (accompanied by the respective standard deviations). It should be remarked that for all studied ATPSs, the top phase was the alcohol-rich phase while the bottom phase corresponded to the salt-rich phase.

The partition coefficient (K_{GA}) is defined as the ratio between the gallic acid concentrations in the top phase to that in the bottom phase. In order to evaluate the partition process, the volume ratio (R_v) and recovery percentages of gallic acid for the top (R_T) and bottom (R_B) phases are determined according to the equations 1–4.

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

$$R_v = \frac{V_T}{V_B} \quad (2)$$

$$R_T = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_v \cdot K_{GA}}} \quad (3)$$

$$R_B = \frac{100}{1 + R_v \cdot K_{GA}} \quad (4)$$

where C is the gallic acid concentration, V is the 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_{GA} represents the partition

coefficients of gallic acid, and the subscripts T and B denote the top and bottom phases, respectively.

The pH of both phases was also measured using a DIGIMED DM-20 pH meter.

2.3. Extraction and partitioning of gallic acid from guava waste

The recovery of gallic acid was carried out from the real waste of guava. The compositions of the preferred ATPS to selectively extract the antioxidant were chosen by taking into account the partition coefficients and extraction efficiencies obtained with the model systems. Thus, the system composed of 1-propanol (50 wt%) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (35 wt%) + H_2O (35 wt%) and PEG 8000 $\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (20 wt%) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (15 wt%) + H_2O (65 wt%) were employed with the intent of maximising the concentration of gallic acid in the top phase. On the other hand, to maximise the partition to the bottom phase the following systems were used, 1-propanol (50 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) and PEG 8000 $\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (20 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + H_2O (65 wt%). All experiments were carried out at 25 °C.

The guava waste samples (10 g of total mass) were dissolved in 25 mL of aqueous solution of 1-propanol (60 wt%) at 25 °C under constant agitation (shaker at 200 rpm - Marconi MA-095) during 24 h. After 24 h, the system was filtered through a 0.42- μm membrane. The inorganic salts ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ or K_3PO_4 at 15 wt%) and water were then added to prepare the respective ATPS in the required concentrations up to a total volume of 14 g. The second system was prepared using the guava waste samples (10 g of total mass) dissolved in 25 mL of water at 25 °C under constant agitation (200 rpm) during 24 h. Next, PEG at 8000 $\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ and inorganic salts ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ or K_3PO_4) were added to form the systems with 14 g.

The mixtures were gently stirred for 5 min and finally centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The extraction systems were placed at 25 °C for 18 h to reach equilibrium. The vials were closed during this period to avoid alcohol vaporisation. Finally, both phases were carefully separated and weighed, the volume of each phase was measured, and gallic acid was quantified.

2.4. Assay of gallic acid concentration

The concentration of gallic acid in both phases was determined by UV-Vis spectroscopy, using the apparatus Varian Cary-50 spectrophotometer UV-visible Bio in two wavelength-defined absorption peaks (215 and 265 nm). The respective calibration curve was properly established for the wavelength considered. The quantification of gallic acid was based on the capacity of the aromatic molecules to be absorbed by the ultraviolet visible region. The concentration of gallic acid was performed in triplicate. Interferences of both the inorganic salt and the alcohol in the analytical method were taken into account and found to be insignificant at the dilutions performed. Three samples of each phase were precisely quantified, and the average of the gallic acid concentrations and respective standard deviations were determined for both phases.

3. Results and Discussion

3.1. Partitioning of gallic acid in alcohol-salt-based aqueous two-phase system

In order to evaluate the influence of the type of alcohol (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and potassium phosphate salt (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer solution) in the partitioning of gallic acid in ATPS, a mixing point was used consisting of 50 wt% of alcohol and 15 wt% of potassium phosphate salt at 25 °C. This mixing point was chosen so as to have two phases for all constituents of the system. The behaviour of gallic

acid partitioning in ATPS was performed using a logarithmic function of the partition coefficient ($\log K_{GA}$) to facilitate the interpretation of the results (Fig. 2). The presence of gallic acid at the interface of the system has been neglected, since the mass balance of gallic acid was always confirmed and is within $\pm 9.0\%$.

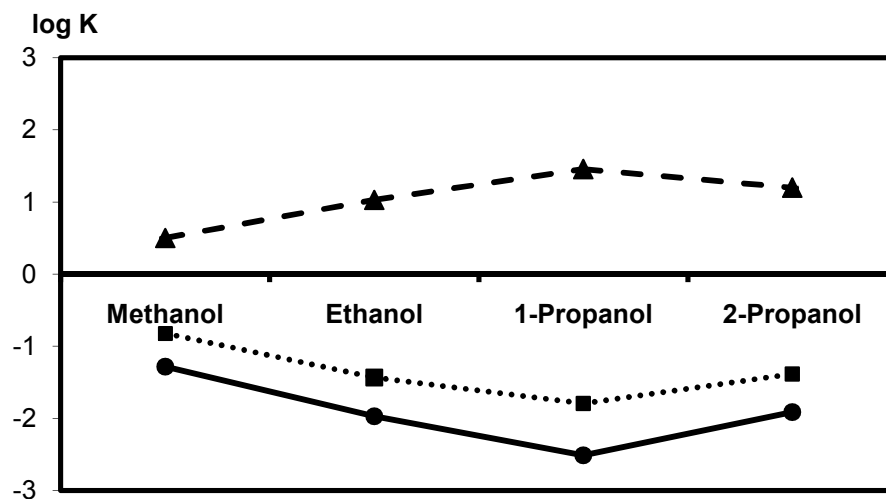


Figure 2. Logarithm function of the partition coefficients ($\log K_{GA}$) in the ATPS composed of methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol, and the inorganic salts K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer (triangles - dashed line).

The potassium phosphate salts studied lead to very different behaviours in the partitioning of gallic acid. For the alcohols investigated, the K_{GA} increased in the following order: $K_2HPO_4/KH_2PO_4 \gg K_2HPO_4 > K_3PO_4$, suggesting that the choice of inorganic salt is a driving force of the optimisation of gallic acid extraction. The three salt solutions used were selected because they attribute different pH values to the systems, generally more acidic due to the presence of alcohol.

Gallic acid has four potential acidic protons with pK_a values of 4.0 (carboxyl acid), 8.7, 11.4, and > 13 (phenolics-OHs) (Eslami et al., 2010), therefore gallic acid changes its surface charge.

The partitioning of gallic acid is directly linked to the amount of hydrogen ionized. The more charged the greater the affinity of the target biomolecule by the phase rich in potassium phosphate (bottom phase), while the uncharged species migrate to the more hydrophobic phase (alcohol-rich phase), as suggest by Claudio et al. (2012). The change in the electrical charge and surface chemical structure at different pH values due to ionization of the hydroxyl groups influences the solubility characteristics of the biomolecule and the hydrophobic/hydrophilic target compound (Wang et al., 2010).

In systems formed with K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer, the pH value near to neutral (5.87 ± 0.05 to 8.11 ± 0.02) (Table 1), provided only the ionization of the hydrogen from the carboxylic group, with gallic acid partitioning to the top phase ($\log K_{GA} > 0$). For K_2HPO_4 systems (8.00 ± 0.27 to 9.97 ± 0.11), one phenolic-OH was ionized, while for K_3PO_4 systems (11.58 ± 0.14 to 12.96 ± 0.04) two phenolic-OH were ionized; in both cases, the OH from the carboxylic group was ionized. Using K_2HPO_4 and K_3PO_4 , the biomolecule target partitioned to the bottom phase.

Table 1. pH values of the top (T) and bottom (B) phases for the extraction systems of gallic acid (500 mg.L^{-1}) composed of alcohol + inorganic salt + water, at 298 K and atmospheric pressure.

Ternary System		pH (T) \pm std	pH (B) \pm std
K₃PO₄	methanol	12.60 \pm 0.05	11.58 \pm 0.14
	ethanol	12.90 \pm 0.09	12.68 \pm 0.04
	1-propanol	12.87 \pm 0.06	12.72 \pm 0.07
	2-propanol	12.96 \pm 0.04	12.30 \pm 0.13
K₂HPO₄	methanol	9.97 \pm 0.11	8.00 \pm 0.27
	ethanol	9.43 \pm 0.12	8.51 \pm 0.09
	1-propanol	9.35 \pm 0.08	9.05 \pm 0.13
	2-propanol	9.27 \pm 0.06	9.18 \pm 0.03
K₂HPO₄/KH₂PO₄	methanol	8.11 \pm 0.02	7.40 \pm 0.04
	ethanol	7.30 \pm 0.08	7.23 \pm 0.23
	1-propanol	6.89 \pm 0.02	5.87 \pm 0.05
	2-propanol	7.24 \pm 0.07	6.81 \pm 0.12

The recoveries follow the trend partition, and gallic acid almost completely extracted to one of the phases, except for systems formed with methanol (Fig. 3). For all aqueous systems studied, recovery of gallic acid to the alcohol-rich phase was between 92.88 ± 0.44 to $98.51 \pm 0.10\%$, while the recovery of gallic acid to the salt-rich phase (bottom phase) was between 58.61 ± 0.86 to $99.32 \pm 0.03\%$.

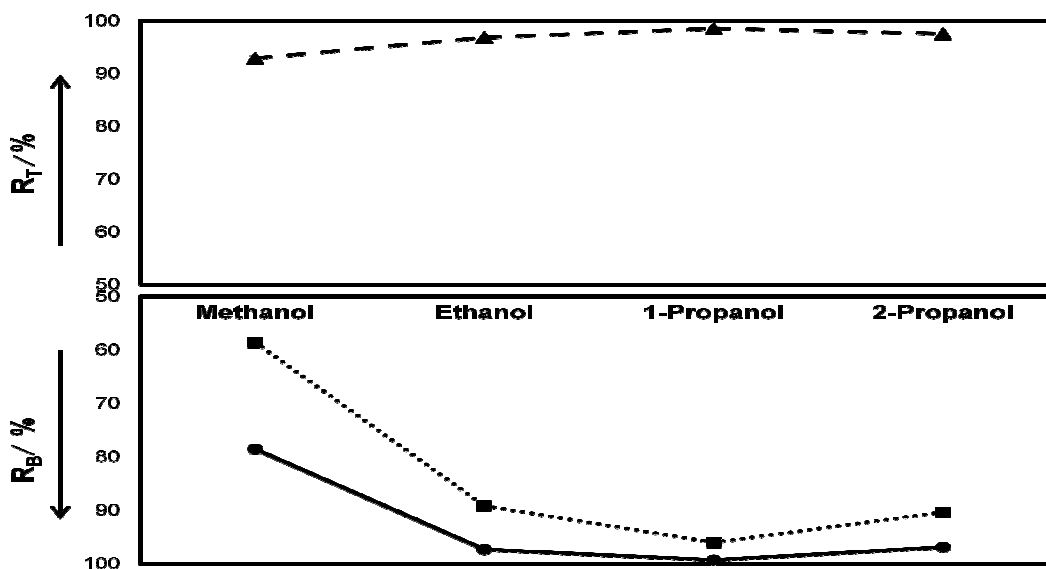


Figure 3. Recovery percentages of gallic acid obtained in each one of the extraction systems studied. The ternary systems are composed of different alcohols, namely methanol, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol, with the inorganic salts K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer (triangles - dashed line).

3.2. Partitioning of gallic acid in a PEG-salt-based aqueous two-phase system

The systems formed from PEG with different molecular weights (1500, 4000 and 8000 $g \cdot mol^{-1}$) and salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 , K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer) were used to investigate the partitioning of gallic acid. The composition of the mixing point was 20 wt% to PEG and 15 wt% for potassium phosphate salts, and the system was developed at 25 °C. This mixing point was chosen to have two-phase aqueous systems for all components. As in systems formed by alcohols and salts, analysis of the partitioning behaviour was performed using the log of the

partition coefficient ($\log K_{GA}$), and the presence of gallic acid at the interface was discarded because the mass balance of gallic acid was always confirmed and was within $\pm 9.0\%$.

Figure 4 shows that the molecular weight of PEG did not influence the K_{GA} , except for the system formed with K_2HPO_4/KH_2PO_4 , for which there was only a slight increase of K_{GA} .

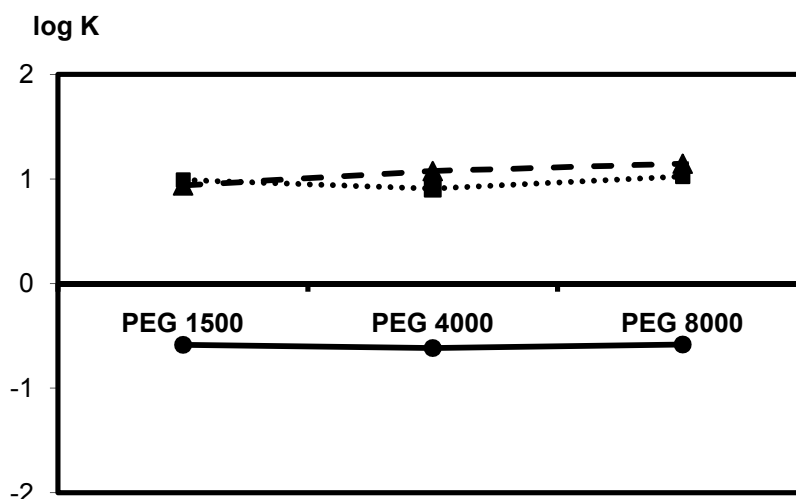


Figure 4. Logarithm function of the partition coefficients ($\log K_{GA}$) in the ATPS composed of PEG 1500, PEG 4000 and PEG 8000, and the inorganic salts K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer (triangles - dashed line).

In this case, the pH value of the system was between 6.65 ± 0.05 and 6.94 ± 0.04 (Table 2), and only the carboxyl groups were ionized. Therefore, the aromatic ring of gallic acid had more influence on the hydrophobic characteristics, and the gallic acid migrated to top phase. Zuñiga et al. (2001) also observed that hydrophobic biomolecules (α -lactoglobulin) migrate to the polymer phase, because of the increased molecular weight of the PEG and consequently its hydrophobicity. For systems formed with K_2HPO_4 , the pH value of the phases changed from 9.06 ± 0.07 to 9.45 ± 0.04 , allowing the ionization of OH from the carboxyl and phenolic groups. This deprotonation was not strong enough to exceed the hydrophobicity effect. On the other hand, for a system using K_3PO_4 the pH value changed

from 13.26 ± 0.11 to 13.79 ± 0.11 , allowing the total ionization of gallic acid and consequently its migration to the bottom phase.

Table 2. pH values of the top (T) and bottom (B) phases for the extraction systems the biomolecule rutin composed of alcohol + inorganic salt + water, at 298 K and atmospheric pressure.

Ternary System		pH (T) \pm std	pH (B) \pm std
K ₃ PO ₄	PEG 1500	13.70 \pm 0.01	13.50 \pm 0.01
	PEG 4000	13.67 \pm 0.04	13.26 \pm 0.11
	PEG 8000	13.79 \pm 0.11	13.56 \pm 0.48
K ₂ HPO ₄	PEG 1500	9.37 \pm 0.03	9.09 \pm 0.07
	PEG 4000	9.31 \pm 0.01	9.06 \pm 0.07
	PEG 8000	9.45 \pm 0.04	9.07 \pm 0.13
K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	PEG 1500	6.87 \pm 0.02	6.69 \pm 0.05
	PEG 4000	6.94 \pm 0.04	6.65 \pm 0.05
	PEG 8000	6.93 \pm 0.04	6.65 \pm 0.05

According to Claudio et al. (2012), a higher pH value favours the charged form of gallic acid prevailing an affinity for the hydrophilic phase (bottom phase) than at a low pH and, therefore, the K_{GA} decreased with the increase of pH (alkaline); this can result from electrostatic interactions between the units of gallic acid and salt.

The results of recoveries indicated two distinct regions (Fig. 5), one with recoveries in the top phase and bottom phase in another.

For the top phase, the larger recoveries were observed for ATPS formed by the PEG-4000/buffer ($93.86 \pm 0.25\%$) and PEG-8000/buffer ($94.88 \pm 0.27\%$). Moreover, the highest recovery of gallic acid in the bottom phase occurred in ATPS formed by PEG 8000/K₃PO₄ ($85.78 \pm 1.43\%$).

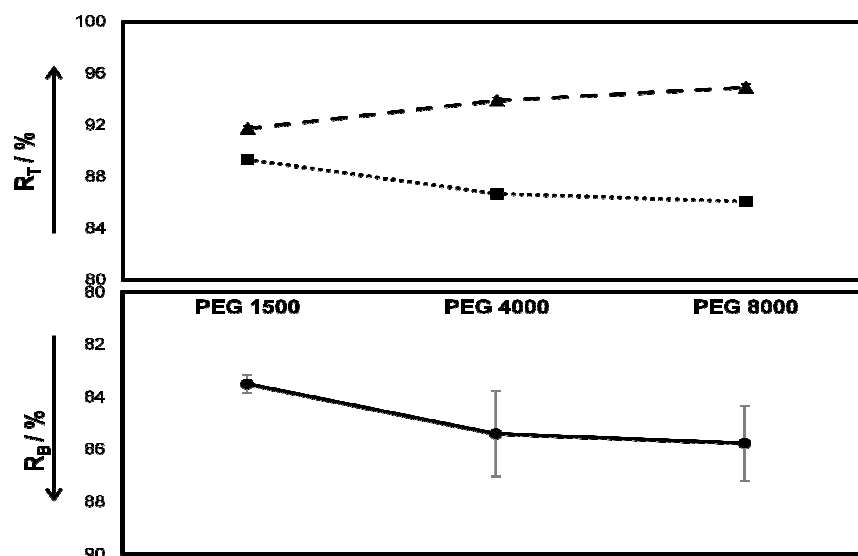


Figure 5. Recovery percentages of gallic acid obtained in each one of the extraction systems studied. The ternary systems are composed of different PEG molecular weight, namely PEG 1500, PEG 4000 and PEG 8000, with the inorganic salts K_3PO_4 (circles - solid line), K_2HPO_4 (squares - pointed line) and K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer (triangles - dashed line).

3.3. Solvent extraction of gallic acid from guava

Gallic acid was extracted from different parts of guava (peel, pulp and seeds) using four kinds of alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) and water. The concentration of gallic acid was expressed as $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, as shown in Figure 6.

The concentration of gallic acid in the guava peel is approximately 60% higher than in the pulp and seed, indicating that this waste is a source of added-value compounds. The results corroborate Soong & Barlow (2004), who reported that certain fruit peels exhibit more antioxidant activity than the pulp and seeds, and that the profile of the antioxidant photochemical is differentiated in these parts of the plant.

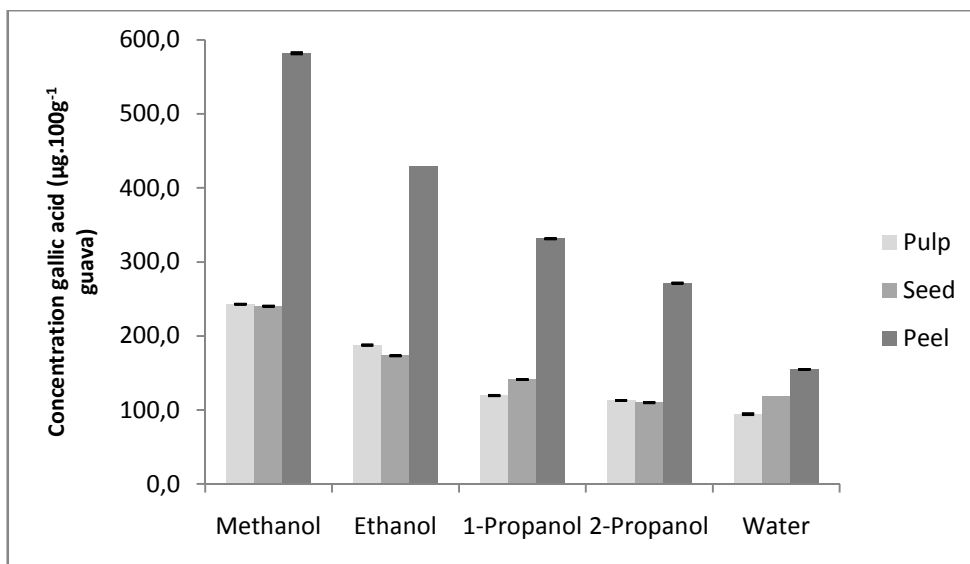


Figure 6. Conventional extraction of gallic acid from guava using different alcohols, namely methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol.

According to Naczk & Shahidi (2006), the solubility of phenolic compounds is affected by the polarity of solvents used. The increase of extraction of gallic acid from guava followed the increased order of parameters of solvent polarity (alcohols) reported by Reichardt (1994) and expressed in Kcal.mol^{-1} :

methanol (55.4) > ethanol (51.9) > 1-propanol (50.7) > 2-propanol (48.4)

Moreover, it is associated with gallic acid solubility, which decreases with the increasing alkyl chain of alcohol and low solubility of the biomolecule in water (Daneshfar et al., 2008).

The content of gallic acid in the guava (pulp, peel and seeds) was 243.1 ± 0.2 , 581.9 ± 0.9 and $240.4 \pm 0.1 \mu\text{g.100g}^{-1}$ of fresh samples, respectively. These results are in agreement with Gorinstein et al. (1999), who determined an average concentration of gallic acid in guava

(cv. Klom sali) of $374.3 \pm 13.1 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ fresh fruit; and Jiménez-Escrig et al. (2001) who reported more total phenolic content expressed in gallic acid in the peel of guavas.

3.4. Potassium phosphate salt-based aqueous two-phase extraction of gallic acid from guava peels

Here, we describe an assay of the versatility of the systems formed with the potassium phosphate salts using alcohols or PEG to extract gallic acid from guava peels. The partitioning occurred to the top phase (PEG - or alcohol-rich phase) with $\log K > 0.0$ (1-propanol - 50 wt% + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer - 15 wt% + H_2O - 35 wt% and PEG 8000-20 wt% + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer - 15 wt% + H_2O - 65 wt%) and to the bottom phase (salt-rich phase) with $\log K < 0.0$ (1-propanol - 50 wt% + K_3PO_4 - 15 wt% + H_2O - 35 wt% and PEG 8000-20 wt% + K_3PO_4 - 15 wt% + H_2O - 65 wt %). All experiments were carried out at 25 °C.

Initially, gallic acid extractions were performed with 1-propanol (for systems alcohols-salts) and water (PEG-salts). Then, the potassium phosphate salts were added to promote the phase's separation. The values of partition coefficient, pH and recovery phase are shown in Table 3.

The behaviours of the partition coefficient and recovery of extraction of gallic acid from guava peels were similar to those found in model systems. The gallic acid phase migrates to the top ($\log K > 0.0$ with recovery between $90.51 \pm 0.32\%$ and $96.84\% \pm 0.08$) using the ATPS formed by 1-propanol (50 wt%) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (15%) + H_2O (35 wt%), and PEG 8000 (20 wt%) + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer (15%) + H_2O (65 wt%), respectively, while it migrates to the bottom phase ($\log K < 0.0$ with recovery between 79.34 ± 0.18 and $94.07 \pm 0.71\%$) using the ATPS formed by 1-propanol (50 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + H_2O (35 wt%) and PEG 8000 (20 wt%) + K_3PO_4 (15 wt%) + H_2O (65 wt%), respectively.

Table 3. Partition Coefficient of gallic acid, recovery and pH values of phase for different ternary system at 298, 15 K.

Composition of ternary system	K_{GA}	Log K_{GA}	R_{GA} (%)	pH
Top phase				
1-Propanol (50 wt%) + buffer (15 wt%) + H ₂ O (35 wt%)	14.02±0.61	1.15±0.02	96.84±0.17	5.25±0.23
PEG 8000 (20 wt%) + buffer (15 wt%) + H ₂ O (35 wt%)	9.55±0.36	0.98±0.02	90.51±0.32	6.98±0.04
Bottom phase				
Composition of ternary system	K_{GA}	Log K_{GA}	R_{GA} (%)	pH
1-Propanol (50 wt%) + K ₃ PO ₄ (15 wt%) + H ₂ O (65 wt%)	0.044±0.004	-1.36±0.04	94.07±0.71	13.27±0.11
PEG 8000 (20 wt%) + K ₃ PO ₄ (15 wt%) + H ₂ O (65 wt%)	0.38±0.01	-0.42±0.01	79.34±0.18	13.30±0.03

The different values of K_{GA} obtained in real extraction (using guava) in relation to ATPS models can be explained by the complexity of the real sample, which contained other biomolecule contaminants. However, the recovery values obtained for gallic acid prove the success of the extraction process. Thus, the alcohol-based ATPS formed by PEG-salt and alcohol-salt can be regarded as alternative extraction processes for the recovery of value-added compounds from exotic fruits.

Dhalwal et al. (2008) found average recoveries of gallic acid from *Bergenia ciliata* and *Bergenia ligulata* (flowering plants) of 99.23%, when they used thin-layer chromatography, a process more sophisticated than ATPS. Extraction using ionic liquids in the microwave assisted the process with yields of gallic acid from *Psidium guajava* leaf (medicinal plant)

between 67.3 \pm 0.5% and 91.0 \pm 2.3% (Du et al., 2009), values lower than those found in this study.

4. Conclusion

ATPS formed with potassium phosphate salts (K_3PO_4 , K_2HPO_4 and K_2HPO_4/KH_2PO_4) and PEG (1500, 4000 and 8000 $g \cdot g^{-1}$) or alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol and 2-propanol) are extremely versatile and can be easily manipulated to partition gallic acid to the top or bottom phase. The potassium phosphate salt changes the pH of the system and ionizes the gallic acid; this deprotonation is the driving force of this ATPS process. The similar values of the parameters, such as partition coefficient and recovery of gallic acid, in different ternary systems for model and real (guava peel) extractions validate the results and the application of ATPS for the extraction of guava gallic acid.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC/SE, for the scholarship of I.A.O. Reis, and from CAPES for the scholarship of S. B. Santos.

References

- Albertson, P.A. (1986). *Partition of cell particles and macromolecules*. New York: Wiley Interscience.
- Amirah, Prasad, D.M.R., & Khan, M.R. (2012). Comparison of extraction techniques on extraction of gallic acid from stem bark of *Jatropha curcas*. *Journal of Applied Sciences*, 12, 1106–1111.

- Asenjo, J.A., & Andrews, B.A. (2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*, *1218*, 8826–8835.
- Bassani, G., Fuciños, P., Picó, G., & Farruggia, B. (2010). *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*, 532–537.
- Benavides, J., Aguilar, O., Lapizco-Encinas, B.H., & Rito-Palomares, M. (2008). Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies. *Chemical Engineering Technology*, *31*, 838–845.
- Bicas, J.L., Molina, G., Dionísio, A.P., Barros, F.F.C., Wagner, R., Maróstica Júnior, M.R., & Pastore, G.M. (2011). Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. *Food Research International*, *44*, 1843–1855.
- Bora, M.M., Borthakur, S., Rao, P.C., & Dutta, N.N. (2005). Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature. *Separation and Purification Technology*, *45*, 153–156.
- Cardoso, G.B., Mourão, T., Pereira, F.M., Freire, M.G., Fricks, A.T., Soares, C.M.F., & Lima, A.S. (2013). Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. *Separation and Purification Technology*. *In press*.
- Castro-Vargas, H.I., Rodríguez-Varela, L.I., Ferreira, S.R.S., & Parada-Alfonso, F. (2010). Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, *51*, 319–324.
- 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. *Separation and Purification Technology*, *97*, 142–149.

- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S., & Homayoun, N. (2008). Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(3), 776–778.
- Dhalwal, K., Shinde, V.M., Biradar, Y.S., & Mahadik, K.R. (2008). Simultaneous quantification of bergenin, catechin, and gallic acid from *Berberia ciliate* and *Berberia ligulata* by using thin-layer chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 496–500.
- Du, F.Y., Xiao, X.H., Luo, X.J., & Li, G.K. (2009). Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. *Talanta*, 78(3), 1177–1184.
- Eslami, A.C., Pasanphan, W., Wagner, B.A., & Buettner, G.R. (2010). Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: an electron paramagnetic resonance study. *Chemistry Central Journal*, 4, 1–4.
- FAO. FAO statistical database. www.fao.org, 2012.
- Ferreira, L.A., Teixeira, J.A., Mikheeva, L.M., Chait, A., & Zaslavsky, B.Y. (2011). Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG-sodium sulfate two-phase system. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5031–5039.
- Garza-Madrid, M., Rito-Palomares, M., Serna-Saldívar, S.O., & Benavides, J. (2010). Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human serum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*, 45, 1082–1087.
- Gil-Longo, J. & Gonzalez-Vazquez, C. (2010). Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(4), 304–309.
- Gomes, G.A., Azevedo, A.M., Aires-Barros, M.R., & Prazeres, D.M.F. (2009). Purification of plasmid DNA with aqueous two phase systems of PEG 600 and sodium citrate/ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*, 65, 22–30.

- Gorinstein, S., Zemser, M., Haruenkit, R., Chuthakorn, R., Grauer, F., Martin-Belloso, O., & Trakhtenberg S. (1999). Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *10*, 367–371.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, *23* (12), 1719–1726.
- Gutowski, K.E., Broker, G. A., Willauer, H.D., Huddleston, J.G., Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., & Rogers, R.D. (2003). Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of American Chemical Society*, *125*, 6632–6633.
- Hernández, A.M., & Prieto Gonzáles, E.A. (1999). Plantas que contienen polifenoles. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedica, Ciudad de la Habana*, *18*(1), 12–14.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 5489–5493.
- Lee, A., Choi, H.K., Cho, S.K., & Kim, Y.S. (2010). Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data-processing approaches. *Journal of Chromatography B*, *878*, 2983–2988.
- Lima, A.S., Alegre, R.M., & Meirelles, A.J.A. (2002). Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymer*, *50*, 63–68.
- Lu, J.J., Wei, Y., & Yuan, Q.P. (2007). Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, *55*(1), 40–43.

- Manpong, P., Douglas, S., Douglas, P.L., Pongamphai, S., & Teppaitoon, W. (2011). Preliminary investigation of gallic acid extraction from *Jatropha curcas linn.* leaves using supercritical carbon dioxide with methanol co-solvent. *Journal of Food Process Engineering*, *34*(5), 1408–1418.
- Mantovani, R.J., Correia, M.C.M., Ferreira, M.E., & Natale, W. (2004). Uso fertilizante de residuo da indústria processadora de goiabas, *Revista Brasileira Fruticultura*, *26*(2), 339–342.
- Naczk, M., & Shahidi, F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*, 1523–1542.
- Ning, W., Peng, X., Ma, L., Cui, L., Lu, X., Wang, J., Tian, J., Li, X., Wang, W., & Zhang, L. (2012). Enhanced secondary metabolites production and antioxidant activity in postharvest *Lonicera japonica* Thunb. in response to UV radiation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *13*, 231–243.
- Ooi, C.W., Tey, B.T., Hii, S.L., Kamal, S.M.M. Lan, J.C.W., Ariff, A., & Ling, T.C. (2009). Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, *44*, 1083–1087.
- Pan, P., Barnett, M.L., Coelho, J., Brogdon, C., & Finnegan, M.B. (2002). Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. *Journal of Clinical Periodontology*, *27*, 256–261.
- Puoci, F., Scoma, A., Cirillo, G., Bertin, L., Fava, F., & Picci, N. (2012). Selective extraction and purification of gallic acid from actual site olive mill wastewaters by means of molecularly imprinted microparticles. *Chemical Engineering Journal*, *198-199*, 529–535.
- Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dye as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, *94*, 2319–2358.

- Reis, I.A.O., Santos, S.B., Santos, L.A., Oliveira, N., Freire, M.G., Pereira, J.F.B., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., & Lima, A.S. (2012). Recovery of added-value compounds from food wastes: selective partitioning using alcohol-salt aqueous two-phase systems. *Food Chemistry*, 135, 2453–2461.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., & Pastore, G.M. (2007). Atividade antioxidante de frutos do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 53–60.
- Rosa, P.A.J., Azevedo, A.M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Aires-Barros, M.R., & Bäcker, W. (2009). Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach. *Journal of Biotechnology*, 139, 306–313.
- Saravanan, S., Rao, J.R., Nair, B.U., & Ramasami, T. (2008). Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*, 43, 905–911.
- Sergediene, E., Jonsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I., & Cenas, N. (1999). Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *Febs Letters*, 462(3), 392–396.
- Soong, Y.Y., & Barlow, P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411–417.
- Soong, Y.Y., & Barlow, P.J. (2006). Quantification of gallic acid and ellagic acid from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 97, 524–530.
- Souza, R.L., Barbosa, J.M.P., Zanin, G.M., Lobão, M.W.N., Soares, C.M.F., & Lima, A.S. (2010). Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 16, 288–300.

- Ventura, S.P.M., Sousa, S.G., Serafim, L.S., Lima, A.S., Freire, M.G., & Coutinho, J.A.P. (2012). Ionic liquids based aqueous two-phase systems with pH controlled by phosphate buffer: the anion effect. *Journal of Chemical Engineering Data*, 57, 507–512.
- Yilmaz, Y. & Toledo, R.T. (2003). Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 255-260.
- Wang, Y., Han J., Xu X., Hu S., & Yan, Y. (2010). Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75, 352–357.
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, 129, 443–453.
- Zhao, X., Xie, X., & Yan, Y. (2011). Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(propylene glycol) and salt ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KCl, and KAc): experiment and correlation. *Thermochimica Acta*, 516, 46–51.
- Zuñiga, A.D.G., Coimbra, J.S.R., & Minim, L.A. (2001). Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: Influência da massa molar do polímero. *Ciência y Tecnología Alimentaria*, 3(3), 149–155.
- Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(2), 307–316.

Rutin extraction from acerola waste assisted by ultrasound combined with aqueous two-phase systems

Igor A.O. Reis¹, Andressa F. Campos², Patrícia H.S. Santos², Samuel B. Santos¹, Lisiane S. Freitas³, Cleide M.F. Soares^{1,4}, Álvaro S. Lima^{1,4,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brasil

²Universidade Tiradentes, Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA).

³Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química.

⁴Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brasil

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

Abstract

Flavonoids with focus on the rutin can have beneficial effects for human health already scientifically proven due to its antioxidant properties that can be found in the acerola and its processing wastes. Therefore, the compounds extraction yields with high aggregated value from the wastes using various extraction techniques must be studied. The approach adopted in this work was the rutin extraction from acerola wastes using various extraction methods (conventional, assisted by ultrasound and aqueous two-phase systems). The samples were submitted to tests that vary the effects of extraction times, combination of extractions and concentration variations and organic solvent volumes in the rutin extraction. The optimized conditions for the increase of rutin yield in acerola wastes were as follows: type and solvent concentration: 100% of 1-propanol; time of extraction: 60 min; solvent/material ratio: 5.0 mL.g⁻¹; ultrasound frequency: 100 kHz and extraction cycle: 3 times. The rutin extractions from the acerola waste in ATPS were able to separate the flavonoid to top and bottom phases. The results of separation coefficient and extraction efficacy show that it is possible to conceive extraction processes that are cheaper and simpler, able to promote the rutin biomolecule separation.

Key-words: conventional extraction, extraction assisted by ultrasound, biphasic system, rutin.

1. Introduction

Acerola (*Malpighia emarginata* DC) is originally from Central America but has been propagated for most of the South America, including Brazil. Although it is known for many years, the cultivation of the fruit in commercial scale was only seen in the early 80s [1]. In 1993, Brazil already had the largest amount of planted area and in this specific fruit production [2], feature that is maintained until today, since Brazil is considered one of the largest producers, consumers and exporter of acerola in global level, overall as juice and pulp [3,4]. The variety of chemical composition of acerola corresponds to the great amount of

volatile organic compounds, such as substances responsible for aroma and non-volatile, such as anthocyanins [5], vitamin C [1], and total phenols and carotenoids [6].

Acerola use, as diet supplement by men has great nutritional importance as it is a natural source of vitamin C and other bioactive compounds, such as bioflavonoids, which propitiate an elevated antioxidant activity that acts reducing the oxidative damage to organisms by reactive species of oxygen and nitrogen, preventing chronic diseases, such as cancer and arteriosclerosis, neurodegenerative diseases and aging [7,8]. Besides, according to Kim *et al.* [9] and Vasconcelos *et al.* [10], the regular consumption of phenols, vitamin C and carotenoids by fruits, vegetables and grains reduces the risk of degenerative and chronicle diseases. For this reason, the acerola consumption as fruit in natura or by juices is highly recommendable for the prevention of human health [11].

Acerola presents strong potential for industrialization, once it can be consumed under the form of jams [12], juice (whole, concentrated and lyophilized) [13], frozen pulp [14], among other products. However, agroindustrial wastes are generated in great amounts, resulting in the accumulation of wastes and inherent environmental impact. The agroindustrial wastes, consisted of mainly peels and seeds of fruits and vegetables, normally do not receive attention, being used or recycled, avoiding waste. This, possibly occurs due to the lack of commercial value of this product [15]. However, it is worth noting that fractions of peel and seeds presents in the waste have high aggregated values (antioxidant) which exhibit higher antioxidant value than the pulp [15-17]. According to Freitas *et al.* [8], Brazilian industry uses 34.4 thousand of tons of acerola (7.16% of total fruits) and produces 18 thousand of tons of juice and pulp (52.3%) and 16.4 thousand tons of wastes (47.7%). In this context, there is great interest in finding sustainable processes for reuse and maximal value aggregation for these wastes.

Among the bioactive compounds (antioxidants) present in acerola wastes rutin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone-3-β-D-rutinoside or quercetin-3-rutinosid) stands out, biomolecules synthesized in plants with protective function against ultraviolet radiation and diseases [18,19], which structure is shown in Figure 1.

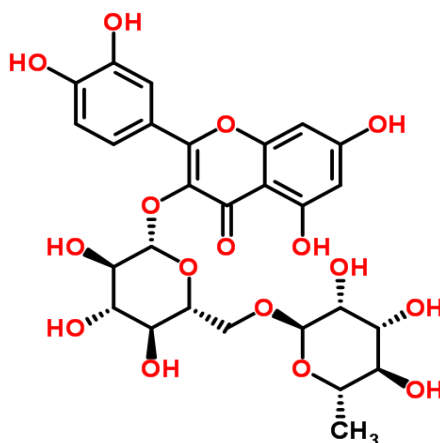


Figure 1. Molecular structure of rutin.

As a flavonoid compound, rutin has received much attention, because it has been proven as a potent antioxidant and has many important biological, pharmaceutical and medicinal properties [20]. This flavonoid is found in many food sources such as grapes, apple, tomato and beverages as red wine and black tea [21], and also tropical fruits, such as acerola [22].

There are many methods for the extraction of rutin from fruits. Many authors propose extraction, separation and identifications methods of various biomolecules from different sources. Among these, conventional extraction methods using organic solvent [23] can be considered, and recently, the use of non-conventional technologies as ultrasound extraction [24] has been reported due to their efficient biomolecule extraction.

Normally, on conventional extraction with organic solvents cold or hot, the kind of solvent used depends on the polarity of the biomolecule, however the process is limited due to the solvent capacity to isolate the goal molecule [25]. Besides, the conventional extraction requires a long time of extraction with low yield. However, the method is still very popular

and widely used because it was well established, since it is easy to operate and has low cost [26].

Initially ultrasound was used for material cleansing, but due to their properties, started to be applied for degasification of solvents, emulsion and suspension preparation [27, 28]. Also being applied in the extraction of plant metabolites [29], herbal bioactive [30], ginseng saponins [31], polysaccharides [32] and phenolic compounds [33]. High potency ultrasound waves produce in ultrasound baths cause physical and chemical changes due to pressure variations, producing cavitation and microflows in liquids, heating and solid rupture and instability in liquid-liquid and liquid-gas system interphase rising the mass transfer rates during extraction, offering advantages in yield, production and selectivity [28, 29, 34].

Although the extraction efficiency of these methods is high, it doesn't purify the biomolecule with high purity grade. Therefore, comparing to techniques already considered previously, the partition in aqueous two-phase system (ATPS) is a very efficient alternative for the extraction and purification of biomolecules. The advantages of this system are various, such as: biocompatible environment, low interfacial tension, low energy, easy application in large scale, elevated extraction capacity, mild conditions, low cost, easy recovery of alcohol through evaporation, low viscosity of the phases, short process time and potential to reach the purification desired and product concentration in one single phase [35, 36].

The goal of this study was to verify the efficiency of different rutin extraction systems from acerola wastes using conventional extraction methods, assisted by ultrasound, and aqueous two phase systems (ATPS).

2. Material and methods

2.1. Material

Methanol, ethanol, 1 – propanol, 2 – propanol, tribasic potassium phosphate (K_3PO_4), anhydrous dibasic potassium (K_2HPO_4) and anhydrous monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Alcohols have purity superior to 99%. The phosphate salts are more than 98% pure. Rutin (≥ 97 wt % pure) were obtained from Acros Organics (New Jersey, EUA). Distilled and deionized water was used in the experiment. Acerola in maturation stadium was obtained from supermarkets in Aracaju, Brazil. The fruit was squeezed by a home device to remove the pulp and the waste generated were maintained at -20 °C until they were used.

2.2. Rutin extraction from acerola wastes with cold solvent

In this experiment 10 g of total mass of wastes from acerola (peels and seeds) were dissolved in 25 mL of alcohol (methanol, ethanol, 1-propanol, 2- propanol) with alcohols concentrations varying from 20 – 100% (v/v) in binary mixture of water and alcohol at 25 ± 1 °C, under constant agitation at 200 rpm (agitator Marconi MA – 095) during a 24 h period and filtrated under vacuum through a Whatman N° 1 filter. After, they were centrifuged (20.000 rpm for 15 min), the supernatant collected was concentrated in a route evaporator at 45 °C and submitted to rutin concentration analysis by high performance liquide chromatography (HPLC).

2.3. Rutin extraction assisted by ultrasound from acerola wastes

In the extraction assisted by ultrasound, Ultrasonic Cleaner (UNIQUE – USC 2850A) with potency and standard frequency of 220 W and 40 kHz, respectively, 10 g of acerola waste were dissolved in 100% (w/v) ethanol and 1 – propanol in different times (15, 30, 45,

60 and 120 min) to determine the best extraction time. Five percentiles of the total frequency were studied in the extraction (20, 40, 60, 80 and 100 %). Also the relation solid:solvent (10:25, 10:50, 10:100 g.mL⁻¹) were studied at 25 ± 1 °C. After extraction the samples were filtered under vacuum by the Whatman N° 1 filter and centrifuged (20.000 x g for 15 min). Then, the supernatant collected was concentrated in a route evaporator at 45 °C and submitted to rutin concentration analysis by HPLC. As control, the extraction of ultrapure water was done with the same procedure above. The extraction assisted by ultrasound was compared to the conventional extraction.

2.4. Simultaneous extraction of rutin from acerola wastes assisted by ultrasound and agitation

To enhance the efficiency of rutin extraction from acerola a ultrasound bath was used (UNIQUE – USC 2850A) connected to an orbital agitator (Marconi MA – 095). The procedures used for the combined extraction were similar to those used in the extractions assisted by ultrasound described above, using the best extraction conditions. Following, samples were filtered under vacuum through the membrane filter (0,42 μm) and centrifuged (20.000 rpm for 15 min), followed, the supernatant collected was concentrated in a route evaporator at 45 °C and submitted to analysis of rutin concentration by HPLC.

2.5. Rutin concentration determination by acerola waste samples using aqueous two phase systems (ATPS)

Rutin extraction using aqueous two-phase system (ATPS) was taken in a real acerola waste sample (peel).

The mixture point for the extraction system were chosen based on the phase diagram for alcohol/potassium salt presented in previous works of the research group [36]. The

preferable composition of ATPS to extract rutin in the real systems were chosen taking into account the higher extraction efficiency obtained with the conventional, ultrasound and combined system. Therefore, the 1-propanol (50 wt%) + buffer (15 wt%) + H₂O (35 wt%) was used seeking to maximize the rutin concentration in the upper phase while the system composed of 1-propanol (50 wt%) + K₃PO₄ (15 wt%) + H₂O (35 wt%) was used based in the enhanced partition coefficient for rutin obtained in the bottom phase.

The hidroalcoholic solution (1-propanol) at 50 wt% at 25 ± 1°C, were obtained from extractions described above and filtered through the membrane filter, following the samples were centrifuged (20.000 rpm for 15 min) and the supernatant was used in the ATPS construction. The inorganic salt (K₃PO₄ and buffer: K₂HPO₄/KH₂PO₄) in a 15 wt% concentration and distilled water were added to the respective ATPS prepared in the total concentrations required up to a 14 mL volume. After the extraction system preparation, these systems were gently agitated and centrifuged at 3.000 x g during 10 min. Then, the thermostatic bath (Marconi - MA 127) at 25 ± 1 °C and local atmospheric pressure was used, during at least 18 hours, until equilibrium is reached. The samples were closed during this period to avoid vaporization of alcohols.

The partition coefficient (K_{rut}) was defined as the concentration of rutin in the top phase, divided by the bottom phase correspondent. In order to evaluate the extraction process, the volume relation (R_v) and rutin extraction efficiency (E%) were calculated using equations 1 to 3, according to Souza *et al.* [37].

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

$$R_v = \frac{V_T}{V_B} \quad (2)$$

$$E_{rut} = 100 \times \frac{K_{rut} \times R_v}{1 + K_{rut} \times R_v} \quad (3)$$

where C is the rutin concentration, V the phase volume, T and B correspond to top and bottom, respectively.

2.6. Rutin determination

Rutin concentrations in the acerola wastes were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) described by Fang *et al.* [38] with modifications. The chromatographic separations were done using a column (26.0 cm x 4.6 mm, 5 μ m) Discovery HS C18 (Supelco, USA). The HPLC system consists of a series of bonding detectors LC Varian Prostar (Australia), with a UV-visible detector at 360 nm and Galaxie chromatography software with data analysis. Two solvents were used with a constant flow rate 1.0 mL/min. The solvent A consists of 20% acetonitrile, 5% methanol in water (pH 3.0), solvent B included 55% of acetonitrile and 15% methanol in water (pH 3.0). All the solvent used were of HPLC grade. For the elution program, the following proportions of B solvent were used: 0 – 15 min, 2% B, 15 – 28 min, 2 – 28% B, 28 – 40 min, 28 – 36% B, 40 – 44 min, 36% B, 44 – 45 min, 36 – 80 % B, 45 – 52 min, 80 % B.

Therefore, concentration of rutin was measured in the phase rich with alcohol (top phase), with the concentration in the other phase (bottom phase) estimated by the difference of the real sample of the acerola waste, and the concentration of the top phase. The rutin amount used was in duplicate, and the average of standard deviation and the respective analysis were taken.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic results

The standard chromatograms, of the conventional extraction, assisted by ultrasound and combined extraction of rutin from the acerola waste (peel and seeds) are presented in Figure 2. It was observed that the pattern substance and the samples obtained a retention time of nearly 7 minutes.

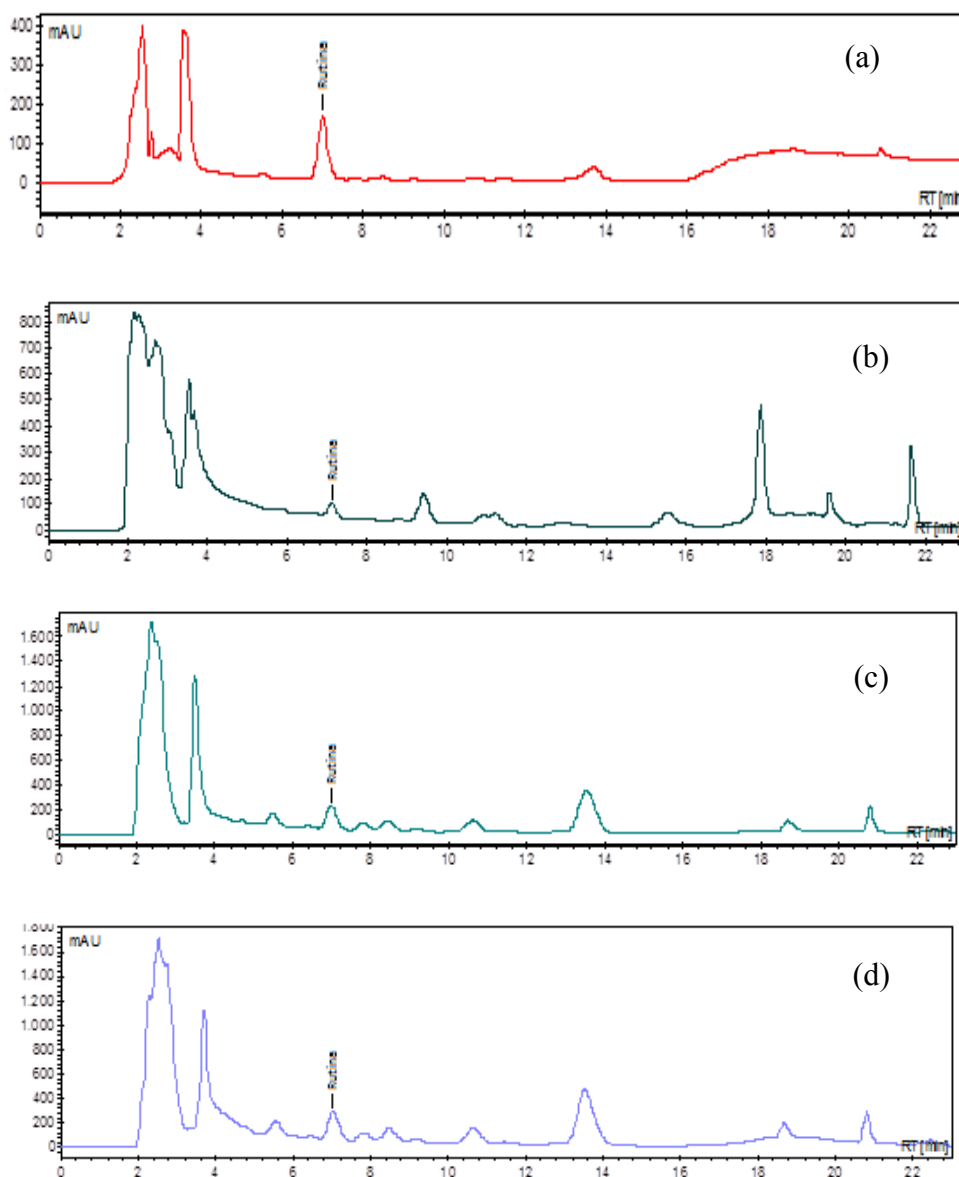


Figure 2. standard chromatograms and samples: (a) standard, (b) rutin conventional extraction, (c) rutin extraction assisted by ultrasound, (d) extraction combined with rutin.

3.2. Conventional extraction by agitation

Figure 3 shows a rutin extraction yield from acerola wastes of various alcohols (methanol, ethanol, 1 – propanol, 2 – propanol) with different concentrations (20, 40, 60, 80 and 100 %, v/v).

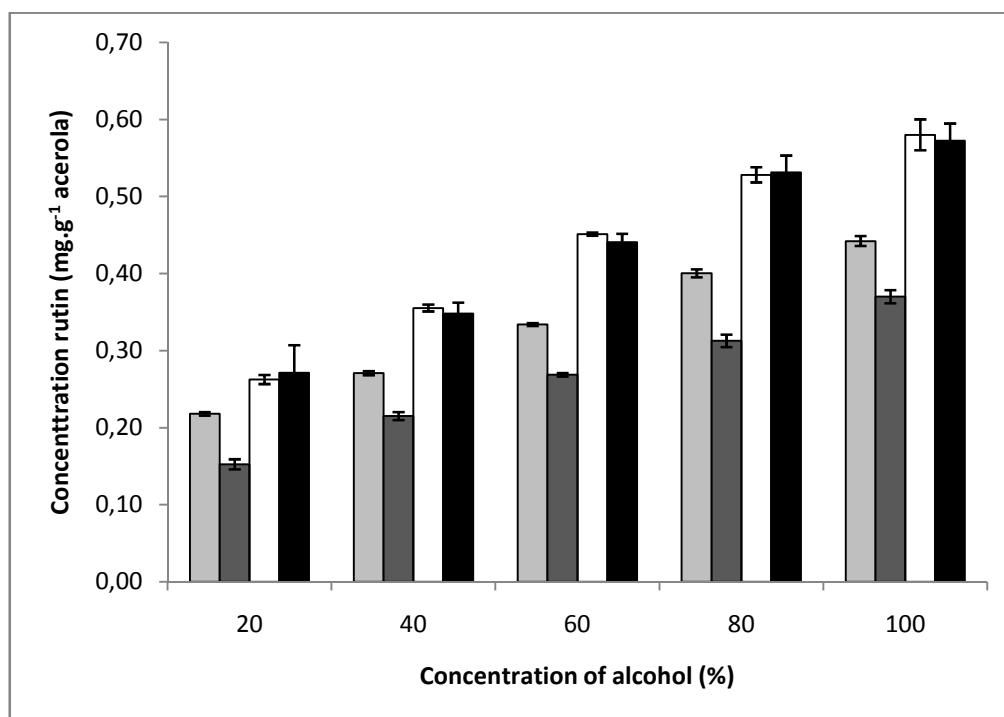


Figure 3. The effect of alcohol type and concentration in rutin from acerola waste in cold conventional extraction with agitation. Alcohols: ■ – methanol; ■ – ethanol; □ – 1-propanol; ■ – 2-propanol.

It was observed that rutin had the highest extraction yield with 1 – propanol. This occurs because of the solubility of rutin being highly affected by the solvent polarity and by the bioflavonoid structure, because the presence of the sugar group in the rutin molecule reduces the solubility of the more polar solvents [39]. Reichart [40] determined that the polarity of many solvents among them the alcohols, and the following sequence was observed in kcal.mol⁻¹:

Methanol (55.4) > ethanol (51.9) > 1 – propanol (50.7) > 2 – propanol (48.4)

The concentration variation of the alcohols also influenced in the rutin extraction from the acerola wastes. The biomolecule had the highest yield in the extraction of 100% of 1 – propanol. A great variation in the rates of rutin can be observed according to the proportion of alcohol: water used in the extraction. Therefore, a measure that elevated the proportion of alcohol in the binary mixture (alcohol + water) raised the rutin extraction yield for the samples. This occurred probably because of the relative polarity and the increase of effective expansion of the water matrix, which contributed to the increase of surface contact area of solute – solvent (Yang e Zhang, 2008) [24]. According to Peng *et al.* [41] the rutin solubility increased as the molar fraction raised in the binary ethanol + water mixture, thus, rutin solubility in the same temperature in pure ethanol is higher than any other form of binary mixture ethanol + water. Thoo *et al.* [42] studied the variation in ethanol concentration in the phenolic antioxidant extraction and verified that the total flavonoid concentration had a higher extraction yield with 100% ethanol.

Therefore, 100% of 1-propanol was chosen as the extraction solvent in further studies due to its higher yield in rutin extraction from acerola wastes.

3.3. Rutin extraction assisted by ultrasound from acerola waste

To optimize the rutin extraction from acerola waste assisted by ultrasound, 100% of 1-propanol was used, since it presents the best extraction yield from the conventional biomolecule extraction and 100% of ethanol, since it is less toxic and easily recovered by distillation under low pressure. However, 1-propanol and ethanol were used as extraction solvents. To study the process efficiency of the extraction assisted by ultrasound some parameters were varied, such as, extraction time (5, 15, 30, 45, 60 and 120 min), solvent/material ratio 2.5, 5.0 and 10.0 mL.g⁻¹), ultrasound frequency (20, 40, 60, 80 and 100 kHz) and extraction cycle (1, 2, 3, 4, and 5 times).

3.3.1. Extraction time influence

The extraction time influence over the rutin extraction was studied as shown in Figure 4.

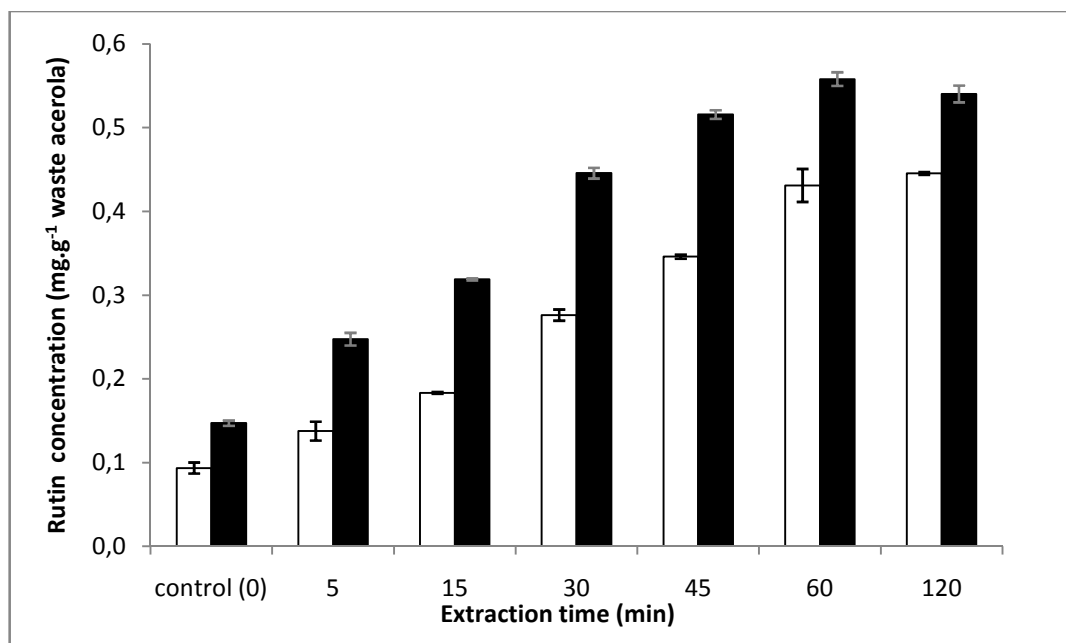


Figure 4. Extraction time influence on ultrasound of the rutin extraction yields from acerola waste (peel and seeds) using ethanol (□) and 1-propanol (■) solvents. Control procedure (0): magnetic agitation rather than ultrasound treatment (24 hours).

The rutin extraction yield increased significantly with extraction times of 5 to 60 minutes, then, it was kept stationary. Under the ultrasound effect, the rutin extraction yield rises rapidly with the extraction times for the first 45 minutes, and slowly, the following 60 min. according to Yang and Zhang [24], the extraction times influence over the rutin extraction yield in dry stems of *E. alatus* (Thunb.) Sieb is highly dependent of time, since the authors verified an increase in rutin yield of nearly 0.19 mg.g⁻¹ to 0.3 mg.g⁻¹ in a time gap that varies between 5 – 120 minutes. Therefore, 60 minutes was chosen as the standard extraction condition.

3.3.2. . Solvent/sample weight relation influence

The influence of the solvent volume in the rutin extraction yield in acerola waste was evaluated as shown in Figure 5.

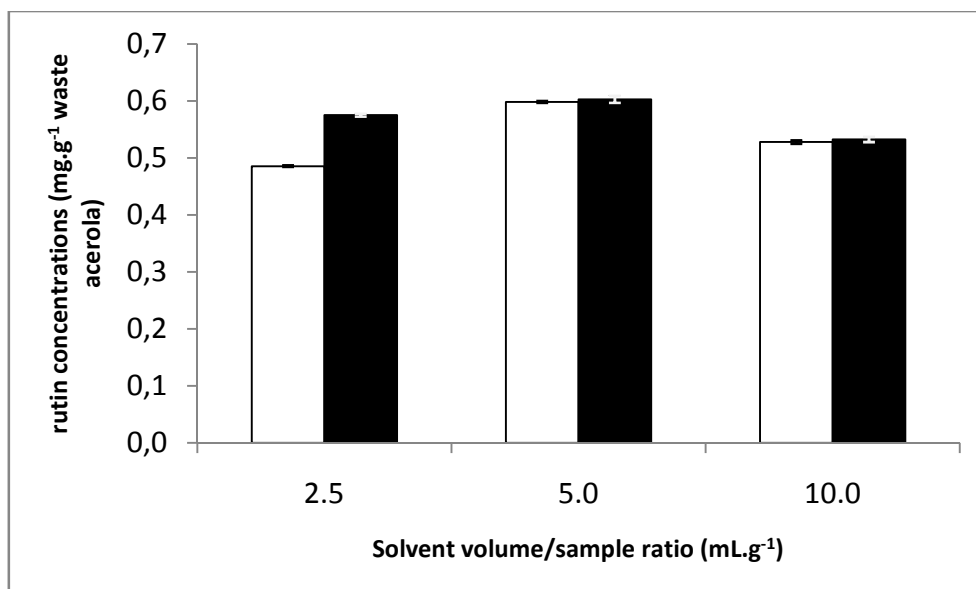


Figure 5. Solvent volume/sample weight in the rutin extraction yield in acerola waste (peel and seeds) using ethanol (□) and 1- propanol (■) solvents.

Results indicate that the increase in the yield of rutin extraction can be observed with an increase of the solvent volume/sample weight ratio, in special when this proportion is increased from 2.5 to 5.0. This same behavior agrees with Yang and Zhang [24] study, that evaluated the influence of the solvent volume in the rutin extraction and quercetin in dry stems of *E. alatus* (Thunb.) and reported an increase in the extraction yield of rutin occurred with the increase in solvent volume/weight sample, specially when this proportion was increased from 20 to 40, further increase showed an extraction reduction. Xie *et al.* [43] studied the extraction efficiency of rutin from *Hibiscus mutabilis* L. and verified significant difference in the rutin extraction yield with an increase of the solvent volume/sample weight

to 25 mL.g⁻¹. Generally, a greater solvent volume can dissolve components in a more efficient manner, leading to an increase in extraction yield.

It is seen that for the 1-propanol solvent the rutin extraction yield in the solvent volume/sample weight ratio of 2.5 to 5.0 did not show significant differences, however a significant difference was seen for the same relation for ethanol solvent. Therefore, the solvent volume/sample weight of 5.0 mL.g⁻¹ was selected.

3.3.3. Frequency of extractions assisted by ultrasound influence

The frequency of extractions assisted by ultrasound influence over the rutin extraction yield for acerola waste is shown in Figure 6.

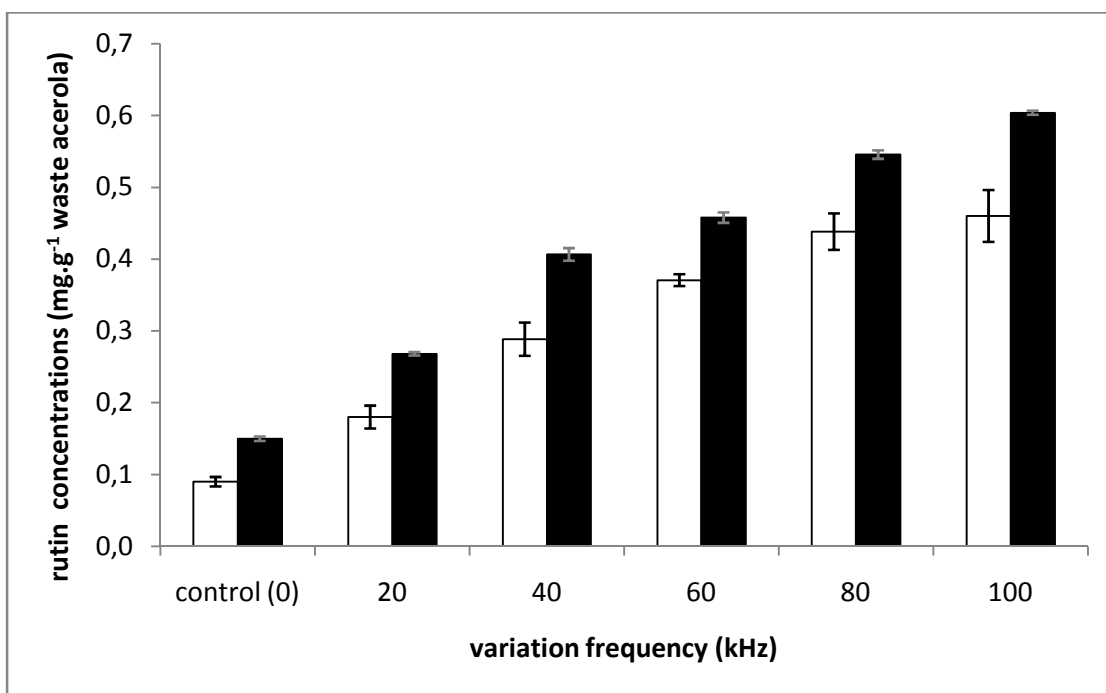


Figure 6. The frequency of extractions assisted by ultrasound influence over the rutin extraction yield for acerola waste assisted by ultrasound using ethanol (□) and 1-propanol (■) solvents. Control procedure (0): magnetic agitation instead of ultrasound treatment.

The rutin extraction process with ultrasound is enhanced due to the mass transfer of the goal species from the solid phase for the extraction solvent [44].

It is seen that rutin extraction yield increases with the ultrasound frequency. Results indicate that, in both cases, the extraction yield is highly dependent of frequency. This can be because of the measures that increase as the amplitude increases, and consequently the cavitation bubbles are bigger (increase in cavitation) producing therefore a greater shear force for sample implosion, causing a maximal rupture of the matrix cellular membranes, easing therefore the leaching of the desired component for out of the cellular matrix and solvent migration to the cellular matrix [45, 46].

Breitbach *et al.* [47] studied the factors that influence adsorption and desorption during cavitation process in the ultrasound extraction and concluded that the main factors that interfere in cavitation are: intensity and frequency that is produced by ultrasound. Depending of these factors the bubble production can occur for different sizes, promoting higher erosion of the solid surface, therefore accelerating the heating and mass transfer making the method more or less efficient.

3.3.4. Extraction cycle influence

Rutin repeated and successive extractions influence, or the extraction cycle is seen in Figure 7. Extraction conditions established with the parameters obtained up to now in the study, being the type and solvent concentration: 100 % ethanol and 100 %1 propanol; extraction time: 60 minutes; solvent/material ratio: 5.0 mL/g; ultrasound frequency: 100 kHz. Wastes were, then, re-extracted four times with the same procedure done the first time. Deionized water extraction was also done for this study.

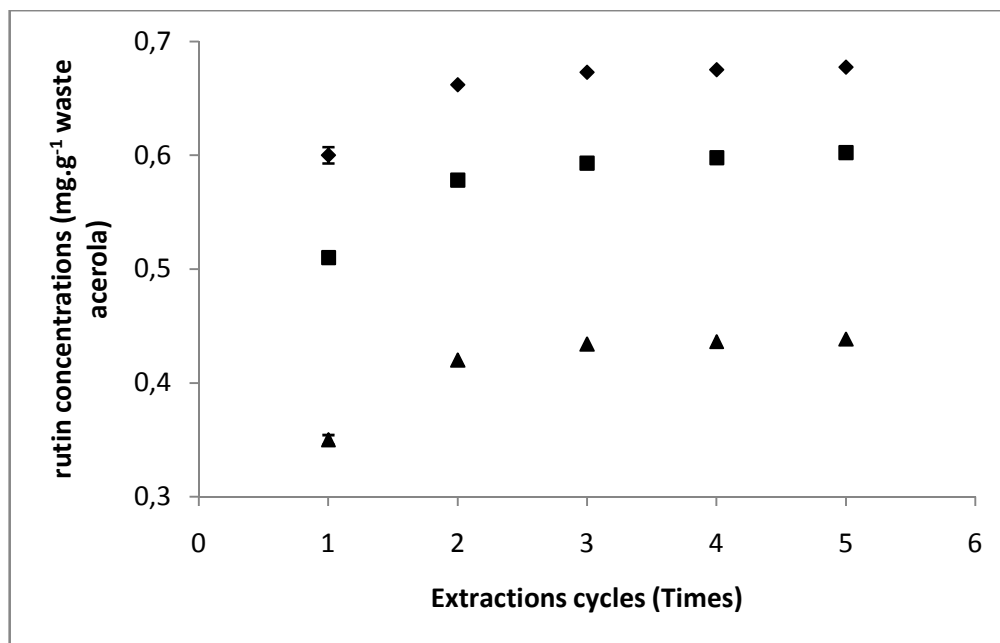


Figure 7. Rutin extraction cycle assisted by ultrasound influence using solvents: ethanol (■); 1-propanol (◆) and water (▲).

The data show the total yield obtained in five consecutive cycles for ethanol, 1 – propanol and water was of $0.60 \pm 0.00 \text{ mg.g}^{-1}$, $0.68 \pm \text{mg.g}^{-1}$, $0.44 \pm 0.00 \text{ mg.g}^{-1}$, respectively, when 84.7%, 88.6% and 79.8% of ethanol extraction, 1-propanol and water, was done in the extraction process in the first cycle, after the third cycle maximal rutin was extracted.

Based on the result seen above, the optimal conditions of final rutin extraction assisted by ultrasound, were as followed: concentration and solvent: 100% of 1-propanol; extraction time: 60 minutes; solvent/material ratio: 5.0 mL/g; ultrasound frequency: 100 kHz and extraction cycle: 2 times.

3.4. Simultaneous extraction assisted by ultrasound and agitation

In this study proposed by a method to evaluate the rutin extraction yield from acerola waste in a combined extraction using simultaneously to extraction assisted by ultrasound coupled with agitation in optimal conditions as described above.

The yield comparison results of conventional assisted by ultrasound and combined extraction are seen in Figure 8.

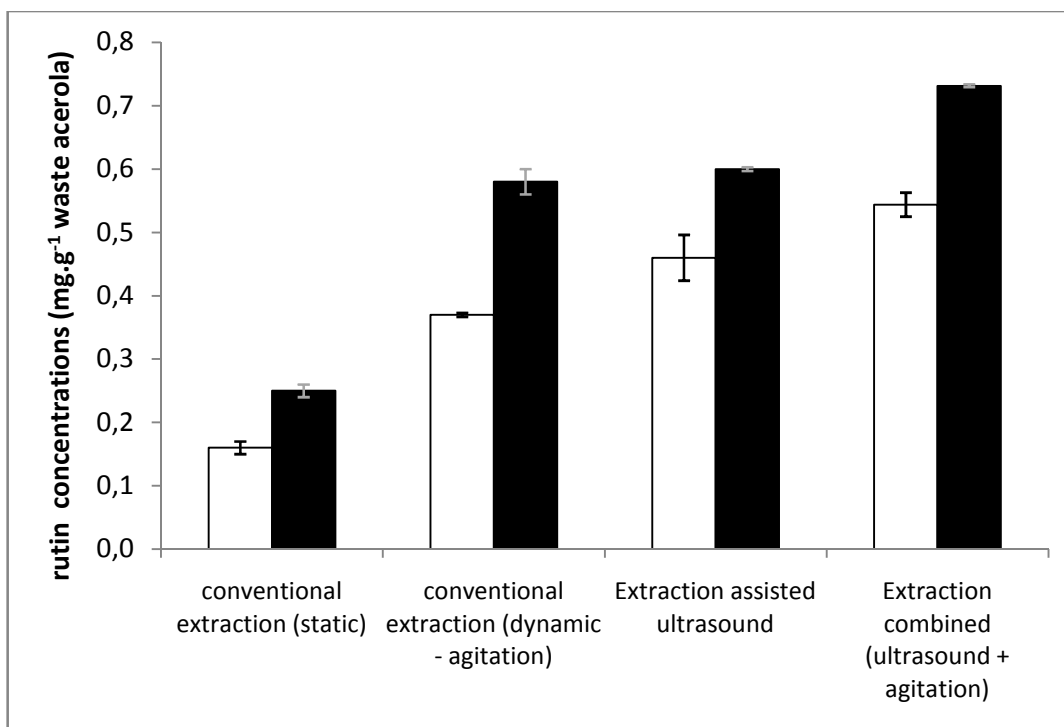


Figure 8. The yield comparison results of conventional assisted by ultrasound and Simultaneous extraction (ultrasound + agitation) using ethanol (□) and 1-propanol (■) solvents.

Rutin extraction yield from acerola waste increased according with the extraction method used. A significant difference of the methods was observed. Combined extraction (ultrasound + agitation) presented value significantly higher, while conventional and assisted extraction by ultrasound presented inferior values. This behavior can be explained due to synergy between ultrasound cavitation and mechanical agitation simultaneously in the combined extraction, because these two combined process ease the mass transference of the soluble components from the material to the solvent by diffusion and osmotic process

propitiating a selective extraction of the goal component making the rutin extraction increase considering the relation with other extraction methods study [27, 28, 30].

3.5. Rutin extraction combined using aqueous two-phase system formed by alcohols and potassium phosphate salts

Rutin extraction in aqueous two-phase system formed by alcohol and potassium phosphate salt was done using acerola waste (peel and seeds). Were study in extraction system formed by (1-propanol - 50 wt%, K_3PO_4 - 15 wt%, and water - 35% by weight) to recovered in the bottom phase rutin and for comparison with the system to extract the top phase (1-propanol – 50 wt%, K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer - 15 wt%, and water – 35 wt%), and therefore, secure that the system can be manipulated and biomolecule can be recovered in both phases.

Firstly the conventional extraction method assisted by ultrasound and combined extraction at ambient temperature, using 1-propanol (50 wt%) with solvents were analyzed. The alcohol concentration corresponds to the best values obtained in the rutin extraction yield in the extraction studied. The conventional rutin extraction, assisted by ultrasound extraction and conventional extraction yield were $0.53 \pm 0.00 \text{ mg.g}^{-1}$ of acerola waste; $0.55 \pm 0.01 \text{ mg.g}^{-1}$ and 0.62 ± 0.01 acerola waste respectively. Yang and Zhang [24] observed the rutin yield of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb of $0.157 \pm 0.015 \text{ mg.g}^{-1}$ by maceration and $0.299 \pm 0.022 \text{ mg.g}^{-1}$ of the extraction assisted by ultrasound (50 kHz 100 W, and ambient temperature).

Comparing the results of K_{rut} in systems with 1-propanol + buffer and 1-propanol + K_3PO_4 , verifying that the rutin extraction yield in conventional extraction, extraction assisted by ultrasound and combined extraction using 1 – propanol solvent influencing the rutin partitioning extraction. A higher rutin extraction yield was seen in the combined extraction

(ultrasound and agitation) obtaining higher partitioning coefficient in the top phase and lower partitioning coefficient in the lower phase. The results shown in Table 1.

Table 1. Extraction parameters and partitioning coefficients of rutin obtained from the real sample of waste of acerola using ATPS.

System	1-propanol + buffer		1-propanol + K ₃ PO ₄	
	$K_{rut} \pm \text{std}$	$E_{rut}(\%) \pm \text{std}$	$K_{rut} \pm \text{std}$	$E_{rut}(\%) \pm \text{std}$
conventional extraction	15.53±0.86	96.31±0.66	0.215±0.015	15.14±0.66
ultrasound extraction	15.92±0.87	96.38±1.00	0.149±0.012	11.61±1.00
simultaneou extraction	17.78±0.64	96.63±1.00	0.099±0.013	8.02±1.00

Rutin extraction in the 1-propanol + buffer has strong tendency of elevated recoveries in the top to validate the extraction process of the aqueous two-phase system.

To analyze the partitioning for rutin for the bottom phase, using the system constituted by 1-propanol (50 wt%) + K₃PO₄ (15 wt%) + water (35 wt%). According to Table 1 the values validate the rutin extraction in bottom phase. In this context, the real extraction described above, rutin migrates completely from the top phase ($K_{rut} > 1$ with an extraction coefficient among $96.31 \pm 0.66\%$ and $96.63 \pm 1.00\%$) using a system ATPS formed by 50 wt% of 1-propanol + 15 wt% in buffer solution, while rutin is concentrated in the bottom phase ($K_{rut} \ll 1$ with extraction efficiency between $8.02 \pm 1.00\%$ and $15.14 \pm 0.66\%$) using the ATPS system formed by 50 wt% of 1-propanol + 15 wt% of K₃PO₄ salt.

In general, the results proved that a rutin partitioning can be done using aqueous two phase system. In general, the results prove that the rutin partition can be done using aqueous two phase system formed by alcohol/potassium phosphate salt.

4. Conclusion

Three rutin extraction from the acerola waste were investigated and compared. Extraction methods affected strongly the rutin yield. Combined extraction (ultrasound and agitation) showed an elevated yield in rutin extraction of acerola waste.

Aqueous two – phase system (ATPS) constituted by alcohols and potassium phosphate allows the rutin partitioning for the top and bottom phase, depending on the combination alcohol/salt chosen, making the system highly versatile. The ATPS application for the real sample of the acerola waste, concluding that it is possible to conceive the separation process cheaper and simpler, able to promote the rutin biomolecule extraction.

Acknowledgments

The authors are grateful financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC/SE, for the scholarship of I.A.O. Reis, and CAPES/Brazil for the scholarship of S. B. Santos.

References

- [1] A. Vendramini, L. Trugo, Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. Food Chem. 1 (2000) 195-198.
- [2] R. I. N. Carvalho, I. Manica, Acerola: Composição e armazenamento de frutos. Cad. Hort. 1 (1993) 1-7.

- [3] V. Rosso, S. Hillebrand, E. Montilla, F. Bobbio, P. Winterhalter, A. Mercadante, Determination of anthocyanins from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) and açai (*Euterpe oleracea* Mart.) by HPLC–PDA–MS/MS. *J. Food Compos. Anal.*, 21 (2008) 291-299.
- [4] G.E.G. Moreira, M. G. M. Costa, A. C. R. Souza, E. S. Brito, M. F. D. Medeiros, H. M.C. Azeredo, Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *Food Sci. Technol.* 42 (2009) 641–645.
- [5] Hanamura, T.; Hagiwara, T.; Kawagishi, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 280-286.
- [6] V. L. A. G. Lima, E. A. Mélo, M. I. S. Maciel, F. G. Prazeres, R. S. Musser, D. E. S. Lima, Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chem.* 90 (2005) 565–568.
- [7] P. Cerezal-Mezquita, Y. García-Vigoa, La acerola – fruta marginada de America con alto contenido de acido ascorbico. *Aliment.* 37 (2000) 113-125.
- [8] C.A.S. Freitas, G.A. Maia, J.M.C. Costa, R.W. Figueiredo, P.H.M. Sousa, Acerola: produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. *Rev. Bras. Agrociênc.* 12 (2006) 395-400.
- [9] Y. Kim, D. W. Giraud, J. A. Driskell, Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetables. *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 458-465.
- [10] S. M. L. Vasconcelos, A. M. Silva, M. O. F. Goulart, Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. *Nutrire* 31(2006) 95-118.
- [11] P.K. Caetano, E.R. Daiuto, R.L. Vieites, Característica físico-química e sensorial de geléia elaborada com polpa e suco de acerola. *Braz. J. Food Technol.* 15, (2012) 191-197.

- [12] V. Carpentieri-Pípolo, C. E. C. Prete, M. G. N. Gonzalez, I. O. Popper, Novas cultivares de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). UEL 3 (Dominga) - UEL 4 (Lígia) - UEL 5 (Natália). Rev Bras Frutic. 24 (2002) 124-126.
- [13] R. A. Carvalho, Análise econômica da produção de acerola no município de Tomé-Açú, Pará, Belém: Embrapa Amazônia Oriental 49 (2000) 21.
- [14] F. Yamashita, M. T. Benasse, A.C. Tonzar, S. Moriya, J. G. Fernandes, Produtos de acerola: estudo da estabilidade de vitamina C. Ciênc. Tecnol. Alim. 23 (2003) 92- 94.
- [15] Y.Y. Soong, P.J. Barlow, Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Food Chem. 88 (2004) 411-417.
- [16] C.M. Ajila, , S.G. Bhat, U.J.S. Prasada Rao, Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. Food Chem. 102 (2007) 1006-1011.
- [17] C. Guo, J. Yang, J. Wei, Y. Li, J. Xu, Y. Jiang, Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr. Res. 23 (2003) 1719-1726.
- [18] M. Ghiasi,; S. Taheri, M. Tafazzoli, Dynamic stereochemistry of rutin (vitamin P) in solution: theoretical approaches and experimental validation. Carbohydr. Res. 345 (2010) 1760–1766.
- [19] I. Kreft, N. Fabjan, K. Yasumoto, Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. Food Chem. 98 (2006) 508–512.
- [20] P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi, L. Sebastiani, Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. J. Food Compos. Anal. 21 (2008) 589– 598.
- [21] C. Thomson, A. Bloch, M. Hasler, Position of the American Dietetic Association, Orlando 99 (1999) 1280-1281.

- [22] T. Mezadri, D. Villaño, M.S. Fernández-Pachón, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 282–290.
- [23] D.Y. Zhang, Y.G. Zu, Y.L. Fu, W. Wang, L. Zhang, M. Luo, F.S. Mu, X.H. Yao, M.H. Duan, Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Sep. Purif. Technol.* 102 (2013) 26-33.
- [24] Y. Yang, F. Zhang, Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrason. Sonochem.* 15 (2008) 308–313.
- [25] E. M. Marinova, N. V. I. Yanishlieva, Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. *Food Chem.*, 58 (1997) 245-248.
- [26] B. Yang, M. M. Zhao, J. Shi, N. Yang, Y. M. Jiang, Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chem.*, 106 (2008) 685–690.
- [27] J.C.S. Barboza, A.A. Serra, O efeito do ultra-som em reações químicas. *Quím. Nova* 15 (1992) 302-316.
- [28] F. Chemat, Z.-E. Huma, M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835.
- [29] D. Knorr, Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *J. Food Eng.*, 56 (2003) 131–134.
- [30] M. Vinatoru, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 303–313.
- [31] A. S. Engelbertha, E. C. Clausena, D. J. Carrier, Comparing extraction methods to recover ginseng saponins from American ginseng (*Panax quinquefolium*), followed by purification using fast centrifugal partition chromatography with HPLC verification. *Sep. Purif. Technol.* 72 (2010) 1–6.

- [32] B. Yang, Y. Jiang, M. Zhao, J. Shi, L. Wang, Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Polym. Degrad. Stabil.* 93 (2008) 268-272.
- [33] K. N. Prasad, B. Yang, M. Zhao, X. Wei, Y. Jiang, F. Chen, High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Sep. Purif. Technol.* 70 (2009) 41-45.
- [34] M. Corrales, S. Toepfl, P. Butz, D. Knorr, B. Tauscher, Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovat Food Sci. Emerg. Tech.* 9 (2008) 5-91.
- [35] P. A. Albertsson, Partition of cell particles and macromolecules. Wiley Interscience, New York, USA, 1986.
- [36] I.A.O. Reis, S.B. Santos, L.A. Santos, N. Oliveira, M.G. Freire, J.F.B. Pereira, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Increased Significance of Food Wastes: Selective Recovery of Added-Value Compounds. *Food Chem.*, 135 (2012) 2453-2461.
- [37] R.L. Souza, J.M.P. Barbosa, G.M. Zanin, M.W.N. Lobão, C.M.F. Soares, A.S. Lima, Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Appl. Biochem. Biotech.* 16 (2010) 288-300.
- [38] F. Fang, J-M. Li, Q-H. Pan, W-D. Huang, Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. *Food Chem.* 101 (2007) 428-433.
- [39] L. Chebil, C. Humeau, J. Anthoni, F. Dehez, J-M. Engasser, M Ghoul,. Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *J. Chem. Eng. Data*, 52 (2007) 1552-1556.
- [40] C. Reichardt, Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* 94 (1994) 2319-2358.

- [41] B. Peng, R. Li, W. Yan, Solubility of Rutin in Ethanol + Water at (273.15 to 323.15) K. J. Chem. Eng. Data 54 (2009) 1378-1381.
- [42] Y. Y. Thoo, S. K. Ho, J. Y. Liang, C. W. Ho, C. P. Tan, Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). Food Chem., 120 (2010) 290-295.
- [43] J. Xie, L. Shi, X. Zhu, P. Wang, Y. Zhao, W. Su, Mechanochemical-assisted efficient extraction of rutin from *Hibiscus mutabilis* L. Innovat Food Sci. Emerg. Tech., 12 (2011) 146-152.
- [44] A.J. Hu, S. Zhao, H. Liang, T.Q. Qiu, G. Chen. Ultrasound assisted supercritical fluid extraction of oil and coixenolide from adlay seed. Ultrason. Sonochem. 14 (2007) 219-224.
- [45] P. Chowdhury, T. Viraraghavan, Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes – A review. Sci. Total Environ. 407 (2009) 2474-2492.
- [46] S.R. Shirsatha, S.H. Sonawanea, P.R. Gogateb, Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. Chem. Eng. Prog. 53 (2012) 10-23.
- [47] M. Breitbach, D. Bathen,; H. Schmidt-Traub. Effect of Ultrasound on Adsorption and Desorption Processes. Ind. Eng. Chem. Res., 42 (2003) 5635-5646.

**Recuperação de compostos antioxidantes a partir de resíduos da fruta jamelão:
Extração de malvidina usando sistema de duas fases aquosas formados por alcoóis e sais
de fosfato de potássio**

Igor A.O. Reis¹, Andressa F. Campos², Patrícia H.S. Santos², Samuel B. Santos¹, Lisiane S. Freitas³, Cleide M.F. Soares^{1,4}, Álvaro S. Lima^{1,4,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. CEP: 49032-490, Aracaju-SE, Brasil

²Universidade Tiradentes, Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA).

³Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Química.

⁴Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300. CEP: 49032-490, Aracaju – SE, Brasil

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

Resumo

Sistemas aquosos bifásicos (SAB's) formados por alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4) para a extração da malvidina e fenóis totais a partir do jamelão foram estudados neste trabalho. A influência dos constituintes e do pH dos sistemas promove a partição da malvidina e dos fenóis totais para fases de topo ou fundo, tornando o sistema versátil para a recuperação da biomolécula alvo. O tipo de sal de fosfato de potássio influenciou o valor de pH das fases, ocorrendo por consequência a desprotonação da malvidina e dos fenóis totais e a migração das biomoléculas para uma fase específica, atuando como uma força de acionamento para o processo de partição. Os resultados indicaram que os SAB's utilizados neste trabalho foram um valioso procedimento para extrair malvidina de resíduos de jamelão.

Palavras-chave: malvidina, compostos fenólicos, extração, sistema de duas fases aquosas, alcoóis, sais inorgânicos.

1. Introdução

O jamelão (*Syzygium cumini*), é uma planta da família das *Myrtaceae*, tem origem na Ásia tropical, especificamente na Índia, mas se propagou por grande parte no Nordeste do Brasil.^{1,2} A fruta jamelão é pequena e de forma ovóide, que se torna roxa escura quando completamente madura. Sua pele é fina, lustrosa e aderente. Sua polpa, também roxa, é carnosa e envolve um caroço único e grande. O sabor, apesar de um pouco adstringente, é agradável ao paladar, e a cor apresenta grande impacto visual.³ Uma parte de sua produção é aproveitada pelas populações locais, entretanto uma grande parte de suas frutas é

desperdiçada na época da safra, em virtude da alta produção por árvore, da curta vida útil da fruta in natura e, principalmente, por falta de seu aproveitamento processado.⁴

A fruta jamelão é rica em compostos antioxidantes, entre eles destacam-se compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas.^{2,4} O teor de antocianina no jamelão é considerado mais elevada do que em uvas, 6-600 mg/100g de peso fresco e repolho vermelho, 25 mg/100g de peso fresco.⁵ Brito *et al.*² verificaram que entre as frutas tropicais o fruto jamelão incluiu a mais larga variedade de compostos antociânicos: delphinidina, cianidina, petunidina peonidina e malvidina, todos apresentando-se como diglicosídeos. O composto majoritário no jamelão foi delphinidina 3,5- diglicosídeo (256 mg/100g de peso seco), seguido por petunidina 3,5-diglicosídeo (245 mg/100g), a malvidina 3,5-diglicosídeo (166 mg/100g), peonidina 3,5-diglicosídeo (75 mg/100g), e cianidina 3,5-diglicosídeo (29 mg/100g). De acordo com Sari *et al.*,⁶ esses compostos são principalmente encontrados na casca da fruta com um conteúdo de antocianina total em torno de 731 mg/100g de peso fresco.

As antocianinas são importantes antioxidantes, pois possuem elevadas propriedades antioxidantes,^{1,7} o qual desempenha uma função importante na prevenção de diversas patologias, como câncer e aterosclerose.^{8,9} Assim a incorporação de antocianinas como corante em alimentos não é apenas importante para melhorar a aparência, mas também muito benéfico para a saúde.⁹ Nos últimos anos, o interesse em pigmentos antociânicos aumentou significativamente por causa de seus possíveis benefícios para a saúde como risco reduzido de doença cardíaca coronária, proteção contra a obesidade e hipoglicemia e melhoria da memória.^{2,10,11,12}

Com a popularidade crescente de antioxidantes para promoção da saúde, é importante desenvolver um processo prático e eficientemente para isolar os principais antioxidantes e promover consequentemente a produção dessas substâncias para o consumo humano. É do conhecimento geral que as antocianinas são solúveis em solventes polares e geralmente

extraídos por misturas aquosas de solvente orgânico tal como metanol, etanol ou acetona, que contém uma pequena quantidade de ácido clorídrico, ou ácido fórmico a fim de evitar a degradação de antocianinas aciladas.^{13,14}

Além da extração de solvente convencional, novos métodos baseados em técnicas mais avançadas de extração foram relatados, como a extração com fluido supercrítico,^{15,16} extração de solvente pressurizado,¹⁷ ou processos de membrana.¹⁸ No entanto, limitações dessas novas técnicas incluem os requisitos de equipamento especial, as condições rigorosas de funcionamento, e custos mais elevados na produção industrial.

A fim de eliminar algumas das desvantagens mencionadas acima, o sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser considerado como uma técnica alternativa de extração líquido-líquido devido a sua biocompatibilidade, facilidade de operação que permite um seletivo e rápido processo de extração.¹⁹

Os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) são formados pela mistura de dois polímeros,²⁰ de um polímero e um sal²¹ resultando em duas fases imiscíveis em equilíbrio.²² Hoje em dia, é também possível usar um solvente orgânico e um sal,²³ líquido iônico e sais,²⁴ acetonitrila e açúcar²⁵ e líquidos iônicos como um adjuvante no processo de separação.²⁶ No entanto, o uso de sistemas polímero-polímero e polímero-sal apresentam algumas desvantagens como a segregação lenta das fases e a difícil reciclagem dos componentes que formam as fases.¹⁹ No caso do uso dos líquidos iônicos o seu alto valor torna uma das desvantagens de aplicação.²⁷ O sistema aquoso bifásico (SAB) formado por alcoóis e sais inorgânicos, têm muitas vantagens, tais como: capacidade de extração elevada, baixo custo, fácil recuperação do álcool por evaporação, baixa viscosidade das fases, o tempo de processo curto e o potencial para atingir a purificação desejada e concentração do produto em uma única etapa.²⁸

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi extrair a malvidina dos resíduos do jamelão e determinar o fator de purificação da biomolécula utilizando sistemas de duas fases aquosas

formados por alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4).

2. Material e Métodos

2.1. Material

Metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os álcoois e os sais de fosfato apresentam um grau de pureza superior a 98% em peso. O ácido fórmico (50%) de grau HPLC foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). A malvidina (> 98% em peso puro) foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA). Água destilada e deionizada foi utilizada em todo o experimento. O jamelão no estágio de maturação foi adquirido no mercado municipal, em Aracaju, Brasil. A fruta foi despulpada em equipamento doméstico e os resíduos gerados foram mantidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e abrigados da luz até serem usados.

2.2. Extração convencional da malvidina e fenóis totais a partir de resíduos do jamelão

Neste experimento 10 g da massa total dos resíduo do jamelão (cascas) foram dissolvidos em 25 ml de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) em $(25 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação constante (agitador a 200 rpm - Marconi MA-095) durante um tempo de 24 h e filtrado sob vácuo através de filtro membrana 0,42 μm . Após este processo, o líquido filtrado foi centrifugado (20.000 rpm por 15 min), o sobrenadante coletado foi concentrado em evaporador a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ para eliminação do solvente e submetido às análises da concentração de malvidina e fenóis totais.

2.3. Partição da malvidina e fenóis totais a partir de amostras dos resíduos de jamelão utilizando sistema aquosobifásico (SAB)

A extração de malvidina e fenóis totais utilizando sistema aquoso bifásico (SAB) foi realizada em uma amostra real de resíduos da fruta jamelão (casca). O ponto de mistura para os sistemas de extração foi escolhido com base nos diagramas de fases formados por álcool/sal de potássio apresentados em trabalhos anteriores do grupo.²³ Assim, o sistema composto de álcool (50% em peso) + sal fosfato de potássio (15% em peso) + H₂O (35% em peso) foi utilizado.

As amostras dos resíduos do jamelão (10 g da massa total) foram dissolvidos em 25 mL de solução aquosa de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) à 50% em peso a 25°C e pressão atmosférica sob agitação constante (agitador a 200 rpm - Marconi MA-095) durante um tempo de 24 h e filtrado sob vácuo através de filtro membrana 0,42 µm. Os sais inorgânicos (K₃PO₄, K₂HPO₄, K₂HPO₄/KH₂PO₄) em uma concentração de 15% em peso e água destilada foram em seguida adicionados aos respectivos SAB's preparados nas concentrações totais requeridas até um volume de 14 mL. Após a preparação dos sistemas de extração, estes sistemas foram agitados e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, foram colocados em banho termostático (Marconi – MA 127) a 25 ± 1°C, durante pelo menos 18 h, para atingir o equilíbrio. Os frascos foram fechados durante este período para evitar a vaporização dos álcoois. Finalmente ambas as fases foram separadas e pesadas, o volume de cada uma das fases foi medida

Os coeficientes de partição da malvidina (K_{MAL}) e dos fenóis totais (K_{FT}) foram definidos como a concentração dos biocompostos na fase de topo, dividido pelo valor correspondente na fase de fundo como descrito na equação 1. A fim de avaliar o processo de extração, a relação do volume (R_V), as porcentagens de recuperação para as fases de topo (R_T)

e fundo (R_B) e o fator de purificação (FP) no topo e fundo foram calculadas utilizando as equações 1 a 6.

$$K_{MAL\ ou\ FT} = \frac{C_T}{C_B} \quad (1)$$

$$R_v = \frac{V_T}{V_B} \quad (2)$$

$$R_T = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_v \cdot K}} \quad (3)$$

$$R_B = \frac{100}{1 + R_v \cdot K} \quad (4)$$

$$FP_T = \frac{CS_\Omega}{CS_T} \quad (5)$$

$$FP_B = \frac{CS_\Omega}{CS_B} \quad (6)$$

onde C é a concentração da malvidina e/ou fenóis totais, V é o volume da fase, T e B correspondem a fase de topo e fundo, respectivamente, CS é a concentração específica (relação entre a concentração da malvidina e a concentração dos fenóis totais) e FP é o fator de purificação.

2.4. Determinação da concentração da malvidina e fenóis totais

A concentração da malvidina nas amostras dos resíduos da fruta jamelão foram determinados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) descrito por Brito *et al.*² com modificações. As separações cromatográficas foram realizadas com um volume de injeção de 20 μ L em uma coluna (26.0 cm x 4.6 mm, 5 μ m) Discovery[®] HS C18

(Supelco, EUA). O Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo *Prominence* da marca Shimadzu consisti de um desgaseificador modelo DGU-20A, detector UV-Visível com varredura de comprimento de onda na faixa de 200 a 800 nm com arranjo de fotodiodos modelo SPD-20MA, sistema de bombas recíprocas modelo LC-6AD/7A e CBM-20A, injetor automático modelo SIL-20A e Software *LCSolution*.

Dois solventes foram utilizados com uma taxa de fluxo constante de 1,0 mL/min. O solvente A consistiu de 10% ácido fórmico aquoso e o solvente B de 10% de ácido fórmico em metanol. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC. Para o programa de eluição, as seguintes proporções de solvente B foram utilizadas: 0-32 min, 12-25% B, 32-48 min, 25-60% B, 48-50 min, 60-100% B, 50-55 min, 100-12% de B.

A malvidina foi quantificada na fase rica em álcool (fase de topo) por análise de CLAE, com a sua concentração na outra fase (fase de fundo) estimada pela diferença entre a concentração da amostra real dos resíduos do jamelão, e a sua concentração na fase de topo.

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi determinada em cada fase dos sistemas por espectrofotometria segundo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com modificações utilizando-se ácido gálico como padrão.²⁹ Uma alíquota de 0,5 mL de cada fase foi transferido para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 4 mL de água deionizada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos foram adicionados 0,5 mL de solução saturada de Na₂CO₃ (1 g de carbonato de sódio em 3,5 mL de água destilada e agitação em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi em 660 nm no espectrofotômetro (Varian Cary-50 Bio UV-visível). Os resultados são expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE g)/100 g.

A quantificação da malvidina e dos fenóis totais foram realizadas em triplicata, e a média dos dois ensaios e os respectivos desvios padrão foram relatados.

3. Resultados e Discussão

3.2. Extração convencional por agitação

Os cromatogramas do padrão e da extração e a varredura do espectro da malvidina a partir de resíduos do jamelão (casca) são apresentados na Figura 1.

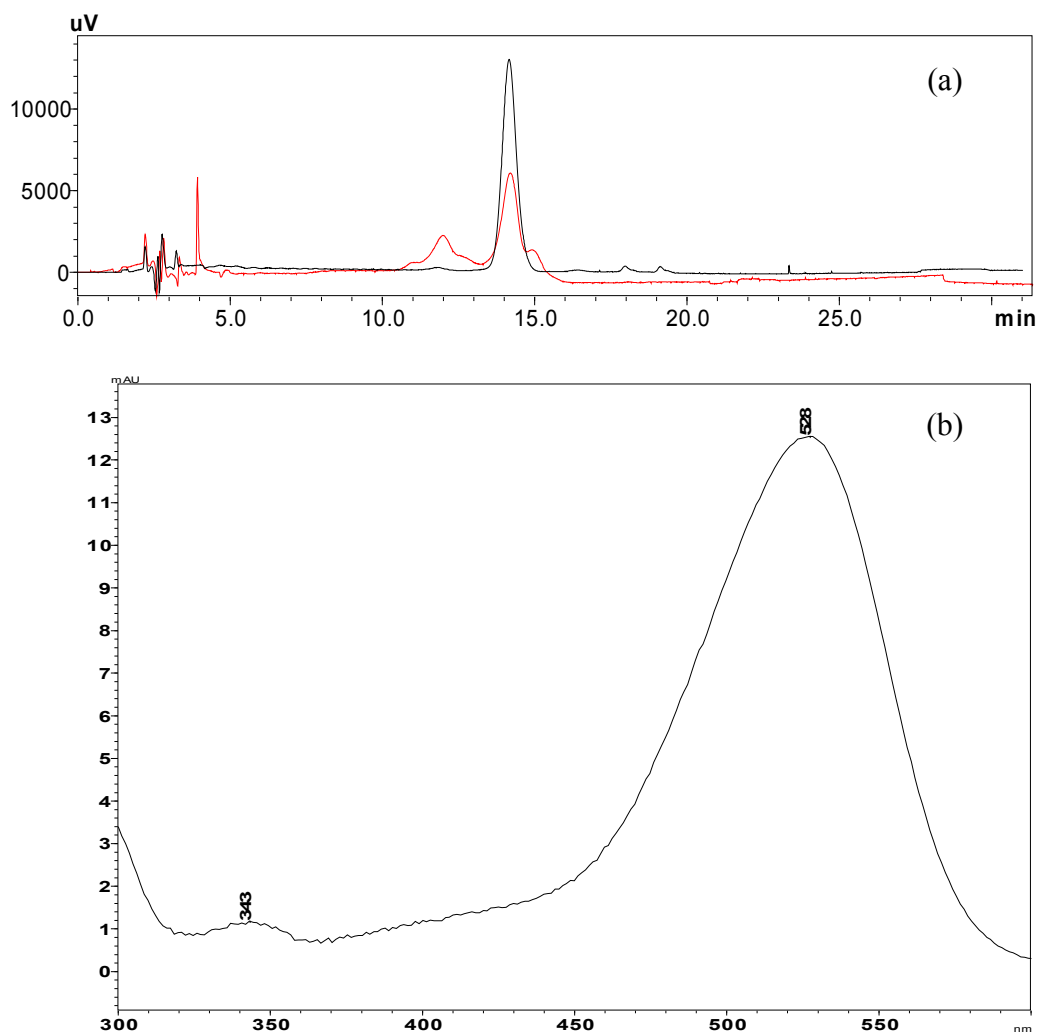


Figura 1. (a) Cromatogramas do padrão (linha preta) e amostra (linha vermelha); (b) Varredura do Espectro do Padrão da Mavidina.

Foi observado que a substância padrão e as amostras obtiveram um tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos e máxima absorvância em 528 nm.

A malvidina e os fenóis totais foram extraídos a partir dos resíduos (casca) do jamelão utilizando quatro tipos de alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol). A concentração de malvidina e fenóis totais foi expressa como mg/100g, como mostrado na Figura 2.

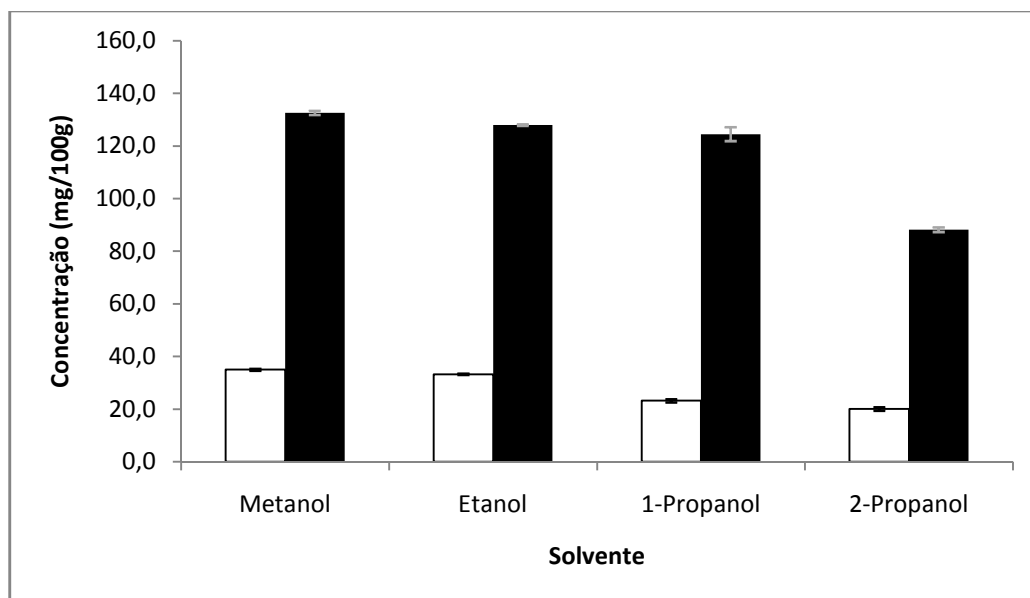


Figura 2. Efeito do tipo dos alcoóis na concentração de malvidina e fenóis totais a partir de resíduos de jamelão na extração convencional a frio com agitação. Biomoléculas: □ – malvidina (mg/100g); ■ – fenóis totais (mg EAG/100g).

De acordo com Naczki e Shahidi,³⁰ a solubilidade dos compostos fenólicos é afetada pela polaridade do solvente utilizado. O aumento da extração de malvidina e fenóis totais do jamelão seguiu a ordem de aumento de polaridade do solvente (alcoóis), parâmetro relatado por Reichardt³¹ e expressa em kcal/mol:

metanol (55,4) > etanol (51,9) > 1-propanol (50,7) > 2-propanol (48,4)

O teor de malvidina e fenóis totais no jamelão (casca) foi de $35,04 \pm 0,34$ mg/100g e $132,58 \pm 0,80$ mg EAG/100g de amostras frescas, respectivamente. Estes resultados estão de

acordo com Faria *et al.*,³² que determinou a concentração de malvidina e fenóis totais em jamelão de $32,0 \pm 1,5$ mg/100g e $148,3 \pm 32,4$ mg EAG/100g da fruta fresca, respectivamente.

De acordo com Metivier *et al.*,³³ extrações de antocianinas a partir de bagaço de uva com metanol foi 20% mais eficiente do que com etanol. Kapasakalidis *et al.*,³⁴ relataram que métodos que utilizam metanol e etanol como solventes extratores de compostos fenólicos, a extração com metanol é a mais eficiente.

3.3. Extração de malvidina e fenóis totais dos resíduos do jamelão utilizando sistema de duas fases aquosas formados por alcoóis e sais fosfato de potássio

A capacidade destes SAB's formados por álcool-sal para extração de antocianinas e compostos fenólicos totais a partir dos resíduos do jamelão foi avaliado neste trabalho. Assim, as cascas da fruta do jamelão foram usadas aqui como fonte de resíduos para a extração da malvidina e fenóis totais.

O processo de partição foi realizado por meio da escolha do tipo do álcool e do sal, utilizando como ponto de mistura a composição de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sal de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e solução tampão - K_2HPO_4/KH_2PO_4) de 50% e 15% (p/p), respectivamente e na temperatura de $25 \pm 1^\circ C$. Este ponto de mistura foi escolhido de modo a se ter sistemas bifásicos para todos os componentes escolhidos, ou seja, o ponto de mistura está dentro da região bifásica do diagrama de fase. A influência dos constituintes e pH dos sistemas sobre os coeficientes de partição da malvidina e fenóis totais, as porcentagens de recuperação e fator de purificação da malvidina na fase de topo e fundo e respectivos desvios-padrão são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficientes de partição da malvidina (K_{MAL}) e fenóis totais (K_{FT}), recuperação (R_{MAL}) e fator de purificação (FP_{MAL}) da malvidina na fase de topo (T) e fundo (B) obtidos a partir da casca do jamelão utilizando SAB's.

Sistema Ternário		K_{MAL}	K_{FT}	R_{MAL-T} (%)	R_{MAL-B} (%)	FP_{MAL-T}	FP_{MAL-B}
Álcool	Sal Inorgânico						
metanol	K_3PO_4	0,018±0,002	1,92±0,07	2,11±0,08	97,47±0,73	0,025±0,003	2,73±0,12
	K_2HPO_4	20,38±0,49	4,85±0,05	97,60±0,19	2,40±0,19	1,095±0,010	0,26±0,01
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	62,08±4,03	7,18±0,89	98,85±0,11	1,15±0,11	1,114±0,022	0,13±0,00
etanol	K_3PO_4	0,012±0,002	1,06±0,03	1,99±0,20	98,17±0,32	0,025±0,005	2,09±0,06
	K_2HPO_4	17,18±0,60	8,90±0,11	96,14±0,33	3,86±0,33	1,047±0,004	0,54±0,02
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	33,09±2,17	10,35±0,49	98,39±0,23	1,61±0,23	1,037±0,005	0,33±0,03
1-propanol	K_3PO_4	0,003±0,001	0,18±0,00	1,34±0,22	98,66±0,22	0,024±0,004	1,40±0,02
	K_2HPO_4	14,61±0,31	5,29±0,74	98,37±0,10	1,63±0,10	1,049±0,011	0,38±0,05
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	27,76±2,04	6,05±0,36	98,85±0,42	1,15±0,42	1,093±0,016	0,25±0,03
2-propanol	K_3PO_4	0,012±0,001	0,23±0,01	3,93±0,49	97,47±0,73	0,080±0,004	1,49±0,04
	K_2HPO_4	15,33±1,13	8,46±0,22	98,66±0,10	2,40±0,19	1,017±0,002	0,56±0,04
	KH_2PO_4/K_2HPO_4	28,51±0,80	9,73±0,22	99,22±0,02	2,40±0,19	1,027±0,003	0,35±0,00

Três fenômenos distintos são capazes de interferir nos resultados de partição da malvidina e fenóis totais nomeadamente a solubilidade da malvidina e fenóis totais, o efeito salting-out e o pH dos sais de fosfato de potássio.

Observa-se que o coeficiente de partição da malvidina e fenóis totais aumenta com a diminuição do efeito salting-out dos sais fosfato de potássio, ou seja, a redução do coeficiente de partição da malvidina e dos fenóis totais é inversamente proporcional ao da série de Hofmeister^{23,35} que segue a ordem decrescente: $K_3PO_4 > K_2HPO_4 > K_2HPO_4/KH_2PO_4$. O sal K_3PO_4 exibe um maior efeito salting-out, isto é, tem uma capacidade mais elevada para a

criação de complexos de hidratação, o que exclui a maior quantidade de água da fase rica em sal para a fase rica em álcool,³⁶ reduzindo a concentração de álcool na fase de topo. Já o sal KH_2PO_4 apresenta efeito salting-in. Assim, os sais de fosfato de potássio conduzem a comportamentos muito diferentes no particionamento das biomoléculas, o que sugere que a escolha destes sais é um parâmetro dominante na extração de biomoléculas.³⁷

Por outro lado, o efeito dos sais no comportamento da partição das biomoléculas também está associado com a solubilidade da malvidina e dos fenóis totais. Alguns autores relataram que as antocianinas e os compostos fenólicos são mais solúveis em solventes orgânicos como metanol e etanol do que em água.^{33,34,38,39}

Foi relatado que as antocianinas podem ser encontrados em formas químicas diferentes, dependendo do pH da solução.⁸ Cada sistema formado com álcoois e sais de fosfato de potássio apresentam valores de pH diferenciado, K_3PO_4 (12,5); K_2HPO_4 (9,0); $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (7,0), como mostra a Tabela 2.

Observa-se que a medida que aumentou o pH dos sistemas de 7,0 para 12,5, a malvidina e os fenóis totais tende a particionar para a fase de fundo (rica em sal). Isso ocorre devido à desprotonação das antocianinas^{40,41}, provocando uma alteração na carga elétrica e estrutura química da superfície da biomolécula, devido a ionização do grupo hidroxila que influencia as características de solubilidade e hidrofobicidade/hidrofilicidade da molécula alvo.²⁷ Portanto, a concentração hidrogeniônica afeta a transferência destas biomoléculas que contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes valores de pKa, resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da molécula alvo pode alterar sua conformação modificando sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição.⁴²

Tabela 2. Valores de pH nas fases de topo (T) e fundo (B) para os sistemas de extração da malvidina e dos fenóis totais a partir do jamelão composto de álcool + sal inorgânico + água, à 25 °C e pressão atmosférica.

Sistema Ternário		pH (T)	pH (B)
K₃PO₄	metanol	12,59±0,00	13,43±0,18
	etanol	13,02±0,74	13,36±0,35
	1-propanol	11,65±0,62	13,23±0,25
	2-propanol	12,60±0,28	13,16±0,06
K₂HPO₄	metanol	8,59±0,08	9,45±0,08
	etanol	9,61±0,01	9,93±0,02
	1-propanol	8,68±0,66	9,47±0,87
	2-propanol	9,01±0,01	9,69±0,93
K₂HPO₄/KH₂PO₄	metanol	6,97±0,17	6,88±0,20
	etanol	7,12±0,04	7,15±0,02
	1-propanol	7,03±0,03	6,69±0,15
	2-propanol	7,26±0,45	6,61±0,04

De acordo com os coeficientes de partição relatados, uma das vantagens dos SAB's, é a sua seletividade. Assim, foi estudado o fator de purificação (FP) da malvidina na fases de topo e fundo. A purificação se apresenta quando os coeficientes de partição (K) da malvidina e dos fenóis totais são distintos no sistema de duas fases aquosas. De acordo com a Tabela 1, os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) que demonstraram fator de purificação mais expressivo foram os formados por metanol + K₃PO₄ (FP_{MAL-B}=2,73±0,12) e etanol + K₃PO₄ (FP_{MAL-B}=2,09±0,06) para a malvidina. Esses resultados demonstram que a malvidina particiona-se totalmente para a fase de fundo e os fenóis totais para a fase de topo, tornando o sistema altamente seletivo para a recuperação dessas biomoléculas.

A recuperação da malvidina nas fases de topo e fundo seguiu a mesma tendência do K_{MAL}, com os melhores resultados ocorrendo para o sistema utilizando solução tampão:

K_2HPO_4/KH_2PO_4 ($R_{MAL-T} > 98,0\%$), como mostra a Tabela 1. Estes resultados estão de acordo com Wu *et al.*,⁴³ que encontraram recuperações de antocianinas da amora na fase de topo de 85,1% utilizando SAB formado por 30% (p/p) de etanol, 20% (p/p) de sulfato de amônio, 10% (p/p) suco de amora e 40% (p/p) de água.

4. Conclusão

Os SAB's formados álcoois (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4) são extremamente versáteis e pode facilitar a manipulação dos constituintes para a partição da malvidina para a fase de topo ou fundo. O sal de fosfato de potássio altera o pH do sistema e influencia o efeito salting-out, os quais governam o particionamento da malvidina e dos fenóis totais no processo de extração em SAB's proposto neste trabalho. A partir da aplicação dos SAB's para amostra de resíduos do jamelão, concluiu-se que é possível a concepção de processos de separação mais barato e simples, capazes de promover a extração de biomoléculas com alto valor agregado.

Agradecimentos

Os autores são gratos pelo apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC/SE, pela a bolsa de I.A.O. Reis, e a CAPES pela a bolsa de S.B. Santos.

Referências

1. Veigas, J. M.; Narayan, M. S.; Laxman, P. M.; Neelwarne, B.; *Food Chem.* **2007**, 105, 619.
2. Brito, E. S.; Araújo, M. C. P.; Alves, R. E.; Carkeet, C.; Clevidence, B. A.; Novotny, J. A.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9389.

3. Morton, J. Jambolan. In: Morton, J. Fruits of warm climates. Miami: *Creative Resoursh Systems* **1987**, 375. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/jambolan_ars.html>. Acesso em: 10 nov. 2012.
4. Lago, E. S.; Gomes, E.; Silva, R.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26, 847.
5. Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E.; Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. Smith, P. Sporns (Eds), *Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components* (pp. 19-31). New Jersey: *John Wiley e Sons Inc.*, 2001.
6. Sari, P.; Wijaya, C. H.; Sajuthi, D.; Supratman, U.; *J. Food Techn. Ind.* **2009**, 20, 102.
7. Banerjee, A.; Dasgupta, N.; De, B.; *Food Chem.* **2005**, 90, 727-733.
8. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán-Vidal, C. A.; *Food Chem.* **2009**, 113, 859.
9. Shipp, J.; Abdel-Aal, E. M. ; *The Open Food Sci. J.* **2010**, 4, 7.
10. Benherlal, P. S., Arumughan, C.; *J. Sci. Food Agric.* **2007**, 87, 2560.
11. Li, L.; Adams, L. S.; Chen, S.; Killian, C.; Ahmed, A.; Seeram, N. P.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 826.
12. Hassimotto, N. M. A.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2928.
13. Byamukama, R.; Kiremire, B. T.; Andersen, O. M.; Steigen, A.; *J. Food Compos. Anal.* **2005**, 18, 599.
14. Phippen, W. B.; Simon, J. E.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1734.
15. Ju, Z. Y.; Howard, L. R.; *J. Food Sci.* **2005**, 70, 270.

16. Luque-Rodríguez, J. M.; Luque de Castro, M. D.; Pérez-Juan, P.; *Bioresource Technol.* **2007**, 98, 2705.
17. Corrales, M.; García, A. F.; Butz, P.; *J. Food Eng.* **2009**, 90, 415.
18. Patil, G.; Madhusudhan, M. C.; Ravindra Babu, B.; Raghavarao, K. S. M. S.; *Chem. Eng. Process.* **2009**, 48, 364.
19. Ooi, C.W.; Tey, B.T.; Hii, S.L.; Kamal, S.M.M.; Lan, J.C.W.; Ariff, A.; Ling, T.C.; *Process Biochem.* **2009**, 44, 1083.
20. Saravanan, S.; Rao, J.R.; Nair, B.U.; Ramasami, T.; *Process Biochem.* **2008**, 43, 905.
21. Zhao X.; Xie X.; Yan Y.; *Thermochim. Acta* **2011**, 516, 46.
22. Garza-Madrid, M.; Rito-Palomares, M.; Serna-Saldívar, S. O.; Benavides, J.; *Process Biochem.* **2010**, 45, 1082.
23. Reis, I.A.O.; Santos, S.B.; Santos, L.A.; Oliveira, N.; Freire, M.G.; Pereira, J.F.B.; *Food Chem.* **2012**, 135, 2453.
24. Louros, C. L. S.; Cláudio, A. F. M.; Neves, C. M. S. S.; Marrucho, M. G. F.; Isabel M.; Pauly, J.; Coutinho, J. A. P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, 11, 1777.
25. Cardoso, G. B.; Mourão, T. M. M.; Pereira, F. M.; Freire, M. G.; Fricks, A. T.; Soares, C. M. F.; A. S. Lima; *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *In Press*.
26. Pereira, J.F.B.; Lima, A.S.; Freire, M.G.; Coutinho, J.A.P.; *Green Chem.* **2010**, 12, 1661.
27. Wang, Y.; Han J.; Xu X.; Hu S.; Yan, Y.; *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 75, 352.
28. Wu, H.; Chen, M.; Fan, Y.; Elsebaei, F.; Zhu, Y.; *Talanta* **2012**, 88, 222.
29. Swain, T.; Hillis, W. T.; *J. Sci. Food Agric.* **1959**, 10, 135.
30. Naczki, M.; Shahidi, F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 41, 1523.
31. Reichardt, C.; *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 94, 2319.
32. Faria, A. F.; Marques, M. C.; Mercadante, A. Z.; *Food Chem.* **2011**, 126, 1571.
33. Metivier, R. P.; Francis, F. J.; Clydesdale, F. M.; *J. Food Sci.* **1980**, 45, 1099.

34. Kapasakalidis, P. G.; Rastall, R. A.; Gordon, M. H.; *Journal of Agricultural and Food Chem.* **2006**, 54, 4016.
35. Hofmeister, F.; *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1888**, 24, 247.
36. He, C.; Li, S.; Liu, H.; Li, K.; Liu, F.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1082, 143.
37. Cláudio, A. F. M.; Ferreira, A. M.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D., Freire, M. G.; Coutinho, J. A. P.; *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 142.
38. Lee, H.S.; Hong, V.; *Chromatogr.* **1992**, 624, 221.
39. Oanceaa, S.; Stoiab, M.; Comanc, D.; *Procedia Eng.* **2012**, 42, 489.
40. Mazza, G. B.; Brouillard, R.; *Food Chem.* **1987**, 25.
41. Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; *Food Chem.* **1998**, 63, 491.
42. Silva, L. H. M.; Loh, W.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 1345.
43. Wu, X.; Liang, L.; Zou, Y.; Zhao, T.; Zhao, J.; Li, F.; Yang, L.; *Food Chem.* **2011**, 129, 443.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho são apresentadas a seguir, separadas por assunto desenvolvido:

ARTIGO I – Os sistemas aquosos bifásicos formados por quatro alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e três sais de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e KH_2PO_4/K_2HPO_4) foram estudados, estes sistemas foram avaliados para a sua aplicação como processos de separação líquido-líquido para dois antioxidantes: vanilina e ácido L-ascórbico, e foi observado que:

a. Os sistemas aquosos bifásicos (SAB's) formados por álcool-sal foram aplicados com sucesso para a partição seletiva de dois antioxidantes: vanilina e ácido L-ascórbico. Novos diagramas de fase para executar as partições foram determinados a 25 °C e pressão atmosférica. Os principais resultados mostram que os alcoóis com cadeias alifáticas mais longas (maior hidrofobicidade) aumentam a separação de fases.

b. A capacidade destes SAB's para ser usados na separação das duas biomoléculas estudada foi provado, sendo preferencialmente a vanilina concentrada na fase rica em álcool, enquanto que o ácido L-ascórbico migra para a fase rica em sal. Este comportamento está em concordância com o balanço hidrofílico/lipofílico de cada antioxidante e as pontes de hidrogênio que podem ser estabelecer agindo como uma força importante no processo de particionamento.

c. A recuperação da vanilina para a fase de topo ficou entre 98,37% a 99,94%, enquanto que para ácido L-ascórbico, na fase fundo, ficou entre 85,15% e 95,50%.

d. Este trabalho mostra que os SAB's formados por alcoóis e sais de potássio é uma abordagem promissora para executar separações seletivas, e a utilização destes sistemas para a recuperação de produtos valiosos a partir de fontes de resíduos alimentares.

ARTIGO II - A técnica do sistema aquoso bifásico, constituído por alcoóis e sais fosfato de potássio foi aplicada para otimização da extração da rutina, variando o tipo e concentração de álcool (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sal de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e tampão K_2HPO_4/KH_2PO_4), temperatura (5 a 35 °C) e efeito da adição de eletrólito (NaCl), e pode-se concluir que:

a. Os sistemas de duas fases aquosas baseados em sal é uma alternativa versátil para a partição da rutina devido a possibilidade de extrair a biomolécula para a fase de topo ou fundo ou apenas por manipulação dos componentes e condições do sistema. O maior coeficiente de partição e eficiência de extração foram obtidos em sistemas que consistem de 1-propanol (40% em peso) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 - tampão (20% em peso) + água (40% em peso). A extração da rutina de resíduos acerola (sistema real) apresentam a mesma tendência de extração na extração modelo (com rutina pura), validando o processo de extração proposto para este flavonóide.

ARTIGO III - Sistemas aquosos bifásicos (SAB's) formados com sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4) e PEG (1500, 4000 e 8000) ou alcoóis (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) são extremamente versáteis e pode facilitar a manipulação dos constituintes para a partição do ácido gálico para a fase de topo ou fundo. O sal de fosfato de potássio altera o pH do sistema e, conseqüentemente, as hidroxilas do ácido gálico ionizadas. Esta desprotonação é a força motriz do processo de extração do ácido gálico em SAB's proposto neste trabalho. Os valores semelhantes dos parâmetros, como o coeficiente de partição e recuperação do ácido gálico em diferentes sistemas ternários para a extração modelo (molécula pura) e real (casca da goiaba) validam os resultados e a aplicação dos SAB's estudados para a extração do ácido gálico na goiaba.

ARTIGO IV - Três técnicas de extração de rutina a partir de resíduos da acerola foram investigadas e comparadas. Os métodos de extração afetam fortemente o rendimento da rutina. A extração simultânea (ultra-som + agitação) mostra um elevado rendimento de extração de rutina de resíduos de acerola.

A aplicação de sistema de duas fases aquosas (ATPS) constituído por alcóois e sais de fosfato de potássio permite a partição da rutina para a fase de topo ou para a fase de fundo, dependendo do par álcool/sal escolhido, tornando o sistema altamente versátil. A partir da aplicação dos ATPS para amostra real de resíduos da acerola, concluiu-se que é possível a

concepção de processos de separação mais barato e simples, capazes de promover a extração da biomolécula rutina.

ARTIGO V - Os SAB's formados alcóois (metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol) e sais de fosfato de potássio (K_3PO_4 , K_2HPO_4 e K_2HPO_4/KH_2PO_4) são extremamente versáteis e pode facilitar a manipulação dos constituintes para a partição da malvidina para a fase de topo ou fundo. O sal de fosfato de potássio altera o pH do sistema e influencia o efeito salting-out, os quais governam o particionamento da malvidina e dos fenóis totais no processo de extração em SAB proposto neste trabalho. A partir da aplicação dos SAB's para amostras de resíduos do jamelão, concluiu-se que é possível a concepção de processos de separação mais barato e simples, capazes de promover a extração de biomoléculas com alto valor agregado.

6. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

➤ Publicação capítulo de livro – “Aplicação de Sistema Aquoso Bifásico na Extração de biomoléculas”, foi realizada uma revisão de literatura sobre o uso dos sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis/sais de potássio para extração de biomoléculas em frutas exóticas. Este capítulo de livro foi publicado pela Editora UFS, em parceria a um projeto de extensão denominado “Alimentando o Conhecimento”.

Referência:

Lima, A. S.; Soares, C. M. F.; REIS, I. A. O. ; SANTOS, S. B. Aplicação de sistemas aquosos bifásicos na extração de biomoléculas. In: Antônio Martins de Oliveira Júnior; Ana Carolina Sampaio Doria Chaves; Tatiana Pacheco Nunes. (Org.). Alimentando o Conhecimento. Alimentando o Conhecimento. 1ªed.São Cristóvão - SE: Editora UFS, 2012, v. 1, p. 83-104.

- Apresentação de trabalho no ICEF11(Athens, Greece):
“Extraction os ascorbic acid using alcohol/phosphate potassium salt-based aqueous two-phase system”.
- Apresentação de trabalho no XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2012:

Trabalhos Completos:

“Partição da vanilina em sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis e sais de potássio”.

“Extração seletiva de rutina utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por alcoóis e sais de fosfato de potássio”.

7. TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a ação antioxidante destas biomoléculas extraídas.
- Purificar os antioxidantes extraídos dos resíduos destas frutas.
- Estudo de cálculos de equipamentos: tanques agitados e colunas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTO, M..R.; FARIAS, M.E.; MANCA DE NADRA, M.C. Effect of Gallic Acid and Catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w Growth and Metabolism of Organic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49(9), p. 4359-4363, 2001.
- 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.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. Wiley Interscience, New York, USA, 1986.
- AMANTE, E.R.; CASTILHO JUNIOR, A.B.; KANZAWA, A.; ENSSLIN, L.; MURAKI, M. Um panorama da tecnologia limpa na indústria de alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos*, v. 33, n. 1, p. 16-21, 1999.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, v. 350, n.1, p. 103-108, 1996.
- ARAÚJO, J. *Química de alimentos: teoria e prática*. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV, 1999. 416p.
- ASTN (Associação das Indústrias Processadoras de Frutos Tropicais); APEX (Programa Setorial Integrado de Promoção de Exportações de Sucos Tropicais). Brasília, 2001. Disponível em: <<http://webm5.uol.com.br/cgi-bin/webmail.exe/messages>>. Acesso em: 08 mar. 2012.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N.K; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 83-89, 2008.
- BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.*, v. 90, p. 727-733, 2005.
- BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A.A. O efeito do ultra-som em reações químicas. *Química Nova*. v.15, n. 4, p. 302-316, 1992.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. *Introdução à química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Varela, 1995. 223p.

- BOCCO, A.; CUVELIER, M-E; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.6, p.2123-2129, 1998.
- BREITBACH, M.; BATHEN, D.; SCHMIDT-TRAUB, H. Effect of ultrasound on adsorption and desorption processes. *Ind.Eng.Chem.Res*, v.42, p. 5635-5646, 2003.
- BRITO, E. S.; ARAÚJO, M. C. P.; ALVES, R. E.; CARKEET C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY J. A. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.
- CAETANO, A.C.S.; MELO, E.A.; LIMA, V.L.A.G.; MACIEL, M.I.S.; ARAÚJO, C.R. Extração de antioxidantes de resíduos agroindustriais de acerola. *Brazilian Journal of Food and Technology*, v. 12, n. 2, p. 155-160, 2009.
- CARAGAY, A.B. Cancer preventive foods and ingredients. *Food Technology*, v. 46, p. 65-68, 1992.
- CARVALHO, C. P. Estudo do equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. *Dissertação de tese de mestrado*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. UFV, 2004. 70 f.: il.
- CEREZAL-MEZQUITA, P.; GARCÍA-VIGO, Y. La acerola – fruta marginada de America con alto contenido de acido ascorbico. *Alimentaria*, v. 37, n. 309, p. 113-125, 2000.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1148-55, 2010.
- CHEMAT, F.; HUMA, Z.-E.; KHAN. M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 813–835, 2011.
- CHEN, Y.; MENG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; LIU, X.; YANG, J. Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Biphasic Systems Composed of 1-Butyl-3-methyl Imidazolium Tetrafluoroborate + Sucrose/Maltose + Water. *J. Chem. Eng. Data*. v. 55, p. 3612-3616, 2010.
- CLÁUDIO, A. F. M.; FREIRE, M. G.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.D. E COUTINHO, J.A.P. Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 75, 39-47. 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.

- CONDRAT, D.; MOSOARCA, C.; ZAMFIR, A.D.; CRISAN, F.; SZABO, M.R.; LUPEA, A.X., Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Central European Journal of Chemistry*, v. 8(3), p. 530-535, 2010.
- CÔRREA, M.C.M.; FERNANDES, G.C.; PRADO, R.M.; NATALE, W. Propriedades químicas do solo tratado com resíduo orgânico da indústria processadora da goiaba. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 241-243, 2005.
- DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H.S.; HOMAYOUN, N. Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53(3), p. 776-778, 2008.
- DANTAS, J.L.L.; DANTAS, A.N.V.L.; COELHO, Y.S. **Fruticultura brasileira**: realidade e perspectivas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 506 p., 2009.
- DIMITRIESKA-STOJKOVIC, E.; ZDRAVKOVSKI, Z. Supercritical fluid extraction of quercetin and rutin from *Hyperici Herba*. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 26, p. 2517-2533, 2003.
- DU, F.Y.; XIAO, X.H.; LUO, X.J.; LI, G.K., Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. *Talanta*, v. 78(3), p. 1177-1184, 2009.
- DUTHIE, S.J., MA, A., ROSS, M.A., COLLINS, A.R. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, v.56, n.6, p.1291-1295, 1996.
- ESPOSITO, L.J.; FORMANEK, K.; KIENZT, G.; MAUGER, F.; MAUREAUX, V.; ROBERT, G.; TRUCHET, F. *Vanillin*, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4 ed., New York: John Wiley & Sons, 1997.
- FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. D. S.; TAMBOURGI, E. G. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos, *Exacta*, 1, p. 49-56, 2009.
- FERREIRA, L.A.; TEIXEIRA, J.A.; MIKHEEVA, L.M.; CHAIT, A. e ZASLAVSKY, B.Y. Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG_sodium sulfate two-phase system. *Journal of Chromatography A*. v. 1218, p. 5031-5039, 2011.
- FIORUCCI, A. R. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. *Química Nova na Escola*, v.17, 2003.

- FOTSIS, T. et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research*, v. 57, n. 14, p. 2916-2921, 1997.
- FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 45, n. 5, p. 208-213, 2000.
- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.
- FREIRE, M.G.; NEVES, C.M.S.S.; MARRUCHO, I.M.; LOPES, J.N.C.; REBELO, L.P.N.; COUTINHO, J.A.P. High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chemistry*, 12, 1715-1718, 2010.
- FREIRE, M. G.; LOUROS, C. L. S.; REBELO, L.P. N.; COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. *Green Chem.*, v.13, p.1536–1545, 2011.
- FREITAS, C. A. S.; MAIA, G. A.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R. W.; SOUSA, P. H. M. Acerola: Produção, composição, aspectos nutricionais e produtos. *R. Bras. Agrociência*, v. 12, n. 4, p. 395-400, 2006.
- FURTADO, A. A. L.; CABRAL, L. M. C., ROSA, M. F., MODESTA, R. C. D., PONTES, S. M. Avaliação microbiológica e sensorial da polpa de goiaba tratada termicamente. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.22, n.especial, p.91-95, 2000.
- GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; McPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, Oxford, v. 68, n. 4, p. 471-474, 2000.
- GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1082-87, 2010.
- GHIASI, M.; TAHERI, S.; TAFAZZOLI, M. Dynamic stereochemistry of rutin (vitamin P) in solution: theoretical approaches and experimental validation. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 1760–1766, 2010.
- GIL-LONGO, J.; GONZALEZ-VAZQUEZ, C., Vascular pro-oxidant effects secondary to the autoxidation of gallic acid in rat aorta. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 21(4), p. 304-309, 2010.
- GONGATTI NETTO, A.; GARCIA, A.E.; ARDITO, E.F.G.; GARCIA, E.C.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; CHITARRA, M.I.F.; BORDIN, M.R. Goiaba para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1996. 35p.: il. (Publicações Técnicas FRUPEX; 20).

- GONZAGA NETO, L.; MATHUZ, B.; SANTOS, C.A.F. Caracterização agrônômica de clones de aceroleira (*Malpighia* spp) na região do submédio São Francisco. Revista Brasileira de Fruticultura, v.21, n.2, p.110-115, 1999.
- GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; HARUENKIT, R.; CHUTHAKORN, R.; GRAUER, F.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG S. Comparative content of total polyphenols and dietary fiber in tropical fruits and persimmon. J. Nutr. Biochem., v. 10, p. 367–371, 1999.
- GRABER, T. A., TABOADA, M. E., CARTÓN, A., BOLADO S. Liquid-liquid equilibrium of the Poly(ethylene glycol) + Nitrate + Water system at 298.15 K. J. Chem Eng Data, v. 45, p. 182-184, 2000.
- GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. B.CEPPA, v. 22, n. 2, p. 405-422, 2004.
- GREISLER, H. P. Biomolecules. Chapter - 4. WTEC Panel Report on tissue Engineerin Research. Copyright. Elseiver Science (USA), 2003.
- GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. Phytochemistry, v. 57, n.1, p. 915-927, 2001.
- GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003.
- GUO, Y.X.; HAN, J.; ZHANG, D.Y.; WANG, L.H.; ZHOU, L.L. An ammonium sulfate/ethanol aqueous two-phase system combined with ultrasonication for the separation and purification of lithospermic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Ultrasonics Sonochemistry, v. 19, n. 4, p. 719-724, 2012.
- GUTOWSKI, K. E.; BROKER, G. A.; WILLAUER, H. D.; HUDDLESTON, J. G.; SWATLOSKI, R. P.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations. Journal of American Chemical Society, v. 125, p. 6632-6633, 2003.
- HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant ou pro-oxidant in vivo?. Free Radical Research, Reading, v. 25, n. 5, p. 439-454, 1996.
- HANAMURA, T., HAGIWARA, T., KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. Bioscience Biotechnology Biochemistry. v. 69, p. 280–286, 2005.

- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.8, p.2928-2935, 2005.
- HEARON, W.M. U.S., Patent 4208350, 1980.
- HENNINGSSON, S.; HYDE, K.; SMITH, A.; CAMPBELL, M. The value of resource efficiency in food industry: a waste minimization project in East Anglia, UK. *Journal of Cleaner Production*, v. 12, n.5, p. 505-512, 2004
- HERNÁNDEZ, A.M.; PRIETO GONZÁLES, E.A. Plantas que contienen polifenoles. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedica*, v. 18, n.1, p. 12-14,1999.
- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*. v. 98, p. 136-148. 2006.
- HOCKING, M.B. Vanillin: Synthetic flavoring from spent sulfite liquor. *Journal of Chemical Education*, v. 74(9), p. 1055-1059, 1997.
- HOLMMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 1081-1093, 2000.
- IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.21, p. 589– 598, 2008.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA Produção Agrícola. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em 08 de novembro de 2012.
- IBRAF. Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/site>. Acesso em 04 nov. 2012.
- IHA, M.S.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.18, n. 3, p. 387-393, 2008.
- JACKMAN, R.L.; YADA, R.I.; TUNG, M.A. “A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative analysis”. *J.Food Biochem*. v. 11, p. 279-308, 1987.

- JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 5489-5493, 2001.
- JOHANSSON, H.-O.; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA-JR., A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems, *Journal of chromatography A*, v. 1178, p. 145-153, 2008.
- KAYGORODOV, K.L.; CHELBINA, Y.V.; TARABANKO, V.E.; TARABANKO N.V. Extraction of Vanillin by Aliphatic Alcohols. *J. Sib. F. U*, v. 3, p. 228-233, 2010.
- KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolics phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.
- KNORR, D. Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, 56, 131–134, 2003.
- KRINSKY, N. I. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 53, n. 1, p. 238s-246s, 1991.
- LAGO, E.S.; GOMES, E.; SILVA, R. Produção de geléia de jabolão (*Syzugium cumini Lamarck*): processamento, parâmetro físico-químicos e avaliação sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, n. 4, p. 847-852, 2006.
- LEME JR, J.; FONSECA, H.; NOGUEIRA, J.N. Variação do teor de ácido ascórbico e beta-caroteno em cereja das Antilhas (*Malpighia p.L*) liofilizada. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Guatemala, v.23, n.2, p.207-215, 1973.
- LI, S.; WAN, J.; CAO, X. Preliminary application of light-pH sensitive recycling aqueous two-phase systems to purification of lipase. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 598-601, 2010.
- LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A.. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two phase systems, *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 63 – 68, 2002.
- LIMA, V.L.A.G., ME' LO, E.A., MACIEL, M.I.S., LIMA, D.E.S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de 12 frutos de diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.). *Ciencia y Tecnología Alimentaria* v. 23, p. 101–103, 2003.
- LIMA, V.L.A.G., MÉLO, E.A., MACIEL, M.I.S., PRAZERES, F.G., MUSSER, R.S., LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*. v. 90, p. 565–568, 2005.

- LOMASCOLO, A.; STENLELAIRE, C.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 282-289, 1999.
- LOUROS, C. L. S.; CLÁUDIO, 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.
- LU, J.J.; WEI, Y.; YUAN, Q.P. Preparative separation of gallic acid from Chinese traditional medicine by high-speed counter-current chromatography and followed by preparative liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, v. 55, n. 1, p. 40-43, 2007.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 45 (8), p. 1432-1436, 2010.
- MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: Na eficiente, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7623-29, 2009.
- MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S.; CARVALHO, J. M.; FIGUEIREDO, R. W. *Processamento de frutas tropicais* (1st ed.). Fortaleza: Edições UFC (Capítulo 1), 2009.
- MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. *Separation Purification Technology*, v. 65, n. 1, p. 40-45, 2009.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. *Food Chemistry*, v. 58, p. 245- 248. 1997.
- MARTINS, L.; COUTINHO, E.L.; PANZANI, C.R.; CHAVIER, N.J.D. *Fruteiras nativas do Brasil e exóticas*. Campinas: CATI: Graça D´Auria, 2002. 75 p.
- MENZEL, C.M. Guava: an exotic fruit with potencial in Queensland. *Queensland Agricultural Journal*, v. 3, n. 2, p. 93-98, 1985.

- MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 282–290, 2008.
- MEZADRI, T., PEREZ-GALVEZ, A., HORNERO-MENDEZ, D. Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *European Food Research Technology*, v. 220, p. 63–69, 2005.
- MEZQUITA, P.C.; VIGOA, Y.G. La acerola. Fruta marginada de América con alto contenido en ácido ascórbico. *Alimentaria* v.1, p. 113–125, 2000.
- MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) *skeels*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 17, p. 94-101, 2007.
- MICHALKIEWICZ, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, v. 1187, p. 18–24, 2008.
- MIELNIK, M.B.; OLSEN, E.; VOGT, G.; ADELIN, D.; SKREDE, G. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, v. 39, n. 3, p.191-198, 2006.
- MOKHATARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M. H. e MANESH, S. D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly (ethylene glycol) and sodium sulphat. *Biochemical Engineering Journal*. v. 38, p. 241-247. 2008.
- MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; MOSCA, J. L.; PAIVA, J. R.; OLIVEIRA, J. J. G. Fruit physicochemical characteristics of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) clones selected in commercial orchards. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, v. 41, 1997.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, B.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. *Bioquímica de Harper*, vigésima quarta ed., El Manual Moderno, Santa Fé de Bogotá, 1997. 389-400 p.
- NASCENTE, A.S. A fruticultura no Brasil. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2003. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/frut_brasil.html>. Acesso 08 mar. 2012.
- NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V. de; BURITY, H. A.; SILVA JÚNIOR, J. F. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 4, p. 463-470, 2002.

- NOUBIGH, A.; MGAIDI, A.; ABDERRABBA, M. Temperature Effect on the Distribution of Some Phenolic Compounds: An Experimental Measurement of 1-Octanol/Water Partition Coefficients. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 55(1), p. 488-491, 2010.
- OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; CONCEIÇÃO, I.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato, *Ver. Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37(2), 2001.
- OOI, C.W., TEY, B.T., HII, S.L., KAMAL, S.M.M. LAN, J.C.W., ARIFF, A., LING, T.C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v.44, p. 1083–1087, 2009.
- PAIVA, J. R.; CORDEIRO, E. R.; ALVES, R. E. ALMEIDA, A. S.; PINTO, S. A. Seleção e clonagem de plantas de acerola. In: 14º Encontro de Genética do Nordeste. Anais. Recife: Sociedade Brasileira de Genética, p. 53, 1999.
- PAIVA, P.B. Planta medicinal pode elevar renda no cerrado. *Gazeta Mercantil*, São Paulo, 2, 3 e 4 out. 1998. p.B-23.
- PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japônica*. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.8, p. 299-301, 2001.
- PEREIRA, J.F.B.; LIMA, A.S.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chemistry*, v. 12, p. 1661–1669, 2010.
- PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri - SP, Manole, 2005.
- PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, n. 110, p.4487-4490, 1998.
- POOL-ZOBEL, B.L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid--rich foods. *Carcinogenesis*, v.18, n.9, p.1847-1850, 1997.
- PRASAD, K. N.; YANG, B.; ZHAO, M.; WEI, X.; JIANG, Y.; CHEN, F. High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Separation and Purification Technology*, v. 70, p. 41-45, 2009.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

- 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*, v. 89, n. 1, p. 73-80, 2011.
- RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. *Food Science and Technology International*, 8, 269-284. 2002.
- REIS, I.A.O.; SANTOS, S.B.; SANTOS, L.A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J.F.B.; VENTURA, S.P.M.; COUTINHO, J.A.P.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Increased Significance of Food Wastes: Selective Recovery of Added-Value Compounds. *Food Chemistry*, 135(4), 2453–2461, 2012.
- RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; PESSOA-JUNIOR, A. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems, *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 78-83, 2007.
- ROGERS, R. D., WILLAUER, H. D., GRIFFIN, S. T., HUDDLESTON, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. *J. Chromatogr. B*, v. 711, p. 255-263, 1998.
- ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2296-2305, 2010.
- SANTAMARIA, L.; BIANCHI, A. Cancer chemoprevention by supplemental carotenoids in animals and humans. *Preventive Medicine*, v. 18, n. 5, p. 603-623, 1989.
- SANTINI JR., R.; NEVAREZ, J. Extraction of ascorbic acid from acerolas (*Malpighia puniceifolia* L.). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, v. 39, p. 184-189, 1955.
- SANTOS, S.A.O.; PINTO, P.; SILVESTRE, A.J.D.; NETO, C.P., Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, v. 31(3), p. 521-526, 2010.
- SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature, v. 43, p. 905-911, 2008.

- SERGEDIENE, E.; JONSSON, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; RIETJENS, I. CENAS, N. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *Febs Letters*, v. 462(3), p. 392-396, 1999.
- SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, p. 7-19, 1999.
- SHÖTTLER, P.; HAMATSCHEK, J. Application of decanters for the production of tropical fruit juices. *Fruit Processing*, v.4, n.1, p.198-301, 1994.
- SHUI, G.; LEONG, L.P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, v.97, n.2, p. 277-284, 2006.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SILVA FILHO, J.C.S.; ARMELIN, M.A.J.A.; SILVA, A.G. Determinação da composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal pela técnica de ativação neutrônica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 2, p. 235-241, 1999.
- SILVA, M. F. V. Efeito dos diferentes tratamentos e embalagens nas características da polpa de acerola e na determinação dos teores de ácido ascórbico e das antocianinas durante o armazenamento. 1999. 224p. *Tese de Doutorado (Doutor em Tecnologia de Alimentos)* - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.
- SILVA, L.H.M.; MEIRELLES, A.J.A. Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*. 42: 279-282, 2000.
- SILVA, L. H. M. D.; LOH, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.
- SOARES, E.C.; OLIVEIRA, G.S.F.; MAIA, G.A.M. Desidratação da polpa de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) pelo processo “foam-mat”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.2, p.164-170, 2001.
- SOONG, Y.Y.; BARLOW, P.J.; Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, v. 88, n.3 p.411–417, 2004.

- SOUZA, R.L.; BARBOSA, J.M.P.; ZANIN, G.M.; LOBÃO, M.W.N.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 16, p. 288-300, 2010.
- STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chemical Toxicology*, v.32, n.1, p.79-90, 1994.
- SUN J. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 7449-7454, 2002.
- TARABANKO, V.E.; CHELBINA, Y.V.; SOKOLENKO, V.A.; TARABANKO, N.V. A study of vanillin extraction by octylamine. *Solvent Extraction and Ion Exchange. Solvent. Extr. Ion Exc.* v. 25, p. 99-107, 2007.
- THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M. *Position of the American Dietetic Association*, Orlando, v. 99, p. 1280-1281, 1999.
- VIGLIO, E.C.B.L. O potencial da acerola. *Revista Conjuntura Econômica*, Rio de Janeiro, v.47, n.9, p.53-54, 1993.
- VISENTAINER, J.V., VIEIRA, O.A., MATSUSHITA, M., SOUZA, N.E. Características físico-químicas da acerola *Malpighia g.L.* produzida na região de Maringá. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.47, n.1, p.70-72, 1997.
- WANG, Y.; HAN, J.; XU, X.; HU, S.; YAN, Y. Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol–ammonium sulfate aqueous two-phase systems, *Separation and Purification Technology*. v. 75, p. 352–357, 2010.
- WANG, YUN; LIU, YAN; HAN JUAN; HU, SHIPING. Application of Water-Miscible Alcohol-Based Aqueous Two-Phase Systems for Extraction of Dyes. *Separation Science and Technology*, v. 46, p. 1283–1288, 2011.
- WAZIRI, S. M.; ABU-SHARKH, B. F.; ALI, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.*, v. 205, p. 275-290, 2003.
- WESCHE-EBELING, P.; ARGÁIZ-JAMET, A.; HERNANDEZ-PORRAS, L. G.; LOPEZMALO, A. Preservation factors and processing effects on anthocyanin pigments in plums. *Food Chemistry*, v. 57(3), p. 399-403, 1996.
- WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.3, p.609-614, 2003.

- YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, p. 40-46, 2010.
- 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*, v. 106, p. 685–690, 2008a.
- YANG, B.; JIANG, Y.; ZHAO, M.; SHI, J.; WANG, L. Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Polymer Degradation and Stability*, v. 93, p. 268-272, 2008b.
- YANG, Y.; ZHANG, F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 308–313, 2008.
- YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG 1000/NaH₂PO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1664-71, 2010.
- YARDIM-AKAYDIN, S.; ÖZKAN, Y.; ÖZKAN, E; TORUN, M.; SIMSEK, B. Therole of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovasculardiseases. *Clinica Chimica*, v. 338, p. 99-105, 2003.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52(2), p. 255-260, 2003.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; NASIRI, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. *J. Chem. Thermodynamics*, v. 42, p. 1071-78, 2010.
- ZHAO X.; XIE X.; YAN Y. Liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly(propylene glycol) and salt ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄, KCl, and KAc): experiment and correlation. *Thermochimica Acta*, v. 516, p. 46–51, 2011.
- ZHANG, D.Y., ZU, Y.G., FU, Y.L., WANG, W., ZHANG, L., LUO, M., MU, F.S., YAO, X.H., DUAN, M.H. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, v. 102, n. 4, p. 26-33, 2013.
- ZHANG, F.; YANG, Y.; SU, P.; GUO, Z. K. Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochemical Analysis*, v. 20, p. 33–37, 2009.

- ZUÑIGA, A. D. G. ROJAS, E. E. G.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R.; PEREIRA, J. A. M.; Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 21, 2003.
- ZUO, Y.; CHEN, H.; DENG, Y., Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. Talanta, v. 57(2), p. 307-316, 2002.