

**MAYRA CONCEIÇÃO PEIXOTO MARTINS**

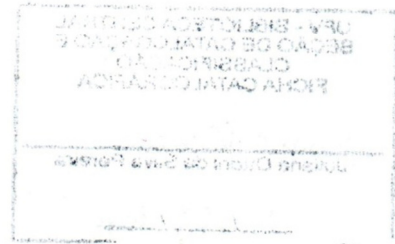
**PARTIÇÃO DE CLOROFILA E BETALAÍNA UTILIZANDO  
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2012



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386p  
2012

Martins, Mayra Conceição Peixoto, 1980-  
Partição de clorofila e betalaína utilizando sistemas aquosos  
bifásicos / Mayra Conceição Peixoto Martins. – Viçosa, MG,  
2012.

xiv, 80f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paulo César Stringheta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 67-74

1. Espinafre. 2. Clorofila. 3. Corantes. 4. Pigmentos.  
5. Sistemas aquosos bifásicos. 6. Extração (Química).

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

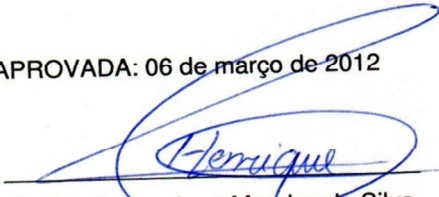
CDD 22. ed. 664.80541

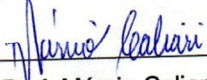
**MAYRA CONCEIÇÃO PEIXOTO MARTINS**

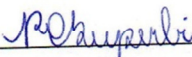
**PARTIÇÃO DE CLOROFILA E BETALAÍNA UTILIZANDO  
SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

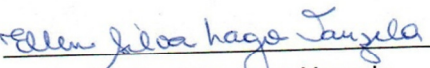
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 06 de março de 2012

  
Prof. Luis Henrique Mendes da Silva  
(Coorientador)

  
Prof. Márcio Caliani

  
Profª. Rita de Cássia Superbi de Sousa

  
Profª. Ellen Silva Lago Vanzela

  
Prof. Paulo César Stringheta  
(Orientador)

*Dedico este trabalho ao meu pai, Jairo, pelo seu amor e pelo seu exemplo. Por acreditar, apoiar e incentivar durante toda a minha trajetória.*

*... se você aceitar as minhas palavras e guardar no coração os meus mandamentos; se der ouvidos à sabedoria e inclinar o coração para o discernimento; se clamar por entendimento e por discernimento gritar bem alto; se procurar a sabedoria como se procura a prata e busca-la como quem busca um tesouro escondido, então você entenderá o que é temer o Senhor e achará o conhecimento de Deus. Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento. Pv 2. 1-6*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por Sua maravilhosa graça e amor derramados em minha vida a cada dia. Por meio Dele sei que todas as coisas são possíveis.

Ao meu pai, pelo seu exemplo pessoal e profissional pra minha vida; por me incentivar em minhas escolhas e por ser responsável por eu ter chegado até aqui.

À minha mãe, pelo amor incondicional e pelo poder de sempre me tranquilizar. Pelo incentivo e pela presença constante em minha vida.

Agradeço à Antonia pela torcida e pelas frequentes orações.

Aos meus irmãos, Luhan e Tarihan, pela ajuda [haja artigo heim, Lua], pelas orações, pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!!

Aos meus tios e primos que torcem por mim.

Ao professor Paulo César Stringheta, pela orientação, pela parceria e por acreditar neste projeto. Obrigada!

À professora Jane pela ideia do projeto e disponibilização do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada! Agradeço também ao João Paulo, pelas informações iniciais e pelo contato durante a elaboração da tese; qualquer tipo de convivência é um grande aprendizado.

Ao professor Luis Henrique, mestre e facilitador. Os seus ensinamentos abriram minha mente, de forma que ela nunca mais voltará a ser o que era! Obrigada! Sua humanidade, conhecimento e simplicidade foram fundamentais à conclusão dessa tese.

Ao Marcelo pelo apoio, paciência e amor. Obrigada, pelo seu cuidado, pelo seu carinho e por estar sempre ao meu lado. E à sua família, pelo carinho e acolhimento.

Às amigas Paula Araújo, Paula Cipriano e Adriana, pelos anos de convivência, pela amizade, pela ajuda e pelos inúmeros bons momentos. Que nossa amizade vá além da UFV, e que o contato se estenda em nossas novas direções. À Isadora e à Juliana, obrigada pela convivência.

Ao Bráulio, o MELHOR estagiário do mundo!!!! Obrigada pela sua ajuda durante todo o processo de construção desta tese. Obrigada pela amizade e a excelente convivência. Seu bom humor, sua disposição [mesmo de ressaca, rs] e seu comprometimento foram essenciais para o sucesso deste trabalho. Você vai longe!!!

Ao Valério pelo auxílio nas atividades do laboratório e pela boa convivência na maioria do tempo! Rrsrs... Aos estagiários Flávia, Igor, Mariana, Lívia e todos os outros que passaram pelo laboratório. Obrigada pela ajuda e pela convivência.

Ao professor Vicente de Paula Lelis, pelos anos de monitoria, pelo aprendizado e pela confiança. Foi um prazer trabalhar e aprender com o senhor!

Às minhas companheiras de república, principalmente a Tati, a Cris e a Talithinha... meninas.. vocês são demais!!! Foi muito bom conhecer vocês!! Tati, obrigada pela amizade, pelas correções e sugestões!! Te dedico!!! Vou sentir muito a sua falta!

À “Liga da Justiça” pela amizade e por todos os momentos inesquecíveis e únicos ao lado de vocês. Amigos que estarão comigo para sempre!! Cada um ao seu modo conquistou minha amizade e minha admiração nesses anos de convivência. Mesmo com cada um tomando um rumo diferente, a Liga vai ser pra sempre a Liga!

Ao Gabriel e ao Guilherme pela convivência durante a disciplina de Termodinâmica. Estudar com vocês foi essencial para minha formação nesta área. Agradeço pelas dúvidas tiradas e pela imensa contribuição, mas principalmente pela generosidade e disposição em me ajudar sempre que precisei. Agradeço ao Guilherme pelas horas dedicadas à discussão dos meus dados. [Mas ainda estão me devendo um cachorro quente heim?? Rsr]

Aos amigos que fiz nesses anos em Viçosa. Nativos ou de qualquer outro lugar do mundo. Nunca me esquecerei de vocês. Obrigada por fazerem parte da minha vida em Viçosa, cada um na sua importância.

Ao grupo de convivência pela amizade, orações e pelos momentos juntos. Espero que o curto tempo de convivência seja o suficiente para longas amizades. Amo cada um de vocês!!

A todos os funcionários do DTA que contribuíram ou torceram pelo sucesso deste trabalho. Guardo cada um de vocês no coração, cada sorriso e cada cumprimento! Obrigada por fazer meus dias mais agradáveis!!

À CAPES pela bolsa concedida.

## **BIOGRAFIA**

MAYRA CONCEIÇÃO PEIXOTO MARTINS, filha de Jairo Fernandes Martins e Mirene Conceição Peixoto, nasceu em 20 de novembro de 1980 em João Pessoa, Paraíba.

Graduou-se em junho de 2004, em Engenharia de Alimentos, pela Pontifícia Universidade Católica, PUC, em Goiânia, Goiás.

Em abril de 2005, iniciou uma especialização em Gestão da Produção pelo SENAI-Fatesg em Goiânia, Goiás

Em agosto de 2005, iniciou o Programa de Pós Graduação, em nível Mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Goiás.

Em agosto de 2008 iniciou o Programa de Pós Graduação, em nível Doutorado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Goiás.

## SUMÁRIO

	<b>SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiv</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>xv</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1	BREVE HISTÓRICO SOBRE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS .....	2
2.2	SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS .....	3
2.3	DIAGRAMA DE FASES .....	5
2.4	ESTUDO DA PARTIÇÃO DE SOLUTOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS .....	7
2.4.1	<b>Contribuição entrópica no coeficiente de partição .....</b>	<b>8</b>
2.4.2	<b>Contribuição entálpica no coeficiente de partição .....</b>	<b>10</b>
2.5	VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO..	12
2.5.1	<b>Constituintes das fases .....</b>	<b>12</b>
2.5.1.1	<i>Polietilenoglicol</i> .....	12
2.5.1.2	<i>Sais</i> .....	13
2.5.2	<b>Massa molar e concentração do polímero .....</b>	<b>14</b>
2.5.3	<b>Tipo de cátion e pH .....</b>	<b>15</b>
2.5.4	<b>Tipo e concentração de sal .....</b>	<b>15</b>
2.5.5	<b>Temperatura .....</b>	<b>16</b>
2.6	CARACTERÍSTICAS DE CLOROFILAS E BETALAÍNAS .....	17
2.6.1	<b>Clorofilas .....</b>	<b>17</b>
2.6.2	<b>Betalaínas .....</b>	<b>21</b>
2.7	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES .....	22
2.7.1	<b>Metodologias antioxidantes <i>in vitro</i> .....</b>	<b>23</b>
2.8	COLORIMETRIA .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	28
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	29
4.1.1	<b>Reagentes .....</b>	<b>29</b>
4.1.2	<b>Equipamentos .....</b>	<b>30</b>
4.2	METODOLOGIA .....	30
4.2.1	<b>Preparo do sistema aquoso bifásico .....</b>	<b>30</b>
4.2.2	<b>Medida do volume das fases .....</b>	<b>31</b>
4.2.3	<b>Cálculo do coeficiente de partição .....</b>	<b>32</b>
4.2.4	<b>Quantificação das fases .....</b>	<b>32</b>
4.2.5	<b>Determinação de parâmetros termodinâmicos .....</b>	<b>33</b>
4.2.6	<b>Obtenção dos extratos de clorofila .....</b>	<b>33</b>
4.2.7	<b>Caracterização dos extratos de clorofila .....</b>	<b>34</b>

4.2.7.1	<i>Determinação de clorofila</i> .....	34
4.2.7.2	<i>Determinação de fenólicos totais</i> .....	34
4.2.7.3	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i> .....	35
4.2.7.3.1	<u>Teste do 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado (ABTS)</u> .....	35
4.2.7.3.2	<u>Teste do 1,1-diphenil-2-picril-hidrazil (DPPH)</u> .....	35
4.2.7.4	<i>pH</i> .....	36
4.2.7.5	<i>Cor</i> .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>37</b>
5.1	DIAGRAMA DE FASES .....	37
5.2	ESTUDO DA PARTIÇÃO .....	37
5.3	PARTIÇÃO DA BETALAÍNA .....	37
5.3.1	<b>Efeito do comprimento da linha de amarração (CLA)</b> .....	<b>38</b>
5.3.2	<b>Efeito da temperatura sobre o comportamento de partição</b> .	<b>40</b>
5.3.3	<b>Efeito da massa molar do polímero sobre o processo de partição</b> .....	<b>43</b>
5.3.4	<b>Efeito do eletrólito</b> .....	<b>45</b>
5.3.4.1	<i>Efeito do cátion</i> .....	45
5.3.4.2	<i>Efeito do ânion</i> .....	49
5.3.5	<b>Parâmetros termodinâmicos de transferência da partição da betalína</b> .....	51
5.4	PARTIÇÃO DA CLOROFILA .....	57
5.4.1	<b>Caracterização dos extratos de clorofila</b> .....	<b>60</b>
5.4.1.1	<i>Físico-química</i> .....	60
5.4.1.2	<i>Análise de cor</i> .....	61
5.4.1.3	<i>Avaliação antioxidante</i> .....	63
5.4.2	<b>Coefficientes de partição do extrato de espinafre</b> .....	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO I</b> .....	<b>75</b>
	<b>ANEXO II</b> .....	<b>79</b>

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**TEAC** – Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

**K<sub>p</sub>** – Coeficiente de partição

**[C]<sub>sup</sub>** – Concentração do soluto particionado para a fase superior, rica em polímero

**[C]<sub>inf</sub>** – Concentração do soluto particionado para a fase inferior, rica em sal

**CLA** – Comprimento da linha de amarração

**SAB** – Sistema aquoso bifásico

**PEG** – Polietilenoglicol

**C<sub>p</sub><sup>S</sup>** – Concentração do polímero na fase superior

**C<sub>p</sub><sup>I</sup>** – Concentração do polímero na fase inferior

**C<sub>s</sub><sup>S</sup>** – Concentração do sal na fase superior

**C<sub>s</sub><sup>I</sup>** – Concentração do sal na fase inferior

**ΔPEG** – Diferença de concentração de PEG nas fases superior e inferior expressa em % em massa

**ΔSal** – Diferença de concentração de sal nas fases superior e inferior expressa em % em massa.

**μ<sub>i</sub><sup>S</sup>** – Potencial químico do componente “i” na fase superior

**μ<sub>i</sub><sup>I</sup>** – Potencial químico do componente “i” na fase inferior

**ln** – Logaritmo neperiano

**Δ<sub>mix</sub>G** – Variação da energia livre de Gibbs de mistura

**Δ<sub>mix</sub>H** – Variação da entalpia de mistura

**R** – Constante universal dos gases

**T** – Temperatura

**FS** – Fase superior

**FI** – Fase inferior

**Δ<sub>tr</sub>H<sup>o</sup>** – Variação de entalpia de transferência

**Δ<sub>tr</sub>S<sup>o</sup>** – Variação de entropia de transferência

$\Delta_{tr}G^\circ$  – Variação da energia livre de Gibbs de transferência

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Sistema de duas fases aquosas imiscíveis: FS, Fase superior; FI, Fase inferior .....	4
<b>Figura 2</b>	Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares .....	6
<b>Figura 3</b>	Estrutura química da clorofila <i>a</i> .....	18
<b>Figura 4</b>	Estrutura química do fitol (A) e do ácido fitânico (B) .....	19
<b>Figura 5</b>	Processo de degradação da clorofila <i>a</i> pela ação de enzimas que atuam durante a maturação ou senescência do vegetal ..	20
<b>Figura 6</b>	Estrutura química das betalaínas .....	22
<b>Figura 7</b>	Espectro da luz visível, enfocando as cores espectrais .....	25
<b>Figura 8</b>	Representação tridimensional do diagrama de cromaticidade do sistema CIELAB .....	27
<b>Figura 9</b>	Sistema aquoso bifásico contendo betalaína sem degradar (a) e com betalaína após degradação a 45 °C (b) .....	37
<b>Figura 10</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de lítio a 25 °C .....	37
<b>Figura 11</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio a 5 °C (■) e a 25 °C (●) .....	39
<b>Figura 12</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e citrato de sódio a 5 °C (■) e a 25 °C (●) .....	41
<b>Figura 13</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio a 5 °C (■) e a 25 °C (●) .....	42
<b>Figura 14</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e fosfato de potássio a 5 °C (■) e a 25 °C (●) .....	42
<b>Figura 15</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de lítio a 5 °C (■) e a 25 °C (●) .....	43
<b>Figura 16</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de sódio a 5 °C .....	44
<b>Figura 17</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de sódio a 25 °C .....	45
<b>Figura 18</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 5 °C .....	46
<b>Figura 19</b>	Representação esquemática do modelo do pseudopolication	47
<b>Figura 20</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 5 °C .....	47
<b>Figura 21</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 25 °C .....	48

<b>Figura 22</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 25 °C .....	49
<b>Figura 23</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 5 °C .....	50
<b>Figura 24</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 5 °C .....	50
<b>Figura 25</b>	Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 25 °C .....	51
<b>Figura 26</b>	Valores de $\Delta_{tr}G$ da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■), PEG 4000 (●) e sulfato de lítio a 5 °C .....	52
<b>Figura 27</b>	$\ln K$ versus $1/T$ para betalaína em SAB composto por PEG 1500 e citrato de sódio em diferentes valores de CLA .....	53
<b>Figura 28</b>	Partição do extrato de espinafre .....	64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e citrato de sódio .....	54
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de sódio .....	55
<b>Tabela 3</b>	Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de lítio .....	56
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e fosfato de potássio .....	57
<b>Tabela 5</b>	Coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e citrato de sódio .....	58
<b>Tabela 6</b>	Coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de sódio .....	58
<b>Tabela 7</b>	Coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de lítio .....	59
<b>Tabela 8</b>	Coeficiente de partição para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e fosfato de potássio .....	59
<b>Tabela 9</b>	Valores de pH e clorofilas A, B e totais ( $\mu\text{g/g}$ de espinafre) .....	60
<b>Tabela 10</b>	Valores de $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ e $h^*$ .....	62
<b>Tabela 11</b>	Valores das análises de atividade antioxidante e fenólicos totais .....	63
<b>Tabela 12</b>	Coeficiente de partição do extrato de clorofila .....	65

## RESUMO

MARTINS, Mayra Conceição Peixoto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Partição de clorofila e betalaína utilizando sistemas aquosos bifásicos.** Orientador: Paulo César Stringheta. Co-orientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra e Luis Henrique Mendes da Silva.

Neste trabalho foram determinados os coeficientes de partição dos corantes comerciais clorofila e betalaína, mediante sistemas aquosos bifásicos constituídos pelos polímeros PEG 1500, PEG 4000 ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e pelos sais citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio, em diferentes temperaturas, a fim de aplicar como uma alternativa à separação desses corantes de matrizes alimentares. Os efeitos do comprimento da linha de amarração, da temperatura, da massa molar e do tipo de eletrólito foram avaliados para a betalaína. Foram ainda determinados os parâmetros termodinâmicos  $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  e  $\Delta_{tr}S$  para este corante. Foi possível observar os maiores valores de coeficiente de partição para sistemas formados por PEG 1500, em relação ao PEG 4000; foi observado também o aumento do  $K_p$  com o aumento do CLA para a maioria dos sistemas estudados, causando uma mudança na força motriz que rege a partição, de acordo com o modelo de Haynes. Termodinamicamente, foi observado que para sistemas formados por PEG 1500 e todos os sais estudados, o processo de transferência do corante foi exotérmico. Em sistemas formados por PEG 4000 e citrato de sódio a  $5^\circ\text{C}$  e PEG 4000 e sulfato de lítio a  $25^\circ\text{C}$ , a componente entrópica prevaleceu em relação à entalpia. Em relação à clorofila, foi possível observar os altos valores de  $K_p$  para este corante, e, conseqüentemente, a forte prevalência da entalpia como força que dirigiu a partição. A partir disso, foi estudada a partição do extrato de clorofila de espinafre, tendo o etanol 92,8% como solvente e foi observado que houve partição completa para a fase superior dos sistemas estudados com o extrato, sugerindo que o uso do sistema aquoso é eficiente na partição do corante.

## ABSTRACT

MARTINS, Mayra Conceição Peixoto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2012. **Partition of chlorophyll and betalain using aqueous two-phase systems.** Adviser: Paulo César Stringheta. Co-advisers: Jane Sélia dos Reis Coimbra and Luis Henrique Mendes da Silva.

In this work we determined the partition coefficients of commercial dyes, chlorophyll and betalain by aqueous biphasic systems consisting of the polymers PEG 1500, PEG 4000 ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) and the salts sodium citrate, sodium sulfate, lithium sulfate and phosphate potassium, at different temperatures in order to apply as an alternative to separation of these dyes from food matrices. The effects of the tie line length (TLL), temperature, molecular weight and type of electrolyte were evaluated for betalain. We also determined the thermodynamic parameters  $\Delta_{tr}G$ ,  $\Delta_{tr}H$  and  $\Delta_{tr}S$  for this dye. It was observed the higher partition coefficient values for systems formed by PEG 1500, PEG 4000 with respect to, it was also observed  $K_p$  increased with the increase of TLL for the majority of the systems studied, causing a change in the driving force which governs partition in accordance with the standard Haynes. Thermodynamically, it was observed that for systems consisting of PEG 1500 and all salts studied, the process of transferring dye was exothermic. Systems consisting of PEG 4000 and sodium citrate at  $5^\circ\text{C}$  and PEG 4000 and lithium sulfate at  $25^\circ\text{C}$ , the entropic prevalent component in relation to the enthalpy. Regarding the chlorophyll was possible to observe the high values of  $K_p$  for this dye, and therefore the high prevalence of enthalpy as directed force that the partition. From this, we studied the partition spinach extract chlorophyll, with 92.8% ethanol as solvent and was observed that there was complete partition to the upper phase of the systems studied with the extract, suggesting that the use of the aqueous system is efficient to partition the dye.

## 1 – INTRODUÇÃO

A ênfase na busca de alimentos que contribuem para uma alimentação saudável tem aumentado intensamente em todo o mundo. Existem evidências fundamentadas de que muitos componentes em alimentos têm funções benéficas adicionais no organismo. Alimentação variada, colorida e equilibrada é a garantia de que são ingeridos todos os nutrientes essenciais necessários e recomendados. Dessa forma, muitos pigmentos naturais em alimentos servem não somente para colorir alimentos, mas também estão associados à promoção da saúde e bem-estar, reduzindo o risco de doenças crônicas não transmissíveis (STRINGHETA; VOLP; OLIVEIRA, 2008).

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais (VON ELBE, 2000), correspondendo a até 2% do peso total dos produtos. Entre as atividades relacionadas à clorofila, está seu uso como corante natural e antioxidante para restabelecimento do teor natural dessas moléculas em produtos alimentares ou para preparar produtos enriquecidos (STREIT et al, 2005). Diferentes métodos para a separação da clorofila são descritos na literatura, a maior parte deles desenvolvida em escala de laboratório ou se encontra protegida por patentes. Já as betalaínas conferem uma cor vermelha desejável em alimentos e têm várias aplicações na indústria de alimentos como aditivo em gelatinas, sobremesas, produtos de confeitaria e panificação, entre outros. Estes pigmentos têm recebido uma atenção crescente devido a suas atividades antivirais e antimicrobianas (CHETANA; NAYAK; RAGHAVARO, 2007).

Nos últimos anos, a extração líquido-líquido usando sistemas aquosos bifásicos (SABs) tem adquirido importância e crescente sucesso para a concentração, isolamento e separação de biomoléculas. Os SABs são constituídos por duas fases imiscíveis que promovem a separação de biomoléculas, em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma que sejam preservadas suas principais características. A alta concentração de água, de 70% a 90% em massa, em tais sistemas favorece a estabilidade das biomoléculas durante a separação quando comparados com sistemas tradicionais de extração líquida, compostos por solventes orgânicos.

Apresentam também vantagens como rapidez da separação, baixo custo e possibilidade de aplicação em grande escala. Estes sistemas têm sido uma importante ferramenta na partição e/ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microrganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (ZASLAVSKY, 1995; ALBERTSSON, 1986).

A importância deste trabalho se pauta na preocupação sobre a segurança dos corantes utilizados em alimentos que tem direcionado o interesse de pesquisadores e indústrias para a identificação e uso de corantes naturais. Com isso, diversos pigmentos de plantas encontradas na natureza vêm sendo avaliados para a utilização em alimentos processados a fim de conferir cor, fornecer aspecto mais saudável e, mais recentemente, como compostos bioativos.

## **2 – REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 – BREVE HISTÓRICO SOBRE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

A formação dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) é conhecida desde o final do século 19. Em 1896, Beijerinck descobriu que a mistura de soluções aquosas de ágar + gelatina ou amido solúvel + gelatina, em uma dada faixa de temperatura e concentração, resultava na formação de um sistema turvo que, em repouso, se separava espontaneamente em duas fases com propriedades termodinâmicas intensivas diferentes. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior, em gelatina, sendo a água o componente majoritário em ambas as fases (BEIJERINCK, 1896).

Posteriormente, Ostwald e Hertel (1929) verificaram que amidos provenientes de origens distintas como arroz, milho etc, produziam diferentes diagramas de fases. Esses resultados mostravam que era possível obter SAB com polímeros diferentes daqueles utilizados inicialmente.

Estudos realizados por Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, mostraram que o processo de separação de fases poderia ser obtido pela combinação de vários tipos de polímeros quimicamente distintos, dissolvidos

em solventes orgânicos ou em soluções aquosas (DOBRY; BOYER-KAWENOKI, 1947; DOBRY, 1948). Porém, foi apenas com os trabalhos de Per-Åke Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente que os SABs são uma ferramenta promissora para a separação/purificação de materiais de origem biológica.

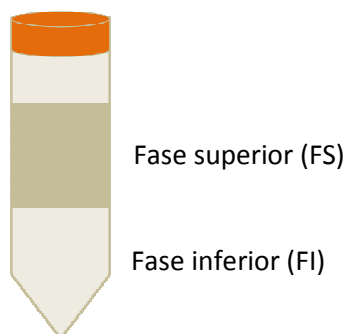
Atualmente, com legislações ambientais cada vez mais rígidas, as pesquisas para obter novos SABs têm ganho destaque pela necessidade de criação de metodologias ambientalmente seguras. Além disso, os SABs têm sido usados com sucesso na separação e purificação de macromoléculas, apresentando várias vantagens em relação às técnicas tradicionais, pois têm boa resolução, alto rendimento e baixo custo. Os SABs são facilmente adaptáveis para larga escala e os polímeros podem ser reciclados (REH; NERLI; PICÓ, 2002).

## 2.2 – SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

A formação espontânea de um sistema aquoso bifásico (SAB) ocorre quando dois polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis, ou um polímero e um sal inorgânico, são misturados em água, desde que determinadas condições termodinâmicas críticas sejam estabelecidas, isto é, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes (DA SILVA; LOH, 2006). As fases dos SABs são constituídas por 70 % a 90 % de água, o que favorece a estabilidade do sistema durante a separação, quando se compara com sistemas tradicionais, compostos com solventes orgânicos. Recentes melhorias da técnica, com o emprego de novos SABs compostos por polímero e sal, polímero e polímero, permitirão o seu uso em nível industrial (ALBERTSSON, 1986; BROOKS; SHARP; FISHER, 1994; ZASLAVSKY, 1995).

A utilização dos sistemas aquosos bifásicos na partição e purificação de materiais biológicos foi inicialmente proposta por Albertsson em meados da década de 50 (ALBERTSSON, 1986). Nestes casos, a extração através de SAB é adequada para substituir a extração convencional por solventes orgânicos, pois, pelo fato de o solvente ser a água, eles são ambientalmente seguros e permitem a separação de partículas sensíveis à desnaturação em

outros solventes (GUSTAFSSON; WERNNERSTRUM; TJERNELD, 1986). Desde então, as pesquisas nesta área têm-se aprofundado, tornando a utilização dos SABs importante ferramenta na partição e/ ou concentração de compostos como células animais ou vegetais, microrganismos, fungos e seus esporos, cloroplastos, mitocôndrias, membrana vesicular, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (HATTI-KAUL, 2001).



**Figura 1.** Sistema de duas fases aquosas imiscíveis: FS, Fase superior; FI, Fase inferior.

Os SABs são, então, sistemas formados por duas fases líquidas que se encontram em equilíbrio termodinâmico (Figura 1). As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração e composição. Mas como as duas fases dos SABs 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 da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

Em princípio, todos os tipos de sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados na separação de biomoléculas. Os sistemas constituídos por PEG-dextrana e PEG-sais são os sistemas normalmente usados por se encontrarem disponíveis no mercado e não serem tóxicos; mas para uso em escala industrial, a dextrana apresenta custo muito alto. Os SABs formados por polímero-sal-água apresentam vantagens em relação aos compostos por polímero-polímero-água como baixo custo e elevada seletividade, além de apresentarem propriedades físicas adequadas, principalmente com relação às diferenças de densidade e viscosidade. Assim, os sistemas PEG-sal têm sido usados para a extração em larga escala. Estes sistemas são formados em

temperatura ambiente, sendo a fase superior rica em PEG e a fase inferior rica em sal, e a separação de fases atingida mais rapidamente pela menor densidade de uma das fases, facilitando o uso de sistemas polímero-sal em aplicações industriais (SALABAT, 2001; GIRALDO-ZUÑIGA, 2000; HUSTED; CORNER; KULA, 1985).

Materiais biológicos adicionados em SAB distribuem-se entre as duas fases, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nas fases superior e inferior do SAB define o coeficiente de partição ( $K_p$ ) em sistemas aquosos (ALBERTSSON, 1986), sendo o definido por:

$$K_p = \frac{[c]_{sup}}{[c]_{inf}} \quad (1)$$

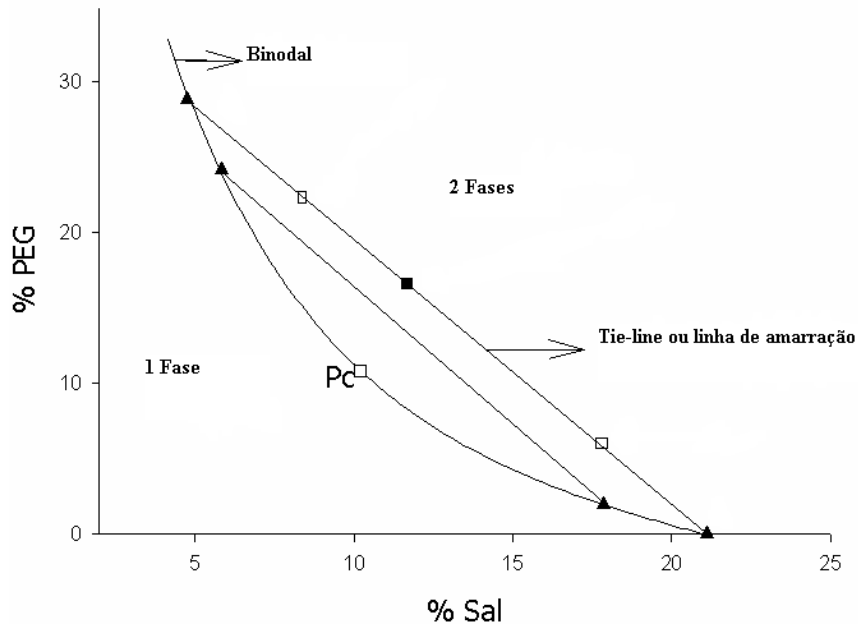
em que  $[c]_{sup}$  e  $[c]_{inf}$  são as concentrações de equilíbrio do composto particionado nas fases ricas em PEG (superior) e salina (inferior), respectivamente.

A base da partição em SAB é a distribuição seletiva de compostos entre as duas fases. Esta distribuição é governada por um grande número de fatores, como, por exemplo, natureza e tamanho da partícula alvo, constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero, temperatura, natureza do eletrólito e pH do sistema bifásico (ALBERTSSON, 1986). Por isto, a predição e a interpretação da partição de biopartículas em sistemas aquosos bifásicos são uma tarefa difícil (HATTI-KAUL, 2001), daí a importância de estudar diferentes SABs, ampliando e facilitando sua utilização na extração líquido-líquido.

### 2.3 – DIAGRAMA DE FASES

A representação gráfica das composições de cada uma das fases do SAB geralmente é feita em um diagrama de fases, Figura 2, em que a ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase superior (PEG) e a abscissa, a composição da molécula de maior concentração na fase inferior (sal ou dextrana). A curva que divide a região em duas fases é chamada de curva binodal ou curva de

equilíbrio. Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio levam à formação de duas fases e, abaixo da curva, de uma só fase. A formação de um SAB depende, portanto, da concentração dos componentes do sistema.



**Figura 2.** Diagrama de fases genérico para um sistema contendo PEG e sal, expresso em coordenadas retangulares.

As linhas são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração (LA) e qualquer ponto sobre ela representa um sistema com a mesma composição, porém com diferentes volumes das fases superior e inferior. Para se estudar a separação de fases em SAB, faz-se uso de uma medida numérica de referência para sua composição. O comprimento da linha de amarração, usualmente referido como CLA, é um valor empírico adequado para a utilização como tal medida. O CLA é um parâmetro termodinâmico importante, pois representa o quão distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas das fases do sistema, podendo ser calculado, a partir das concentrações dos componentes nas fases, pela equação:

$$CLA = \sqrt{(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2} \quad (2)$$

em que  $c_P^S$  e  $c_P^I$  são as concentrações de polímero na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto  $c_S^S$  e  $c_S^I$  são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente, expressas em % em massa. À medida que o valor de CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases.

Outra particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (Pc), representado na Figura 2. O ponto crítico é aquele no qual as propriedades físico-químicas (composição e volume, dentre outras) das duas fases são teoricamente iguais. Quanto mais a composição do sistema se aproxima do ponto crítico, menor é a diferença entre as fases, ou seja, no ponto crítico, as composições e os volumes entre as fases teoricamente são iguais. No entanto, nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas provocam drásticas mudanças, levando o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

## 2.4 – ESTUDO DA PARTIÇÃO DE CORANTES EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Há décadas, diferentes teóricos publicam estudos sobre a formação de fase num sistema bifásico. É necessário salientar que não existe ainda nenhuma teoria de separação de fases capaz de prever seu comportamento a partir da estrutura química dos componentes ou de suas características físicas individuais.

As condições utilizadas para a modelagem da formação das duas fases em um sistema são: a igualdade dos potenciais químicos de cada componente (o solvente, a água e os solutos, o polímero e/ou sal) nas duas fases aquosas e o balanço de massa de cada componente, ambos após o equilíbrio entre as fases (CABEZAS JR, 1996).

O modelo teórico desenvolvido por Haynes e outros pesquisadores (JOHANSSON et al., 1998), baseado na teoria de Flory e Huggins, descreve as forças motrizes que regem a partição de um soluto em SABs. Nesse modelo qualitativo, as contribuições entálpica e entrópica são explicitadas, permitindo a

interpretação direta das forças que dirigem a partição em um determinado sistema de duas fases.

A determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) requer conhecimento das duas fases em equilíbrio. A partir do critério de equilíbrio de fases (Equação 3), temos:

$$\mu_i^S = \mu_i^I \quad (3)$$

em que  $\mu_i$  é o potencial químico do componente  $i$  nas fases superior e inferior. O potencial químico do componente  $i$  na fase superior ( $\mu_i^S$ ) é dado por:

$$\mu_i^S = \left( \frac{\partial \Delta G_{mix}^I}{\partial n_i^I} \right)_{T,P,n_j \neq n_i} = \mu_i^\theta + RT \ln \phi_i^I + (\mu_i^{ex})^I \quad (4)$$

Na equação 4,  $\mu_i^\theta$  é o potencial químico com componente  $i$  puro à temperatura do sistema, e  $\mu_i^{ex}$  é o potencial químico excedente de  $i$  na fase. Se, no entanto, a solução for infinitamente diluída, podemos assumir que esta adição não irá interferir no equilíbrio das fases, o que simplifica muito a análise. O pressuposto da diluição infinita tem sido utilizado por um número de teóricos para obter expressões analíticas aproximadas para o coeficiente de partição. Sob essas condições, o coeficiente de partição pode ser determinado diretamente do diagrama de fases livre de soluto e a partir da aplicação das equações acima para soluto:

$$\ln K_p = \ln \left( \frac{\phi_i^S}{\phi_i^I} \right) = \frac{1}{RT} [(\mu_i^{ex})^I - (\mu_i^{ex})^S] \quad (5)$$

Aqui,  $(\mu_i^{ex})^I$  está relacionado com o excesso de entropia de mistura dos componentes para a formação das fases, e as interações não ideais entre todos os pares contrários presentes na fase inferior (proteína-polímero, polímero-solvente) (JOHANSSON et al., 1998).

#### 2.4.1 – Contribuição entrópica no coeficiente de partição

De acordo com Johansson e colaboradores (1998), aplicando a equação do potencial químico na equação 6:

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}H - T\Delta S^G = NRT \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i}{M_i} \ln \phi_i + N \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m \phi_i \phi_j w_{ij} \quad (6)$$

e assumindo  $\Delta H_{mix}$  igual a zero, tem-se a contribuição entrópica ao potencial químico do soluto:

$$\mu_s - \mu_s^e = T \left( \frac{\partial \Delta S^G}{\partial n_s} \right)_{T,P,n_j \neq n_s} = RT \left[ \ln \phi_s - \phi_s + 1 - M_p \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i}{M_i} \right] \quad (7)$$

O termo  $(RT \ln \phi_s)$  nos dá a mudança ideal na entropia molar parcial acompanhando a mistura do soluto com a fase. Os três termos remanescentes representam o  $\mu_s^{ex}$  definido anteriormente.

O coeficiente de partição do soluto é dado por:

$$\ln K_p = -(\phi_s^e - \phi_s^i) + M_s \left( \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i^s}{M_i} - \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i^i}{M_i} \right) = M_s \left( \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i^s}{M_i} - \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i^i}{M_i} \right) \quad (8)$$

em que a segunda igualdade se refere à diluição infinita; e tanto  $\phi_s^s$  e como  $\phi_s^i$  são muito pequenos, assim,  $\phi_s^s - \phi_s^i = 0$ .

Uma clara interpretação física da equação acima e a contribuição entrópica da partição podem ser obtidas observando que  $\left( \frac{\phi_s^s}{M_i} \right) = \left( \frac{n_i^s}{N^e} \right) = \left( \frac{n_i^s}{\rho V^e} \right)$ , em que  $N^e$  é o número de sítios de rede na fase superior,  $\rho$  é o número de sítios de rede por volume e  $V^e$  é o volume da fase superior. Então, podemos resumir a equação em:

$$\ln K_p = \frac{M_s}{\rho} \left( \frac{n^s}{V^s} - \frac{n^i}{V^i} \right) \quad (9)$$

em que  $K_p$  é o coeficiente de partição do soluto,  $M_s$  é a massa molar do soluto,  $\rho$  é a densidade numérica molar global do sistema e  $n^s$  e  $V^s$  representam o número de moléculas na fase superior e o volume que elas ocupam, respectivamente (JOHANSSON et al., 1998).

A equação é aplicada quando consideramos ausentes as contribuições entálpicas na partição de um soluto. Com isso, um soluto irá se transferir, preferencialmente, para uma fase se os números de molécula por unidade de

volume das fases forem diferentes. Além disso, a partição ocorrerá para a fase que possuir a maior densidade numérica de moléculas  $\left(\frac{n}{V}\right)$ . A densidade numérica será, principalmente, determinada pelo número de moléculas de água em cada fase, visto que é o componente majoritário nos SABs (AMIM JÚNIOR, 2006). Esta maior densidade numérica faz com que os solutos, ao se transferirem para esta fase, disponham de uma maior quantidade de formas distintas para se arranjam, contribuindo, assim, para uma maior minimização da energia livre de Gibbs do sistema (CARDOSO, 2007).

#### 2.4.2 – Contribuição entálpica no coeficiente de partição

Num sistema em que as contribuições da entropia para a partição são insignificantes – um sistema bifásico em que a densidade numérica das fases é idêntica – a partição de um soluto dependerá somente da diferença na entalpia molar parcial do soluto ( $\bar{h}_s$ ) nas fases superior e inferior. Em uma diluição infinita, a entalpia molar parcial do soluto na é dada por (JOHANSSON et al., 1998):

$$\bar{h}_s = \left( \frac{\partial \Delta H_{mix}}{\partial n_s} \right)_{T,P,n_j \neq n_s} = -M_s \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq s)}^m \phi_i \phi_j w_{ij} + M_s \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \phi_i (1 - \phi_s) w_{is} \quad (10)$$

Desde que o soluto seja diluído infinitamente,  $\phi_s = 0$ , o último termo da equação (10) é simplificado para:

$$M_s \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \phi_i^s w_{is} \quad (11)$$

Na ausência de entropia,  $\mu_s^{ex}$  é igual a  $\bar{h}_s$  na equação:

$$\ln K_s = \ln \left( \frac{\phi_s^s}{\phi_i^i} \right) = \frac{1}{RT} [(\mu_s^{ex})^i - (\mu_s^{ex})^s] \quad (12)$$

que produz a seguinte expressão para o coeficiente de partição:

$$\ln K_s = -\frac{M_s}{RT} \left[ \sum_{i=1(i \neq s)}^m (\phi_i^s - \phi_i^i) w_{is} - \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq s)}^m (\phi_i^s \phi_j^s - \phi_i^i \phi_j^i) w_{ij} \right] \quad (13)$$

em que  $\phi_i^a$  é a fração volumétrica do componente “i” em cada uma das fases e  $w_{ij}$  é o par potencial de energia fornecido pela equação:

$$w_{ij} = z \left( \varepsilon_{ij} - \frac{1}{2}(\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj}) \right) \quad (14)$$

em que  $\varepsilon_{ii}$  e  $\varepsilon_{jj}$  são as energias necessárias para romper as interações intermoleculares entre as moléculas semelhantes do tipo “i” ou do tipo “j”, respectivamente.  $\varepsilon_{ij}$  representa a energia envolvida na formação da interação intermolecular entre as moléculas “i” e “j”.  $w_{ij}$  é igual à metade da energia necessária para trocar uma molécula do tipo “i” numa amostra pura de “i”, em que cada molécula interage com “z” vizinhos, e a molécula do tipo “j” numa amostra pura de “j” para formar “2z” pares desiguais (i-j) (CARDOSO, 2007).

A contribuição entálpica para a partição do soluto contém dois termos que refletem as diferentes causas que podem promover a partição de um soluto (JOHANSSON et al., 1998).

O primeiro termo,  $\left[ \sum_{i=1(i \neq s)}^m (\phi_i^s - \phi_s^i) w_{is} \right]$ , refere-se a todos os tipos de interações que ocorrem entre o soluto e os componentes presentes tanto na fase superior como na inferior. Logo, este termo reflete a tendência de o soluto se transferir para a fase onde existe a maior concentração do componente com o qual tem a maior interação, ou seja, o menor valor de  $w_{is}$ .

O segundo termo da equação,  $\left[ \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq s)}^m (\phi_i^s \phi_j^s - \phi_i^i \phi_j^i) w_{ij} \right]$ , mostra a diferença do conteúdo entálpico entre as fases, sendo esta energia proveniente somente das diferentes interações dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico. O termo não expressa as interações devidas ao soluto.

Dessa forma,  $\left[ \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq s)}^m (\phi_i^s \phi_j^s) w_{ij} \right]$  define a autoenergia de cada fase. Consequentemente, um soluto irá se transferir para uma região que se encontrar em um estado termodinâmico de maior energia, ou seja, onde se

gastará menor energia para quebrar e formar novas interações (AMIM JÚNIOR, 2006).

## 2.5 – VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

As variáveis que influenciam a partição de biomoléculas entre duas fases podem ser classificadas como variáveis inerentes ao próprio sistema, como, por exemplo, componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura; ou à molécula alvo, como, por exemplo, hidrofobicidade, distribuição de cargas, ponto isoelétrico e massa molar (COSTA; PESSOA JR; ROBERTO, 1998; COSTA; PESSOA JR; ROBERTO, 2000; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; TUBIO; NERLI; PICÓ, 2004). Os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos não são ainda entendidos por completo. Sabe-se que o coeficiente de partição é resultante de forças de Van der Waals, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas das biomoléculas com as fases do sistema (GUNDUZ; KORKMAZ, 2000).

### 2.5.1 – Constituintes das fases

#### 2.5.1.1 – Polietilenoglicol

O polietilenoglicol (PEG), de fórmula  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ , é um polímero sintético hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ramificada, com massa molar variável, constituindo a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes. É solúvel em água e em vários solventes orgânicos (CARVALHO, 2004).

Este composto apresenta grande importância para as áreas biomédicas e de biomateriais; é produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares, variando de poucas centenas a milhares de Daltons. O PEG é obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que  $40000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino. A designação PEG é mais usada para compostos de baixa massa molar (abaixo  $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e a designação PEO poli (óxido de etileno) é restrita a compostos de altas massas

molares (maiores que  $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Os PEGs com massas molares menores que  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas; enquanto os de massas molares acima de  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Ambos podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a ocorrência de oxidação em soluções seja retardada (RIBEIRO, 2001).

De acordo com Silva (2007), a utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não é problemática para o meio ambiente. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas: insolubilidade em água a elevadas temperaturas, forma complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos. Uma propriedade muito importante para a aplicação comercial do PEG é sua atoxicidade. O PEG foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo considerado não antigênico nem imunogênico. Estas características têm permitido sua larga utilização e de seus derivados em cosméticos, sabões e medicamentos. É importante destacar que, na indústria de alimentos, é regulamentada a sua utilização como veículo em edulcorantes de mesa e em suplementos vitamínicos e ou minerais (BRASIL, 2005).

#### *2.5.1.2 – Sais*

O fosfato de potássio dibásico,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , é branco, higroscópico, solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Pode ser convertido em pirofosfato por ignição. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina - pH entre 8,7 e 9,3 quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L. A solubilidade em água a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  é igual a 160 g/100 mL. O fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) também possui a coloração branca e é granulado; apresenta solubilidade em água igual a 22,2 g/100 mL a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; é insolúvel em álcool e possui o pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução aquosa de concentração de 50 g/L (SIGMA-ALDRICH, 2001).

O sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de 16,86 g/100 mL a 18 °C. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de sulfato de sódio em água (MERCK, 2009). Possui larga aplicação industrial e em particular nas indústrias têxtil, de papel, detergente e vidro.

O citrato de sódio ou citratotrisódico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ) apresenta-se na forma de cristais brancos, inodoros e estáveis em ar. É normalmente comercializado na forma de citratotrisódico dihidratado, com massa molar de 294,10 g/mol. Apresenta solubilidade de 42,5 g/100 mL em água a 25 °C. Tem pH entre 7,5 e 9,5 a 20 °C quando em solução de 50 g/L de citratotrisódico dihidratado em água (MERCK, 2011). É usado em fotografia como agente sequestrante para remover metais, como anticoagulante e na indústria de alimentos e como emulsificante, acidulante e sequestrante. Este composto é biodegradável, atóxico e pode ser descarregado em plantas de tratamento biológico de água residuária (ALVES, 2003).

O sulfato de lítio ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ) possui solubilidade de 34,8 g/mol em água a 20°C (MERCK, 2011). É um componente de interesse tecnológico com aplicações na detecção de radiação a laser, como elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica (TABOADA, 2002).

### **2.5.2 – Massa molar e concentração do polímero**

Em geral, um aumento da massa molar do polímero do sistema de duas fases aquosas, para uma determinada composição de fases, diminui a partição de material biológico para a fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986). O efeito da massa molar dos polímeros, por sua vez, depende da massa molar da biomolécula a ser separada. A massa molar do polímero influencia na separação do biomaterial por alteração do diagrama de fase (isto é, por influenciar a composição das fases) e por mudança no número de interações polímero-biomaterial. Em geral, o aumento na massa molar de um dos polímeros (em sistemas polímero e polímero) levará a uma separação mais

acentuada do material em outra fase. Entretanto, a magnitude desse efeito decresce com o aumento da cadeia do polímero (ALBERTSON, 1986; FORCINITI; HALL, 1991). Com relação à concentração do polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases se desloca em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero. A viscosidade das fases também aumenta com o aumento na concentração do polímero e isto pode influenciar a partição da molécula alvo (ASENJO, 1990; ALBERTSSON, 1986).

### **2.5.3 – Tipo de cátion e pH**

A influência da carga da biomolécula depende muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Mudanças no pH podem também induzir mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, causando mudança em seus comportamentos de separação (ALBERTSSON, 1986).

### **2.5.4 – Tipo e concentração de sal**

A composição do sal é outra variável de suma importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares (COSTA; PESSOA JR; ROBERTO, 1998). Sais com distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se distribuam quase que igualmente entre as fases, existem pequenas diferenças nos coeficientes de partição de diferentes sais, o que significa que diferentes íons têm diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que, por sua vez, direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000).

### 2.5.5 – Temperatura

A influência da temperatura é bastante complexa devido a seu efeito na composição das fases em equilíbrio assim como à alteração da estrutura da biomolécula e degradação (SARUBBO, 2000). Geralmente, para baixas temperaturas (menores que 20 °C), a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo, assim, o sistema passar facilmente para a região monofásica (BAMBERGER et al., 1985; TJERNELD; PERSSON; ALBERTSSON, 1985). O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema, polímero e polímero ou polímero e sal. Para o sistema PEG e dextrana, constatou-se que com o aumento da temperatura seria necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG e sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada. Observou-se também para o sistema PEG e sal que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e, conseqüentemente, ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (FORCINITI; HALL, 1991; ZASLAVSKY, 1995). Alguns trabalhos relatam um aumento do coeficiente de partição com a temperatura (JOHANSSON; ANDERSON; AKERLUND, 1984); outros, que não há relação entre o coeficiente de partição e a temperatura (TJERNELD; PERSSON; ALBERTSSON, 1985), mostrando a necessidade de estudos mais aprofundados para esclarecer o efeito deste parâmetro sobre a partição.

## 2.6 – CARACTERÍSTICAS DE CLOROFILAS E BETALAÍNAS

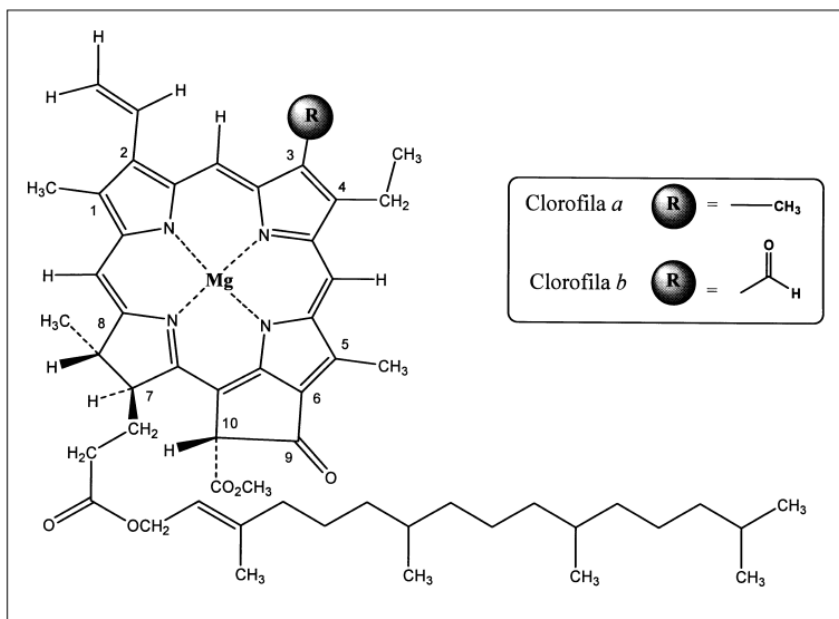
### 2.6.1 - Clorofilas

O pigmento verde das plantas foi descrito pela primeira vez em 1818 por Pelletier e Caventow num estudo em folhas, a quem se deve o nome clorofila, e isolada por Sorby em 1873, que empregou o método de partição entre metanol e dissulfeto de carbono (BOBBIO; BOBBIO, 1989; SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

As clorofilas constituem a classe de pigmentos mais largamente distribuída na natureza, em folhas e outras partes verdes de quase todas as plantas. São essenciais para a fotossíntese, processo pelo qual a energia da luz é utilizada pelas plantas na síntese de carboidratos. Ocorrem nos cloroplastos provavelmente associadas às proteínas e lipídeos. Nos cloroplastos, junto com as clorofilas, é encontrada outra classe de pigmentos, os carotenoides (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

Estruturalmente, as clorofilas são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, formadas por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas e a molécula contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis. No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico ali existente é esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente o fitol, conferindo à clorofila um caráter hidrofóbico (LANFER-MARQUEZ, 2003).

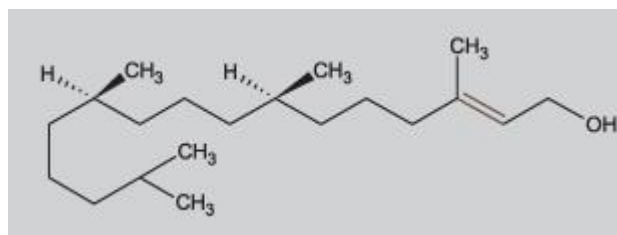
A clorofila *a* é a mais abundante e a mais importante dessa família, correspondendo a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. A clorofila *b* difere da clorofila *a* por uma pequena variação na substituição no anel pirrólico II, estando ambas apresentadas na Figura 3. As clorofilas *c* e *d* são encontradas em algas.



**Figura 3.** Estrutura química da clorofila *a* (Fonte: STREIT et al, 2005).

As clorofilas podem ser alteradas quimicamente por diversos fatores. Por exemplo, o fitol (Figura 4 A) pode ser removido facilmente por álcalis com formação das clorofilidas, compostos de cor verde que possuem praticamente a mesma absorvância das clorofilas, embora sejam bastante mais solúveis em água. O átomo de magnésio (Mg) central por ser facilmente removido, particularmente sob condições ácidas, ocorrendo sua substituição por um hidrogênio e a formação das feofitinas. A hidrólise do grupo fitol das feofitinas por ácidos ou álcalis produz os feoforbídeos. A clivagem do grupo fitol sem remover o átomo de magnésio, usualmente catalisado enzimaticamente por clorofilase endógena, produz as clorofilidas (Figura 5) (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

No processamento de alimentos, a reação mais importante envolvendo a clorofila, é da remoção do magnésio e sua substituição por prótons, pela ação de ácidos diluídos, com formação das feofitinas (Figura 5), compostos de cor verde-oliva, que prejudicam a aparência de alimentos ricos em clorofilas (BOBBIO; BOBBIO, 1989).



**Figura 4.** Estrutura química do fitol (Fonte: LANFER-MARQUEZ, 2003).

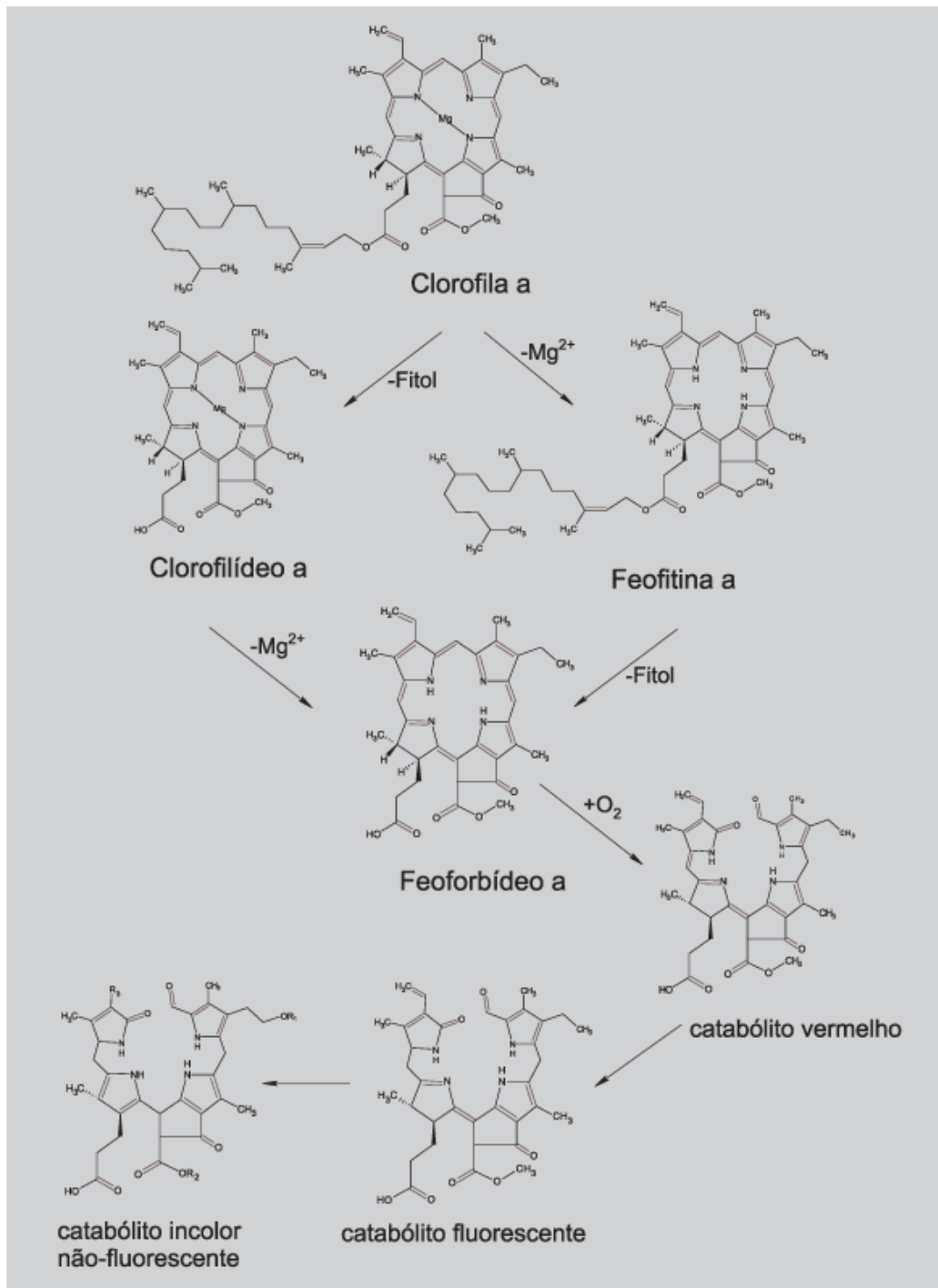
Um fenômeno adicional muito importante que acontece com as clorofilas é a facilidade com que os íons de magnésio nesses pigmentos são substituídos por metais divalentes. Os complexos formados com cobre têm cor verde brilhante, fazendo com que os alimentos se tornem mais atraentes. Esses complexos têm o metal firmemente ligado, somente sendo liberado pela ação de ácidos concentrados. Este fato possibilita o emprego seguro destas reações em favor da qualidade dos alimentos, uma vez que o cobre nessa forma não é absorvido pelo organismo. O seu uso em alimentos é permitido em vários países (BOBBIO; BOBBIO, 1989).

A determinação quantitativa do conteúdo das clorofilas pode ser feita por métodos diretos, de caráter destrutivo, ou de forma indireta e não destrutiva, com base nos seus espectros (ARGENTA; DA SILVA; BORTOLONI, 2001; HATFIELD; GITELSON; SCHEPERS, 2008). Os métodos de natureza destrutiva têm sido tradicionalmente empregados e são baseados na extração por meio de solventes orgânicos, seguida pela sua quantificação (ARNON, 1949).

De forma geral, as principais fontes de variação associadas à extração dos pigmentos clorofilianos incluem a natureza, polaridade e grau de pureza do solvente, a prévia maceração e centrifugação ou não dos tecidos, a temperatura e tempo de incubação e as equações usadas para calcular as concentrações de clorofila (BARNES; BALAGUER; MANRIQUE, 1992; PORRA, 2002; RITCHIE, 2008).

Para a extração completa das clorofilas, solventes com grau variado de polaridade como metanol, etanol, acetona, dimetilformamida são tidos como

mais eficazes que os solventes mais apolares, como o hexano e o éter de petróleo (RITCHIE, 2008).



**Figura 5.** Processo de degradação da clorofila *a* pela ação de enzimas que atuam durante a maturação ou senescência do vegetal (Fonte: LANFER-MARQUEZ, 2003).

O espectro de absorção da clorofila e de seus derivados é atribuído à estrutura da porfirina. A estrutura primária da porfirina das clorofilas é caracterizada por quatro principais bandas entre 500 e 700 nm na região visível do espectro e uma extensa banda em torno de 400 nm na região UV. Clorofilas e seus derivados são distinguíveis uns dos outros devido a mudanças na forma e posição das bandas no espectro de absorção causadas por mudanças estruturais na molécula primária (SCHWARTZ; LORENZO, 1990).

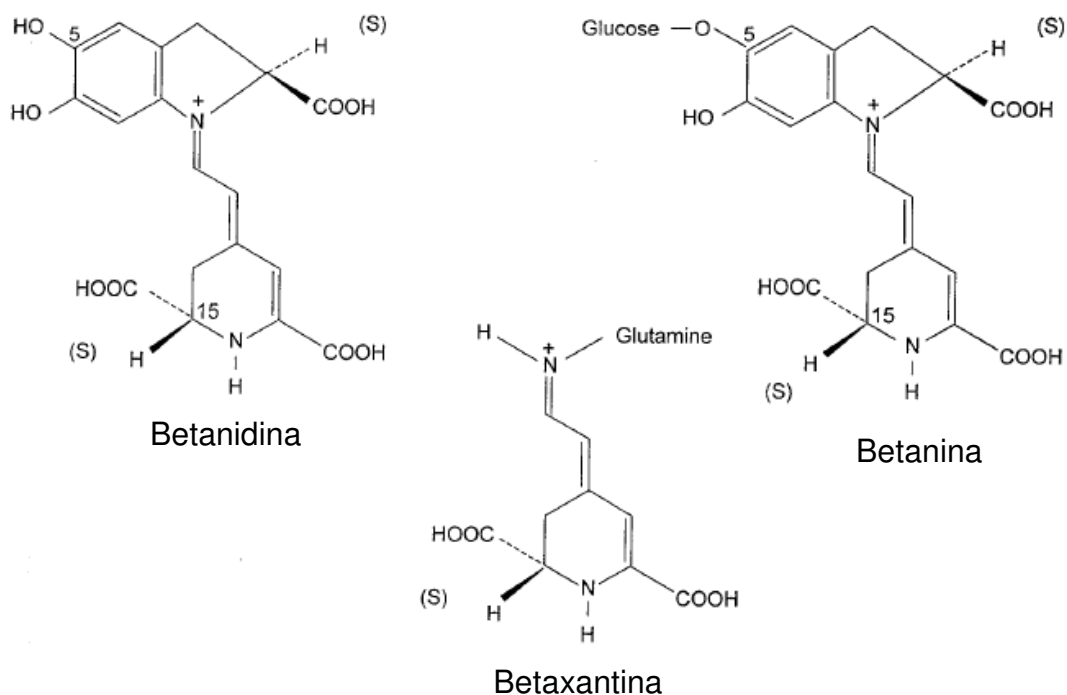
### **2.6.2 - Betalaínas**

Betalaínas incluem duas classes de compostos: betacianinas, de cor vermelho-violeta; e betaxantinas, de cor amarelada (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001). As betalaínas são os pigmentos encontrados mais abundantemente na beterraba, definidas quimicamente como derivadas do ácido betalâmico (CHETANA; NAYAK; RAGHAVARO, 2007).

Ao contrário de outros pigmentos, como antocianinas, clorofila e carotenoides, as betalaínas são pigmentos ainda estudados com menor intensidade. Enquanto já se conhecem cerca de 550 estruturas de antocianinas, apenas 55 betalaínas foram identificadas, entre elas, as betaxantinas e betacianinas (STINTZING; CARLE, 2007).

As betalaínas são mais solúveis em água do que as antocianinas (STINTZING; TRICHTERBORN; CARLE, 2006) e possuem uma força tintorial até três vezes maior do que as antocianinas. As betalaínas são particularmente interessantes pela sua estabilidade que varia de pH 3 a 7, tornando-as adequadas para a aplicação em uma ampla variedade de alimentos neutros e de baixa acidez. Apesar de serem mais solúveis em água, estáveis em uma ampla faixa de pH e adequadas para colorir alimentos de baixa acidez, as betalaínas são menos comumente usadas no processamento de alimentos (STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003).

A principal betalaína da beterraba é a betanina, que é uma betanidina 5-O- $\beta$ -glicosídeo (Figura 6) contendo um grupo fenólico e um amina cíclico, ambos bons doadores de elétrons que atuam como antioxidantes (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001).



**Figura 6.** Estrutura química das betalaínas (Fonte: KANNER; HAREL; GRANIT, 2001).

## 2.7 – COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Antioxidantes e a capacidade antioxidante de alimentos e suplementos alimentares têm atraído a atenção de indústrias, cientistas e consumidores pelos seus potenciais benefícios à saúde (VERLANGIERI et al., 1985), principalmente aqueles antioxidantes encontrados em frutas e vegetais, tendo em vista que estudos farmacológicos mostram a associação entre o seu consumo e a diminuição do risco de doenças degenerativas (RENAUD et al., 1998). O aumento dos níveis dessas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres cria o estresse oxidativo, que pode levar a lesões bioquímicas e fisiológicas gerando danos oxidativos em componentes celulares vitais como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, resultando eventualmente na morte das células (RICE-EVANS; MILLER; PAPAGANDA, 1996). Os danos oxidativos podem ser uma das causas que desencadeiam doenças degenerativas como câncer, doenças cardíacas, doenças inflamatórias, doença do sistema imunológico, disfunções neurológicas e catarata.

Diversos estudos têm mostrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente no organismo (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001), e, conseqüentemente, reduzir o risco de muitas doenças por sua capacidade de capturar, reativar ou consertar danos causados pelos radicais livres relacionados com estas doenças (ALONSO et al., 2002; MOURE et al., 2001). É nesse contexto que os antioxidantes naturais vêm se destacando por suas propriedades biológicas como atividade anti-inflamatória, anti-histamínica, antimutagênica, como sequestradores de radicais livres e protetores contra doenças cardiovasculares (GOMIS; PALOMINO; ALONSO, 2001).

### **2.7.1 – Metodologias antioxidantes *in vitro***

A medida da capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes em uma amostra, proporcionando uma análise de parâmetros integrados (GHISELLI et al., 2000). Contudo, é necessário enfatizar que os ensaios realizados *in vitro* são restritos, pois fornecem apenas uma ideia de como os sistemas reais se comportam, predizendo se existe ou não correlação entre antioxidantes potentes e os níveis de estresse oxidativo (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante podem estar sujeitas a interferências, por isso, atualmente, recomenda-se a utilização de dois ou mais métodos, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente reflete exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O ABTS (2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-sulfonato) é um método baseado na habilidade dos antioxidantes de capturar o cátion  $ABTS^+$ , radical livre que pode ser gerado após uma reação química com persulfato de potássio ou dióxido de manganês (KUSKOSKI et al., 2005). O radical  $ABTS^+$ , quando em um meio que contém antioxidantes, sofre decréscimo na absorvância, o que permite avaliar sua capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Outro método bastante utilizado na avaliação da capacidade antioxidante envolve o sequestro de radicais DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A eficiência do antioxidante é medida à temperatura ambiente, bem como no ABTS e, portanto, elimina o risco de degradação térmica das moléculas testadas. Entretanto, o mecanismo reacional entre os antioxidantes e o DPPH<sup>\*</sup> depende da conformação estrutural do antioxidante. Alguns compostos reagem muito rapidamente com o DPPH<sup>\*</sup>, reduzindo o número de moléculas de radical igual ao número disponível de grupos hidroxila presente no antioxidante. No entanto, para a maioria dos compostos testados, as reações são mais lentas e os mecanismos parecem ser mais complexos. Por isso, é extremamente útil que se construam modelos cinéticos a fim de se obter uma melhor compreensão dos mecanismos que envolvem DPPH<sup>\*</sup> e antioxidantes (BONDET; BRAND-WILIANS; BERSET, 1997).

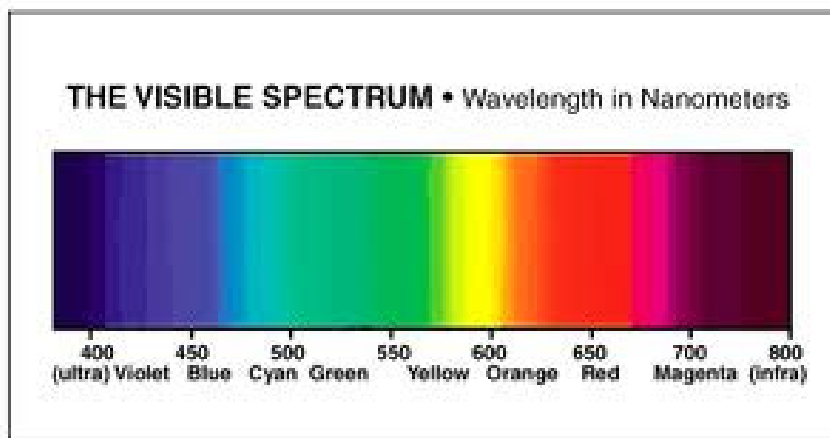
O ensaio TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) avalia espectrofotometricamente a habilidade relativa das substâncias antioxidantes em capturar determinado radical livre quando comparada com uma quantidade padrão do antioxidante sintético Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano), um análogo da vitamina E, diferindo dela por ser solúvel em água. A atividade dos compostos é expressa em valores de TEAC, definido como a concentração equivalente de Trolox por grama de amostra.

## 2.8 – COLORIMETRIA

As cores estão por toda parte e têm influência constante sobre nós. Farina (1975) afirma: “Se abriremos conscientemente os olhos ao mundo que nos rodeia, veremos que vivemos mergulhados num cromatismo intenso, e o homem moderno [...] não consegue separar-se dele, porque nele vive, por ele sente satisfação e amor”.

A cor é um dos atributos mais importantes de alimentos e bebidas, pois é o primeiro atributo a atrair o consumidor na escolha dos produtos (NACHAY, 2009).

Devido à influência das cores no cotidiano humano, tanto no aspecto fisiológico quanto artístico e psicológico, a necessidade de descrever as cores de maneira adequada assumiu relevada importância desde tempos remotos. A Figura 7 apresenta o espectro da luz visível - as cores que o olho humano pode perceber. Os sistemas de determinação de cor conhecidos são os Sistemas RGB e CMY, o Sistema de Munsell e os Sistemas Hunter Lab e CIELAB, estes últimos detalhados a seguir (RAMOS ; GOMIDE, 2007).



**Figura 7.** Espectro da luz visível, enfocando as cores espectrais.

O sistema de Hunter possui escala uniforme, em que **L** mede a luminosidade, que varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro), expressa no eixo vertical. Nos eixos horizontais, têm-se os valores de **a** e **b**, que representam os níveis de tonalidade e saturação: **a** positivo ( $a +$ ) indica o vermelho; **a** negativo ( $- a$ ), o verde ; **b** positivo ( $+ b$ ), o amarelo ; e **b** negativo ( $- b$ ), o azul. Essa escala é uma das mais empregadas na indústria de alimentos.

É importante definir os termos a seguir para melhor compreensão do funcionamento deste sistema.

- **Tonalidade (Hue):** é a grandeza que caracteriza a qualidade da cor (vermelho, verde, azul etc.), permitindo diferenciá-la. A tonalidade de uma cor, representada pelo símbolo **h**, está associada a certo comprimento de onda do espectro visível.

- **Saturação (Chroma):** descreve a intensidade ou a quantidade de uma tonalidade, indicando a proporção em que ela está misturada com o branco, preto ou cinza. Também chamada de *pureza* ou *intensidade* da cor, é a

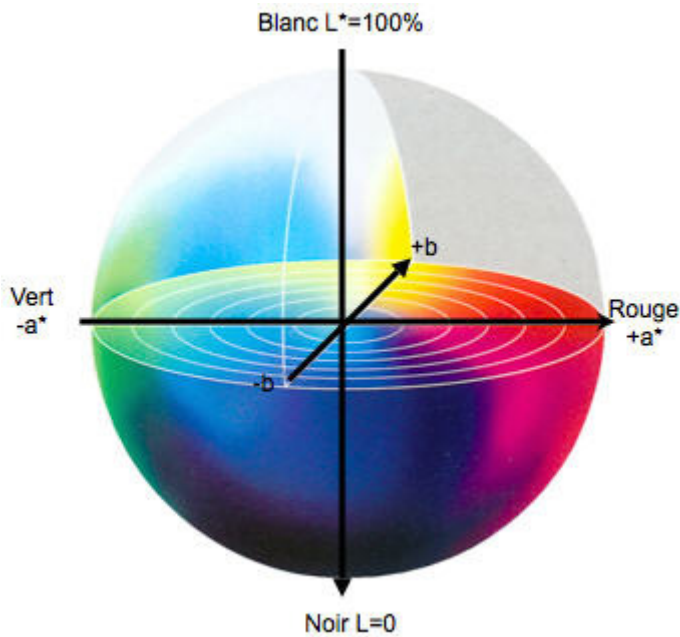
qualidade que nos permite distinguir cores fortes ou fracas. Assim, cores que apresentam baixo valor para saturação são chamadas de pálidas ou acinzentadas, enquanto aquelas com alto valor de saturação são denominadas de saturadas. A saturação é representada pelo símbolo **C**.

- *Luminosidade (Value)*: Representada pelo símbolo **L**, a luminosidade caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se as cores são claras ou escuras. A luminosidade varia de preto a branco, estando associada à sensação produzida por uma superfície com esta cor quando iluminada por uma luz branca de intensidade constante. Assim, este atributo diz respeito à forma com que vemos as diferenças relativas à presença de luz branca, não tendo relação com o tipo de fonte ou intensidade de luz empregada.

A escala Hunter Lab permite a comparação entre espécies ou entre um padrão e uma amostra, podendo facilmente ser expressa em termos de diferença de cores  $\Delta L$ ,  $\Delta a$  e  $\Delta b$ . Usando essa informação, podem ser interpretados o tamanho da diferença (números pequenos ou grandes) e a direção da diferença de cor (+ ou -).

O sistema Hunter foi desenvolvido durante as décadas de 1950 e 1960, passando por várias modificações até 1966. Em 1976, a CIE recomendou a escala **CIE  $L^*a^*b$** , ou **CIELAB**, como escala-padrão a ser usada para comunicar e diferenciar as cores.

Tanto a escala Hunter Lab quanto a CIELAB estão em uso atualmente, mas esta última está ganhando mais suporte em algumas indústrias por ser um padrão internacional e por ser constituída a partir da escala Hunter.



**Figura 8.** Representação tridimensional do diagrama de cromaticidade do sistema CIELAB. (Fonte: MINOLTA, 2007).

O sistema CIELAB (Figura 8) é igualmente relacionado à capacidade de percepção do olho humano. Como no sistema Hunter Lab, o valor de  $L^*$  determina a posição do ponto sobre o eixo vertical de claridade; o valor de  $a^*$  é do ponto sobre o eixo (-) verde/vermelho (+); e o valor de  $b^*$ , do ponto correspondente sobre o eixo (-) azul/amarelo (+).

A escala CIELAB também permite a comparação entre espécies ou entre um padrão e uma amostra, sendo, da mesma forma que a escala Hunter, facilmente expressa em termos de diferenças de cores  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  e  $\Delta b^*$ .

A disposição da amostra no sólido de cor é feita pela representação gráfica dos valores  $a^*$  e  $b^*$  nos respectivos eixos. Contudo, a forma pontual desses valores no plano deve ser substituída pela forma vetorial para facilitar a compreensão dos conceitos utilizados na análise dos valores obtidos. A amostra pode ser representada, portanto, como um vetor de origem no centro do sólido (0,0) e extremidade no ponto ( $a^*$ ,  $b^*$ ). No plano tridimensional, as coordenadas seriam ( $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$ ), partindo da origem.

Dessa forma, numa representação polar do sistema de coordenadas retangulares CIELAB, surge a escala **CIE  $L^*C^*h^*$** , que, numericamente, descreve a cor tridimensionalmente em luminosidade ( $L^*$ ), saturação ( $C^*$ ) e

tonalidade ( $h^*$ ); no entanto, por ser obtida matematicamente da escala CIELAB, a escala CIE  $L^*C^*h^*$  apresenta uniformidade visual similar à do sistema de coordenadas retangulares.

O **índice de saturação ( $C^*$ )**, representado pela equação 15, corresponde ao comprimento da projeção da localização da cor no plano ( $a^*$ ,  $b^*$ ):

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (15)$$

Outro conceito importante é o de **ângulo de tonalidade ( $h^*$ )**, pelo qual se pode estimar a posição de uma amostra no sólido de cor. Por meio do ângulo de tonalidade, pode-se, então, estimar a cor predominante do objeto analisado. Esse ângulo é definido pela equação 16:

$$h^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (16)$$

Uma vez que a escala CIELAB foi construída a partir da escala Hunter Lab, ambas permitem a comparação entre espécies ou entre um padrão e uma amostra. Assim, todas as considerações matemáticas utilizadas para caracterizar a diferença entre duas amostras são válidas para ambas as escalas.

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – OBJETIVO GERAL

- Estudar o comportamento de partição de corantes comerciais em sistemas aquosos bifásicos formados por polímero, sal e água em diferentes temperaturas e aplicar como uma alternativa à separação de clorofilas e betalaínas de matrizes alimentares.

#### 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o coeficiente de partição ( $K_D$ ) de sistemas aquosos bifásicos formados pelos polímeros PEG 1500 e PEG 4000 e pelos sais citrato de

sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio, nas temperaturas 5, 25 e 45 °C, tendo como soluto particionante os corantes comerciais clorofila e betalaína.

- Observar a influência do comprimento da linha de amarração, massa molar, temperatura e tipo de eletrólito na partição da betalaína.
- Extrair clorofila de espinafre utilizando diferentes solventes e concentrações dos solventes.
- Realizar análises para a comparação de desempenho de extração de clorofila de espinafre.
- Determinar o solvente a ser utilizado como extrator de clorofila de espinafre.
- Determinar o coeficiente de partição do extrato de espinafre, utilizando os SABs que obtiveram maior  $K_p$  no estudo com os corantes comerciais.

## 4 – MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

### 4.1 – REAGENTES E EQUIPAMENTOS

#### 4.1.1 Reagentes

- Polietilenoglicol 1500 g mol<sup>-1</sup> (VETEC, Brasil);
- Polietilenoglicol 4000 g mol<sup>-1</sup> (VETEC, Brasil);
- Fosfato de potássio (monobásico e dibásico, VETEC, Brasil);
- Citrato de Sódio (VETEC, Brasil);
- Sulfato de Sódio (DINÂMICA, Brasil);
- Sulfato de lítio (VETEC, Brasil);
- Clorofila (Christian Hansen);
- Betalaína (Christian Hansen);

- Acetona P.A (VETEC, Brasil);
- Etanol comercial; e
- Metanol P.A (VETEC, Brasil).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, não necessitando de mais purificações.

#### **4.1.2 Equipamentos**

- Espectrofotômetro UV-160 1 PC Shimadzu;
- Agitador magnético (FISATON, Brasil);
- Balança analítica (M-310, DENVER INSTRUMENT, USA);
- Centrífuga (5804, EPPENDORF, Alemanha);
- Banho termostático (TE-184, TECNAL, Brasil);
- Potenciômetro (Digimed DM-20, Brasil);
- Colorímetro Colorquest II Spera (Hunter Lab, Reston, VA); e
- Vidrarias diversas.

## **4.2 – METODOLOGIA**

### **4.2.1 – Preparo do sistema aquoso bifásico**

Os dados de equilíbrio para os sistemas aquosos bifásicos utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases de sistemas compostos por polietilenoglicol (PEG), sal e água obtidos por Carvalho (2004) e Oliveira (2006). A partir dos sistemas bifásicos contendo PEG de massas molares (1500 e 4000 g.mol<sup>-1</sup>) e do sal formador da fase (citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio), foram obtidos os coeficientes de partição da clorofila e betalaína comerciais, nas temperaturas de (5, 25 e 45) °C em função da concentração do PEG (8 a 33 % em massa) e do tipo de sal (8 a 17 % em massa).

Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados a partir de cinco comprimentos de linha de amarração (CLA) para cada sistema, e cada CLA em triplicatae com duas repetições. As composições globais para cada sistema se encontram no anexo I. Os SABs foram preparados pela mistura de PEG (1500

ou 4000) e um sal (citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio, ou fosfato de potássio). Para preparar os SABs, soluções estoque dos componentes das fases PEG 1500 ou PEG 4000 a 50 % em massa, sal e água foram misturadas até a obtenção da composição total do sistema. Para o preparo de uma solução estoque de fosfato de potássio (40 %), o ajuste do pH foi obtido adicionando fosfato de potássio monobásico e dibásico na proporção de 1:1,82, respectivamente. O sulfato de sódio foi adicionado a 23 %, o citrato de sódio a 42 % e o sulfato de lítio foi adicionado pela pesagem de sua forma sólida. As concentrações de cada sal foram definidas mediante testes de concentração. Os valores de pH das soluções salinas utilizadas de citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio, sulfato de zinco eram próximos de 7,0. Todos os sistemas foram preparados em tubos de centrífuga graduados. A massa total do sistema em cada tubo foi de 12 g, e a quantidade de corante adicionado ao sistema foi 10 e 20 mg para clorofila e betalaína, respectivamente. O corante foi o último componente a ser adicionado. Cada tubo foi agitado manualmente por, aproximadamente, 2 minutos e então centrifugado a 2000 g por 20 minutos, objetivando acelerar a formação das fases. Os tubos foram colocados em um banho termostático de acordo com a temperatura de trabalho (5, 25 e 45 °C), sendo mantidos em repouso durante 3 horas. Após esse tratamento, para determinar a concentração de corante em cada uma das fases, amostras de ambas as fases foram coletadas usando uma pipeta de Pasteur para a fase superior e uma seringa com uma agulha longa e fina para a fase inferior. Os volumes foram determinados em tubos graduados.

#### **4.2.2 – Medida do volume das fases**

Os tubos utilizados na partição foram calibrados um a um. Para cada tubo, foi obtida uma relação entre a massa de água e a altura da coluna de água atingida por esta massa. A partir da densidade da água, na temperatura ambiente, e da relação  $\rho = \frac{m}{V}$ , uma curva analítica para a determinação do volume das fases nos tubos foi construída em função do volume de água e da altura da coluna de água. Assim, antes da retirada das alíquotas das fases, a altura de cada fase foi medida com régua e o volume calculado. A altura da

fase inferior foi lida a partir do fundo do tubo até a interface, e a altura da fase superior foi calculada subtraindo a altura total (medida do fundo do tubo até a superfície da fase superior) da altura da fase inferior.

#### 4.2.3 – Cálculo do coeficiente de partição

O coeficiente de partição ( $K_p$ ) foi determinado por:

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (17)$$

em que  $[C]_{sup}$  e  $[C]_{inf}$  são as concentrações de equilíbrio do composto particionado nas fases ricas em PEG (superior) e salina (inferior), respectivamente. Este coeficiente foi usado para quantificar o grau de separação alcançado no processo de extração. Os experimentos foram com duas repetições, e a média dos resultados foi o valor empregado neste trabalho.

#### 4.2.4 – Quantificação das fases

Para determinar a concentração de clorofila em cada uma das fases, amostras de ambas as fases foram coletadas usando uma pipeta para a fase superior e uma seringa com uma agulha longa e fina para a fase inferior. Devido à sua alta viscosidade, a fase polimérica foi diluída antes de sua leitura em 1:4 (amostra:água) (OLIVEIRA, 2006; SILVA, 2007). A quantificação da clorofila se deu por espectrofotometria a 628 nm para clorofila e 536 nm para betalaína. As análises foram conduzidas em triplicata.

#### 4.2.5 – Determinação de parâmetros termodinâmicos

O coeficiente de partição foi determinado em três temperaturas. A partir dos valores de  $K_p$ , foi aplicada uma aproximação da equação de Van't Hoff,  $\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$ , relacionando  $\ln k$  com  $1/T$  através de uma expressão polinomial:

$$\ln k = a + b\left(\frac{1}{T}\right) + c\left(\frac{1}{T}\right)^2 + \dots + \ln \varphi \quad (18)$$

em que a, b, c, d e  $\ln k$  são constantes determináveis graficamente por ajuste polinomial do gráfico de  $\ln k$  versus  $1/T$ . Assim, pôde-se determinar a variação de entalpia de transferência,  $\Delta_{tr}H$ , associada ao processo de partição pela equação 19:

$$\Delta_{tr}H = -R \left[ b + 2c\left(\frac{1}{T}\right) + 3d\left(\frac{1}{T}\right)^2 + \dots \right] \quad (19)$$

A variação da energia livre de Gibbs de transferência,  $\Delta_{tr}G$ , foi determinada a partir da equação 20:

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln k \quad (20)$$

Por fim, a entropia de transferência,  $\Delta_{tr}S$ , foi determinada a partir da equação 21:

$$\Delta_{tr}S = \frac{(\Delta_{tr}H - \Delta_{tr}G)}{T} \quad (21)$$

#### 4.2.6–Obtenção dos extratos de clorofila

Os extratos foram obtidos de 10 g de espinafre macerados com 70 mL de solução extratora. Essa suspensão foi deixada em repouso em ausência de luz por 24 horas e sob refrigeração ( $7 \pm 1$  °C). Após 24 horas, as amostras foram filtradas em papel Whatman n° 1 a vácuo, em funil de Büchner, e o volume completado para 100 mL com a solução extratora. Foram testados três solventes em duas concentrações cada: etanol 92,8 %, etanol 70 %, metanol 100 %, metanol 70 %, acetona 100 % e acetona 70 %.

#### **4.2.7 – Caracterização dos extratos de clorofila**

Para a caracterização dos extratos de clorofila, obtidos do espinafre, foram feitas as seguintes análises: pH, clorofilas a, b e totais, colorimetria e investigação das propriedades bioativas como fenólicos totais e atividade antioxidante por duas metodologias diferentes (ABTS e DPPH), dos extratos obtidos. Os resultados foram analisados mediante análise de variância (ANOVA) e teste de média de Tukey, utilizando o software The Statistica System 9.0.

##### *4.2.7.1 – Determinação de clorofila*

O teor de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total foi determinado de acordo com Arnon (1949) por espectrofotometria, sendo realizadas leituras a 645 e 663 nm.

##### *4.2.7.2 – Determinação de fenólicos totais*

O teor de fenólicos totais foi estimado, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia proposta por Singleton, Orthofer; Lamuela-Raventos (1999).

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 600 µL de amostra e 3 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 10 vezes com água destilada, sendo o tubo agitado vigorosamente. Os tubos foram deixados em repouso por 3 minutos, quando foram adicionados 2,4 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Os tubos permaneceram em repouso por quarenta minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. A leitura espectrofotométrica da solução final foi realizada a 760 nm em espectrofotômetro.

A quantidade de fenólicos totais foi calculada com base na curva padrão de ácido gálico P.A., variando entre 0 e 200 mg•L<sup>-1</sup>. O conteúdo fenólico total foi obtido pela equação da reta do padrão de ácido gálico, e o valor final expresso em mg AGE (ácido gálico equivalente) por 100 g de espinafre.

#### 4.2.7.3 – Avaliação da atividade antioxidante

##### 4.2.7.3.1 – Teste do 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado (ABTS)

O cátion ABTS<sup>•+</sup> foi formado pela reação de soluções aquosas de 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de potássio (1:1), sendo esta solução resultante incubada à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e na ausência de luz, por 12 – 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução foi diluída em etanol 80% até uma absorbância de 0,700 ( $\pm 0,05$ ) a 734 nm. O antioxidante padrão a ser utilizado foi o Trolox nas concentrações de 5 a 150  $\mu\text{M}$ , com o qual foi construída uma curva analítica. Para que a reação entre o antioxidante (Trolox) e o radical (ABTS) ocorresse, foram adicionados 0,5 mL de cada concentração do antioxidante a um tubo de ensaio e 3,5 mL da solução do radical (ABTS). Os tubos foram reservados ao abrigo da luz até estabilização da reação, correspondendo ao tempo de 6 minutos, segundo Re e colaboradores (1999). A leitura das reações com ABTS foi realizada a 734 nm em espectrofotômetro.

Para o ensaio TEAC, foram feitas diluições das amostras com o objetivo de se elaborar uma curva de amostra – ABS vs Concentração (g de amostra $\cdot\text{L}^{-1}$ ). O mesmo procedimento de reação realizado nos padrões foi utilizado nas amostras: 0,5 mL de cada diluição da amostra para 3,5 mL da solução do radical.

A partir da equação da curva padrão de Trolox foi obtida a absorbância equivalente a 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{ABS}_{100 \mu\text{molL}^{-1}}$ ). O valor de  $\text{ABS}_{100 \mu\text{molL}^{-1}}$  foi substituído na equação da reta da curva da amostra, e o valor encontrado (gramas de amostra equivalente a 100  $\mu\text{M}$ ) foi transformado para que os resultados fossem expressos em  $\mu\text{M}$  equivalente de Trolox por grama de amostra.

##### 4.2.7.3.2 – Teste do 1,1-diphenil-2-picril-hidrazil (DPPH)

A avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH<sup>•</sup> foi feita conforme metodologias descritas por Espin e colaboradores (2000) e Pukalskas e colaboradores (2002), com modificações, sendo analisada a

porcentagem de moléculas do radical DPPH<sup>•</sup> sequestrada após determinado tempo, objetivando avaliar o tempo de reação entre o antioxidante e o radical.

Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,5 mL do extrato (devidamente diluído para que ocorresse redução parcial do DPPH) e 3,5 mL da solução etanólica de DPPH (0,1 mM) à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). As leituras de absorbância foram realizadas no comprimento de onda de 517 nm, em espectrofotômetro, em tempo zero e após a estabilização do valor da absorbância. Um estudo cinético foi realizado para determinar o tempo de estabilização da reação, tendo sido feitas leituras de absorbância do meio reacional (517 nm), em tempo zero e de 5 em 5 minutos, até que o valor obtido fosse constante em pelo menos 12 leituras (equivalente a 40 minutos de reação).

O ensaio TEAC com o radical DPPH<sup>•</sup> foi feito com uma solução 0,1 mM de DPPH dissolvido em etanol 80 % previamente preparado, utilizando o antioxidante padrão Trolox nas concentrações de 5 a 150  $\mu\text{M}$ . Para as determinações, foi construída uma curva analítica com o antioxidante padrão, utilizando o mesmo procedimento descrito para o ensaio TEAC com o ABTS. O tempo de reação foi determinado pela cinética, e a leitura das amostras foi feita a 517 nm em espectrofotômetro.

#### 4.2.7.4 – pH

O pH foi determinado por via direta, em equipamento digital (potenciômetro), segundo as normas analíticas propostas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### 4.2.7.5 – Cor

A cor foi determinada por colorimetria em Colorímetro Colorquest II spera, com leitura por reflectância das coordenadas L\* (luminosidade), a\* (intensidade de vermelho vs verde) e b\* (intensidade de amarelo vs azul). Os valores de C\* e h\* foram calculados.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 – DIAGRAMA DE FASES

Todos os diagramas de fase dos sistemas aquosos bifásicos foram obtidos da literatura (CARVALHO, 2004; OLIVEIRA, 2006). O comprimento da linha de amarração (CLA) foi calculado a partir das composições de equilíbrio termodinâmico das fases dos SABs, utilizando a equação 22:

$$CLA = \sqrt{(c_P^S - c_P^I)^2 + (c_S^S - c_S^I)^2} \quad (22)$$

Os valores calculados dos comprimentos da linha de amarração de diferente SABs formados pelo polímero PEG 1500 e PEG 4000 e os sais citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio a 5 e a 25 °C estão apresentados no anexo II. Sabe-se que com o aumento dos valores de CLA, aumentam-se as diferenças entre as propriedades termodinâmicas intensivas das duas fases em equilíbrio.

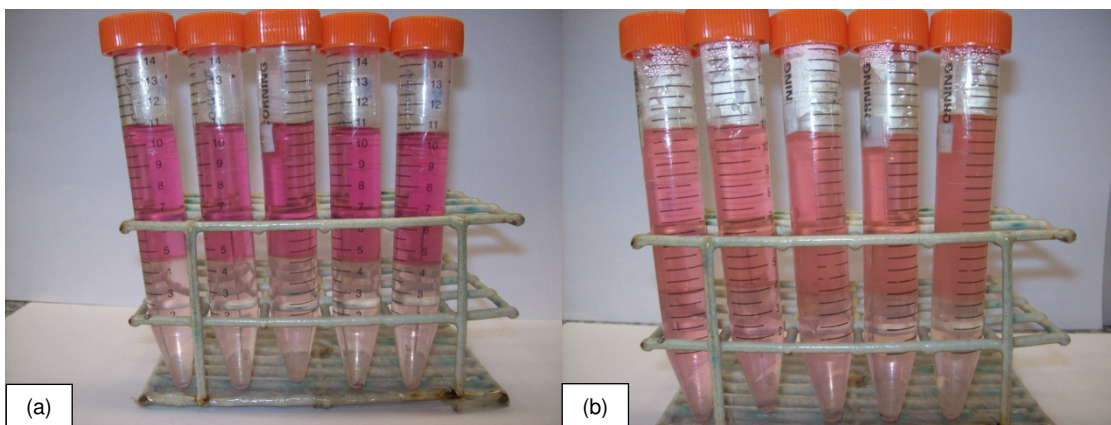
### 5.2 – ESTUDO DA PARTIÇÃO

Através dos experimentos de partição, realizados para os corantes comerciais de betalaína e clorofila, foi possível calcular o coeficiente de partição ( $K_p$ ) para os diferentes valores de CLA. A partir disso, foi possível estudar o efeito do comprimento da linha de amarração, da temperatura, da massa molar do polímero e dos eletrólitos formadores do SAB sobre o comportamento de partição do corante betalaína. Para a clorofila, foi feito um estudo de partição com um extrato de clorofila obtido do espinafre.

### 5.3 – PARTIÇÃO DA BETALAÍNA

Os resultados referentes à partição de betalaínas nos sistemas aquosos bifásicos à temperatura de 45 °C não foram considerados, pois o corante foi degradado nesta temperatura (Figura 9).

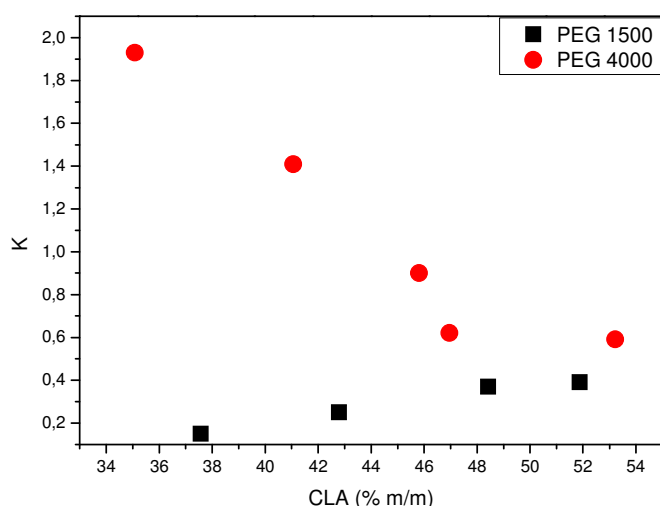
Isso mostra que os SABs não têm potencialidade para a extração e purificação da betalaína nesta temperatura.



**Figura 9.** Sistema aquoso bifásico contendo betalaína sem degradar (a) e com betalaína após degradação a 45 °C (b).

### 5.3.1 – Efeito do comprimento da linha de amarração (CLA)

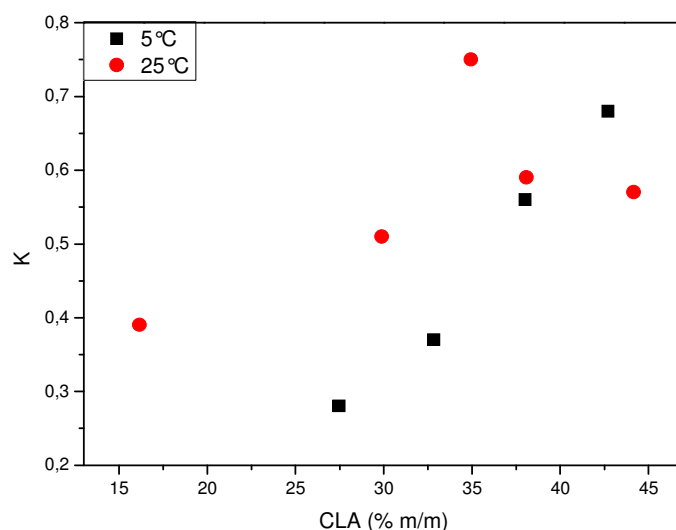
Um dos efeitos sobre o comportamento de partição da betalaína que pode ser visto nos SABs estudados é o referente ao comprimento da linha de amarração. O aumento no CLA provocou um aumento no coeficiente de partição da betalaína, fato observado para quase todos os sistemas estudados, exceto para o sistema formado por PEG 4000 e sulfato de lítio a 25 °C, em que o aumento do CLA promoveu uma diminuição nos valores de  $K_D$  (Figura 10).



**Figura 10.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de lítio a 25 °C.

Na Figura 11, outro comportamento distinto pode ser observado para o sistema formado por PEG 4000 e sulfato de sódio a 25°C, em que o aumento do CLA promoveu um aumento no valor de  $K_D$ , que, após atingir um valor máximo, passou a diminuir com o aumento do CLA.

Com o aumento do CLA, aumenta-se a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases que constituem o SAB. De acordo com o modelo de Haynes aplicado aos SABs, com o aumento do CLA, o soluto tende a se concentrar cada vez mais na fase inferior. Isso acontece porque, com o aumento deste parâmetro, aumenta-se a diferença da densidade de partículas entre as fases inferior e superior. Isso explica o resultado observado para a partição do corante no sistema PEG 4000 e sulfato de lítio a 25°C, cuja transferência é, provavelmente, entropicamente dirigida.



**Figura 11.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio a 5°C (■) e a 25°C (●).

Por outro lado, o aumento do CLA implica aumento na concentração de sal na fase inferior e da concentração de polímero na fase superior. Dessa forma, o aumento do coeficiente de partição com o aumento do CLA pode ser resultado de um aumento da quantidade do componente do SAB com o qual o corante interage mais favoravelmente.

Em todo processo de partição, tanto o fator entrópico quanto o entálpico influenciam o comportamento de partição do soluto, de tal forma que o aumento do CLA pode levar a uma mudança na força motriz que rege a partição do soluto.

### 5.3.2 – Efeito da temperatura sobre o comportamento de partição

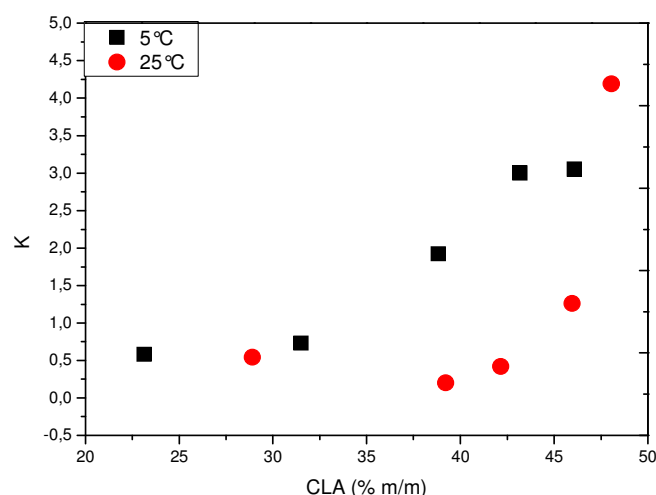
A temperatura pode provocar variação da região bifásica do diagrama de fase dependendo do tipo de sistema. Além disso, o coeficiente de partição de solutos em SABs pode ser modificado em função da temperatura devido às diferentes contribuições entálpicas e entrópicas que podem ocorrer no processo de transferência como resultado da variação da temperatura.

Em sistemas compostos por PEG 1500 e citrato de sódio, foram obtidos valores maiores de coeficiente de partição ( $K_p$ ) a 5 °C (Figura 12). A diminuição do  $K_p$  provocado pelo aumento da temperatura sugere que a transferência deste corante, da fase salina para a fase rica em polímero, é um processo exotérmico, como podemos ver pela clássica equação de Van't Hoff:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (23)$$

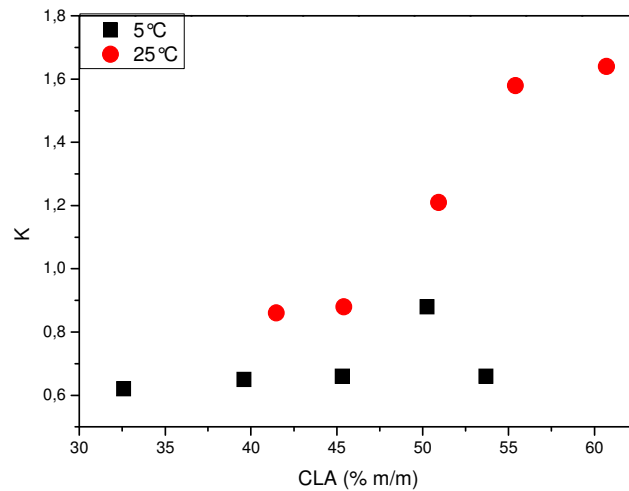
Em geral, a entalpia de transferência pode ser estimada indiretamente pelos estudos da dependência entre temperatura e coeficiente de partição. A partir da equação 23, é possível observar que se a taxa de variação do  $\ln k$  com a temperatura é negativa, então a razão  $\frac{\Delta H}{RT^2}$  também é negativa. Consequentemente  $\Delta H < 0$ , o que caracteriza um processo exotérmico.

Resultados semelhantes foram obtidos com os SABs formados por PEG 1500 e os sais fosfato de potássio, sulfato de lítio e sulfato de sódio.



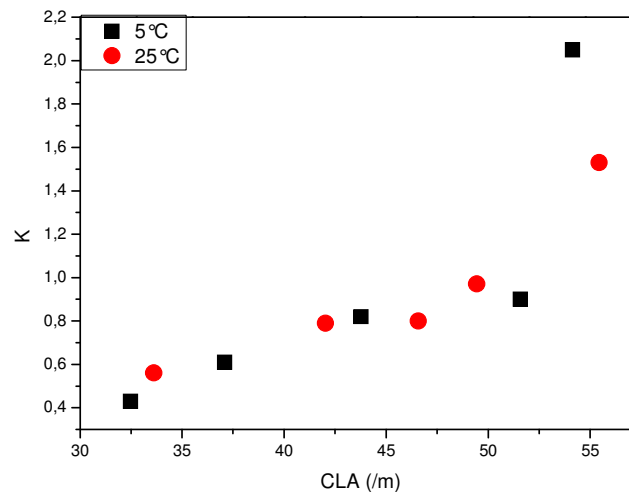
**Figura 12.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e citrato de sódio a 5°C (■) e a 25°C (●).

O uso do SAB formado por PEG 4000 e citrato de sódio acarretou maiores valores de  $K_p$  para o sistema a 25°C, como mostra a Figura 13. Observou-se também, de acordo com o modelo de Haynes, que o aumento do CLA ocasionou uma mudança na força motriz que rege a partição, tendo o aumento do CLA alterado de entrópica para entalpicamente dirigido o processo de partição da betalaína. O aumento do  $K_p$  com o aumento da temperatura, para todos os CLAs estudados, indica que a transferência do corante da fase inferior para a superior é um processo endotérmico.



**Figura 13.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABS formados por PEG 4000 e citrato de sódio a 5°C (■) e a 25°C (●).

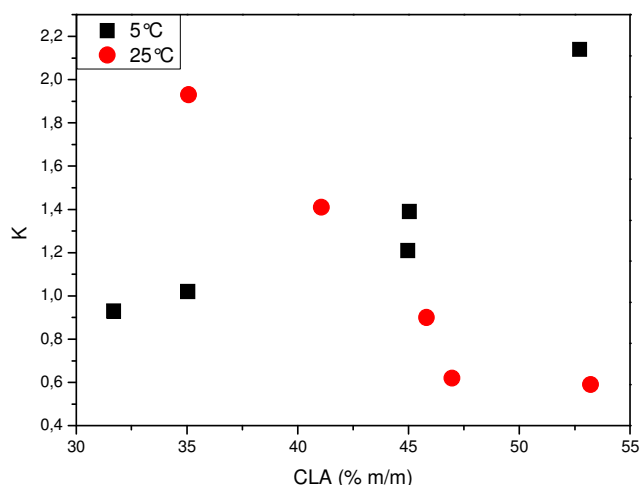
No SAB, no qual o sal fosfato de potássio foi utilizado com PEG 4000, os valores de  $K_p$  permaneceram próximos nas duas temperaturas (Figura 14). Em ambas as temperaturas, o processo começou entropicamente dirigido e, com o aumento do CLA, passou a ser dirigido pela entalpia.



**Figura 14.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABS formados por PEG 4000 e fosfato de potássio a 5°C (■) e a 25°C (●).

Na Figura 15, o coeficiente de partição da betalaína aumentou com o aumento do CLA à temperatura de 5°C; mas a 25°C, os valores de  $K_p$

diminuíram com o aumento do CLA, indicando uma maior contribuição entrópica para o processo. A força motriz que rege esta partição foi diferente de acordo com cada temperatura.

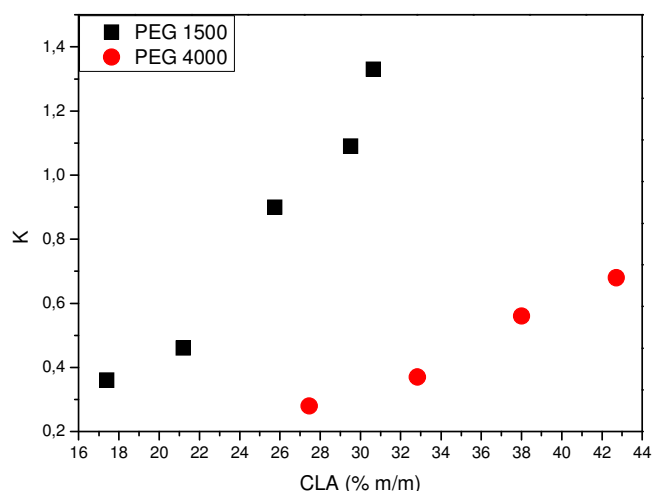


**Figura 15.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de lítio a 5°C (■) e a 25°C (●).

### 5.3.3– Efeito da massa molar do polímero sobre o processo de partição

Para avaliar o efeito da massa molar, foram comparados os sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 para os sais citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio.

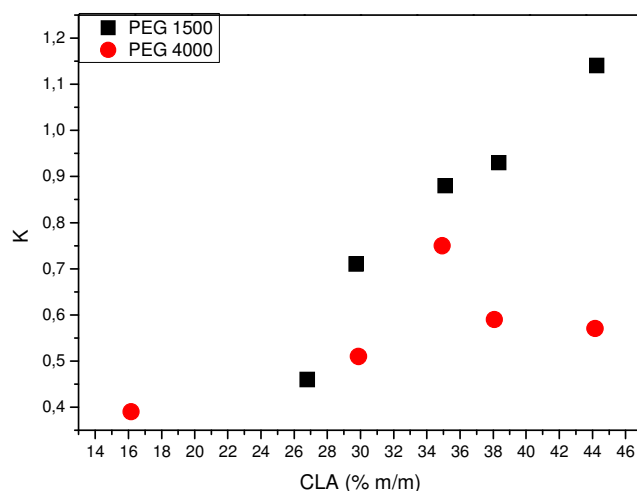
Na Figura 16, é possível observar os maiores valores de coeficiente de partição para o SAB composto por PEG 1500 e sulfato de sódio a 5°C, com o aumento do CLA. Esse comportamento se repete quando o mesmo sistema é obtido à temperatura de 25°C. Menores valores de  $K_p$  do corante foram obtidos para sistemas compostos por PEG 4000 e sulfato de sódio, tanto a 5°C quanto a 25°C (Figura 17).



**Figura 16.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de sódio a 5°C.

Em sistemas formados por PEG 1500 a 5°C, também foram obtidos maiores coeficientes de partição da betalaína quando formados pelos sais citrato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio.

Os maiores valores de coeficientes de partição para o polímero de menor massa molar podem ser explicados em razão da maior quantidade de sítios configuracionais da fase contendo este polímero, que irão alocar as moléculas do corante, em comparação à fase rica em PEG 4000. Este comportamento pode ser explicado em termos da entropia conformacional entre os polímeros PEG 1500 e PEG 4000, e essa contribuição entrópica do polímero influencia o número de diferentes maneiras de o soluto se distribuir na fase superior, reduzindo a entropia configuracional da fase, como já exposto.



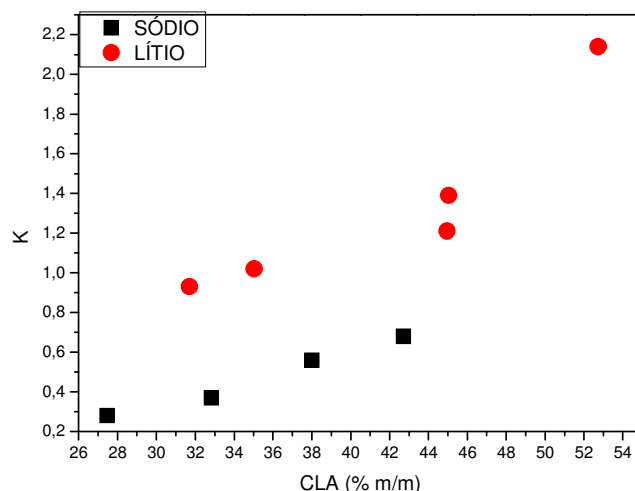
**Figura 17.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■) e PEG 4000 (●) e sulfato de sódio a 25 °C.

#### 5.3.4 – Efeito do eletrólito

O sal formador do SAB exerce uma grande influência sobre a região bifásica. Em geral, a avaliação do efeito do sal sobre o comportamento de partição de solutos é feita em termos dos ânions e cátions que compõem o sal, conservando-se o mesmo polímero e as mesmas condições termodinâmicas.

##### 5.3.4.1 – Efeito do cátion

Os maiores valores de coeficiente de partição da betalaína para sistemas formados por sulfato de lítio podem ser observados na Figura 18. Maiores valores de  $K_p$  para o sulfato de lítio também foram encontrados por Mageste e colaboradores (2009), que trabalharam com o corante carmim de cochonilha e os polímeros de massa molar 1500, 6000, 10000 e 35000 g.mol<sup>-1</sup>. Os autores avaliaram, neste trabalho, o efeito do pH, da massa molar do polímero, da hidrofobicidade, do comprimento da linha de amarração e do eletrólito no coeficiente de partição do corante.

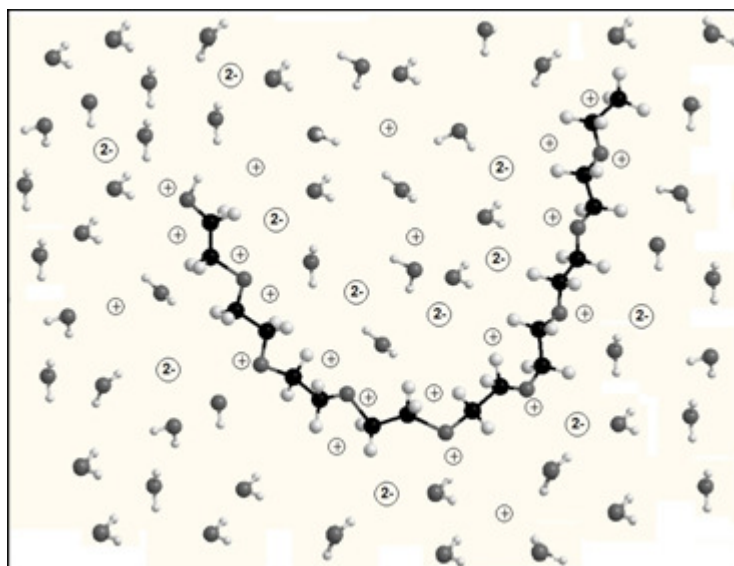


**Figura 18.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 5°C.

Os maiores valores de  $K_p$  do corante em sistemas formados por sulfato de lítio podem ser explicados pelo modelo do pseudopolication, proposto por Da Silva e Loh (2000). Este modelo propõe que a mistura de soluções de PEG e eletrólitos promove a interação entre estas espécies. A molécula de PEG contém em cada monômero um átomo de oxigênio contendo pares de elétrons livres para a interação com os cátions formadores do sal. Esta interação faz com que os cátions liberem moléculas de água que antes estavam solvatando devido às interações do tipo íon-dipolo.

Todo este processo ocorre com ganhos de graus de liberdade das moléculas de água, promovendo um aumento da entropia de mistura. Este evento continua ocorrendo até que não haja mais ganho entrópico pelo sistema e, neste momento, ele se separa em duas fases para minimizar a energia livre de Gibbs do sistema.

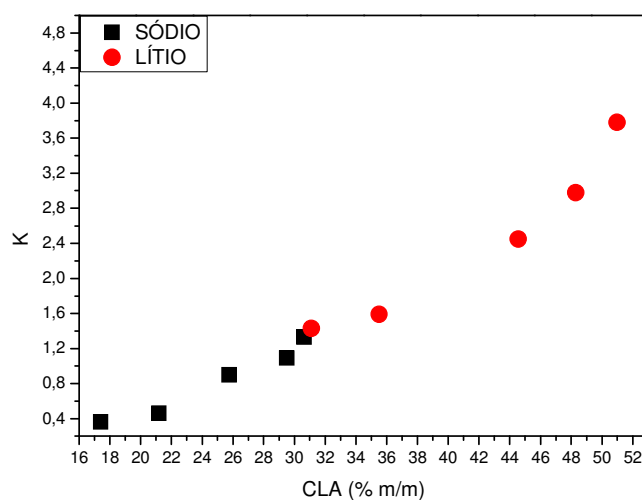
Portanto, a imagem que surge deste modelo é que a fase rica em polímero contém cátions interagindo com o polímero, gerando uma densidade de carga positiva sobre a macromolécula, nomeada de pseudopolication (Figura 19). Os complexos formados entre os cátions ( $\text{Li}^+$ ) e os pares de elétrons livres dos átomos de oxigênio contribuem para uma maior estabilização do corante na fase superior enriquecida em PEG.



**Figura 19.** Representação esquemática do modelo do pseudopolicátion.

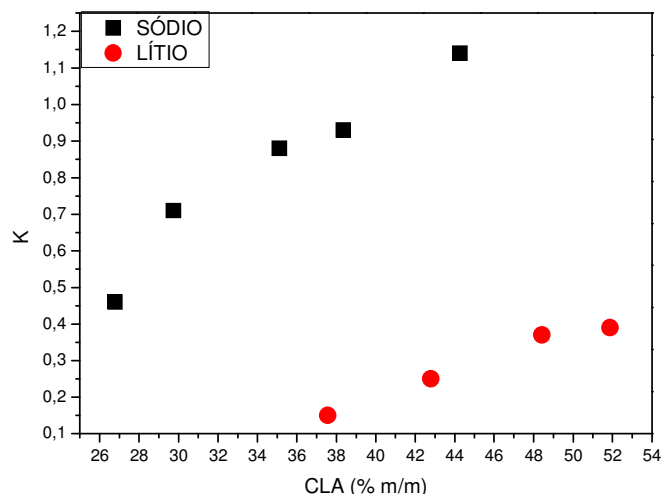
Vale ressaltar que os ânions também interferem na interação dos cátions com o polímero e, conseqüentemente, são capazes de promover o aumento ou a diminuição da região bifásica de um SAB.

A 5°C, o uso do PEG 1500 também proporcionou valores maiores de  $K_p$  da betalaína para sistemas formados por sulfato de lítio e um comportamento entalpicamente dirigido (Figura 20). Porém, os diferentes valores de CLA para os sistemas podem interferir na interpretação dos resultados.



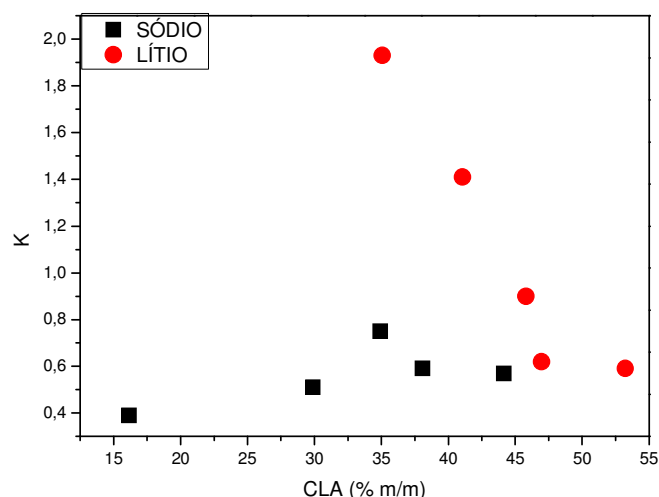
**Figura 20.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 5°C.

Em sistemas formados por PEG 1500 a 25°C, o comportamento foi diferente quando comparado ao sistema a 5°C. Neste sistema, os maiores valores de  $K_D$  para a betalaína foram observados quando o sal utilizado foi o sulfato de sódio (Figura 21). Nas duas temperaturas estudadas, os valores de  $K_D$  aumentaram com o aumento do CLA e a partição passou de entrópica para entalpicamente dirigida para os sistemas que utilizaram o sulfato de sódio.



**Figura 21.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 25°C.

A Figura 22 mostra a partição de betalaína em sistemas formados por PEG 4000 e os sais de sulfato a 25°C. Os valores encontrados mostram uma partição entropicamente dirigida para o sistema composto por sulfato de sódio. O sistema composto por sulfato de lítio apresentou um comportamento diferente do que já foi mostrado, e, apesar dos maiores valores encontrados para o  $K_D$  do corante, estes valores diminuíram com o aumento do CLA. Além disso, a partição do sulfato de lítio passa de entalpicamente dirigida para uma partição regida pela entropia com o aumento do CLA.

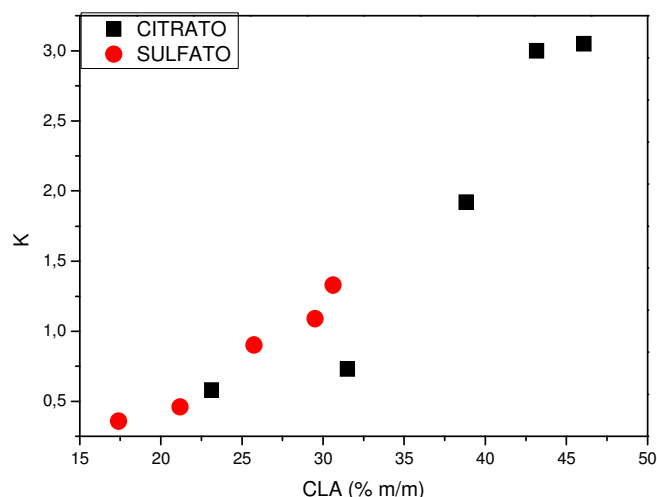


**Figura 22.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e sulfato de sódio (■) e sulfato de lítio (●) a 25°C.

#### 5.3.4.2 – Efeito do ânion

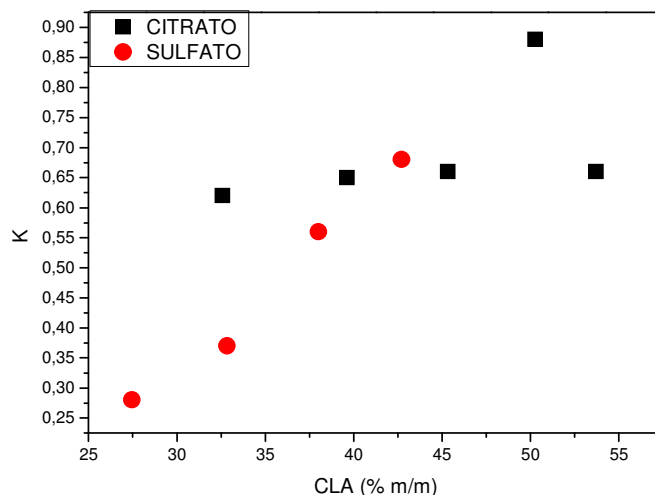
O ânion também pode exercer influência na partição de um soluto. Na Figura 23, é possível observar que o  $K_p$  da betalaína em sistema formado por citrato apresentou maiores valores nas duas temperaturas quando se utilizou o PEG 1500. O valor de pH das fases dos sistemas formados por citrato de sódio é mais elevado do que aquele em sistemas formados por sulfato de sódio. Nessas condições, o corante betalaína deve apresentar uma carga líquida negativa maior, de tal forma que a interação com o pseudopolication seja mais intensa no primeiro caso, o que levaria a maiores coeficientes de partição para este sistema. Isto está em desacordo com os resultados observados, sugerindo que os íons citrato devem competir mais favoravelmente pelos sítios de interação do pseudopolication do que os íons sulfato, fazendo com que os  $K_p$  diminuam em sistemas formados por citrato.

A 5°C, os valores do coeficiente de partição mostraram a passagem de um comportamento entropicamente dirigido para entalpicamente dirigido com o aumento do CLA. Um comportamento semelhante foi observado no sistema composto por PEG 1500, citrato de sódio e sulfato de sódio a 25°C.



**Figura 23.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 5°C.

As Figuras 24 e 25 mostram a variação do  $K_p$  com o CLA para sistemas formados por PEG 4000, com os sais citrato de sódio e sulfato de sódio. Pode-se observar que os valores de  $K_p$  foram maiores quando o sistema foi formado por citrato de sódio.

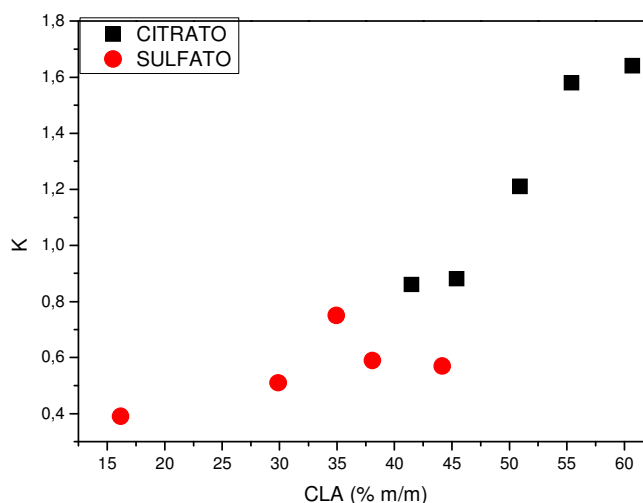


**Figura 24.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 5°C.

O estudo da partição da betalaína em SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio e sulfato de sódio a 25°C (Figura 25) revelou ainda um

comportamento entrópico do sistema composto por sulfato de sódio; mas o sistema composto por citrato de sódio se comportou aumentando o coeficiente de partição do corante com o aumento do CLA, tendo sido a partição governada pela entalpia à medida que o CLA foi aumentando.

No geral, pode-se observar que o ânion exerce pouca influência na partição da betalaína.



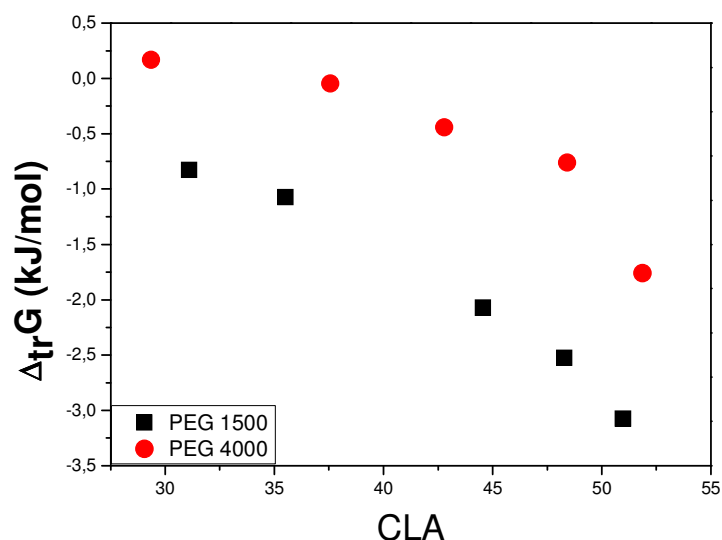
**Figura 25.** Coeficiente de partição da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 4000 e citrato de sódio (■) e sulfato de sódio (●) a 25°C.

### 5.3.5 – Parâmetros termodinâmicos de transferência da partição da betalaína

O comportamento de partição dos solutos nos SABs deve ser compreendido em termos das interações intermoleculares que ocorrem no processo de transferência. As interações polímero-polímero e polímero-solvente são dependentes da estrutura polimérica, das concentrações de sal e do polímero, da hidratação das cadeias poliméricas e dos corantes. Além disso, as interações de cada componente do SAB com o soluto particionante também determinam o comportamento da transferência. Todas estas interações são expressas no parâmetro termodinâmico chamado de energia livre de Gibbs de transferência,  $\Delta_{tr}G$ , relacionado ao coeficiente de partição pela relação clássica  $\Delta_{tr}G = -RT \ln K$  (19).

O parâmetro  $\Delta_{tr}G$  pode ser definido como a variação da energia livre de Gibbs do sistema quando um mol do soluto particionado se transfere da fase inferior para a fase superior do sistema.

A Figura 26 mostra a variação de  $\Delta_{tr}G$  da betalaína em função do CLA para sistemas formados por PEG 1500 e PEG 4000 com o sal sulfato de lítio, a 5°C. De acordo com essa figura, verifica-se que o processo de transferência do soluto não é espontâneo apenas para o 1º CLA do sistema formado por PEG 4000 e sulfato de lítio a 5°C, como pode ser verificado pelos valores negativos do  $\Delta_{tr}G$ .

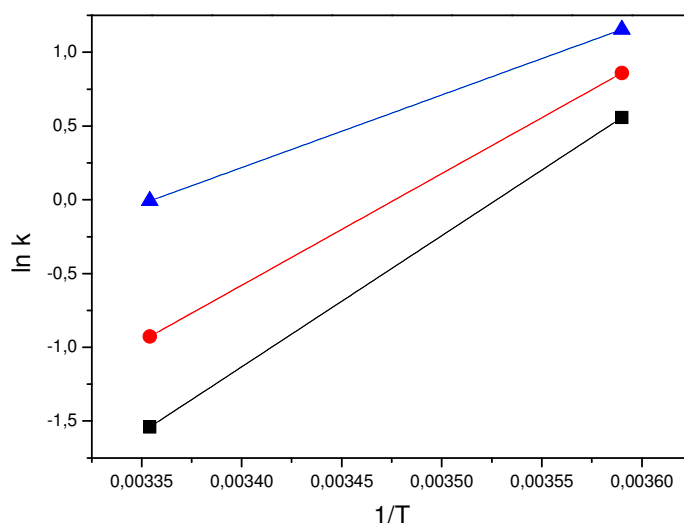


**Figura 26.** Valores de  $\Delta_{tr}G$  da betalaína em função do CLA dos SABs formados por PEG 1500 (■), PEG 4000 (●) e sulfato de lítio a 5°C.

Os valores da entalpia de transferência,  $\Delta_{tr}H$ , foram obtidos graficamente a partir dos dados de coeficiente de partição do corante determinados em diferentes temperaturas e tratados pela equação de Van't Hoff.

A Figura 27 apresenta o  $\ln K$  versus  $1/T$  para a betalaína no SAB formado por PEG 1500 e citrato de sódio para diferentes CLAs. O coeficiente angular associado a cada reta é equivalente à razão  $-\frac{\Delta_{tr}H}{R}$ , uma vez que se

tem assumido ser a variação de entalpia de transferência do soluto invariável com a variação da temperatura.



**Figura 27.**  $\ln K$  versus  $1/T$  para betalaína em SAB composto por PEG 1500 e citrato de sódio em diferentes valores de CLA.

A variação da entropia de transferência,  $\Delta_{tr}S$ , foi calculada pela equação:

$$\Delta_{tr}S = \frac{(\Delta_{tr}H - \Delta_{tr}G)}{T}$$

As Tabelas de 1 a 4 apresentam os parâmetros termodinâmicos obtidos pela equação de Van't Hoff para os sistemas estudados.

De acordo com a Tabela 1, o processo de transferência do corante em sistemas formados por PEG 1500 e citrato de sódio passa de espontâneo a não espontâneo quando a temperatura aumenta de 5 para 25°C para todos os CLAs avaliados. O processo é entalpicamente favorecido e ocorre com a diminuição da entropia do sistema para ambas as temperaturas. Além disso, com o aumento do CLA, ocorre um aumento nos valores de  $\Delta_{tr}H$ .

Para o SAB formado por PEG 4000 e citrato de sódio, o processo de transferência é espontâneo apenas para valores maiores de CLA no sistema a 25°C. Para as duas temperaturas, o processo é entropicamente favorecido, contrariando o modelo de Haynes. Isso pode ser justificado pelo fato de este

modelo considerar apenas variações de entropia de transferência configuracionais, de tal forma que o processo de transferência do corante deve ocorrer com outros tipos de variação de entropia, tal como variação de entropia conformacional da cadeia do polímero.

**Tabela 1.** Parâmetros termodinâmicos médios obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e citrato de sódio.

<b>PEG 1500 + Citrato de sódio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$ (KJ/mol)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (5 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (5 °C)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (25 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (25 °C)
<b>39,37</b>	-73,91	-1,307	-261,02	3,869	-260,87
<b>42,31</b>	-62,95	-1,986	-219,18	2,271	-218,75
<b>45,03</b>	-40,97	-2,653	-137,76	0,05	-137,58
<b>PEG 4000 + Citrato de sódio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$
<b>43,42</b>	8,42	0,825	27,31	0,289	27,27
<b>47,76</b>	13,98	0,76	47,53	-0,168	47,45
<b>51,86</b>	19,37	0,728	67,02	-0,573	66,89

Para sistemas formados pelo sal sulfato de sódio, o processo de transferência da betalaína é endotérmico tanto para sistemas formados por PEG 1500 quanto PEG 4000 (Tabela 2). Para PEG 1500 a 5°C, o processo se torna espontâneo com o aumento do CLA, mas para os demais sistemas formados por este sal o processo de transferência da betalaína não é espontâneo.

**Tabela 2.** Parâmetros termodinâmicos médios obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de sódio.

<b>PEG 1500 + Sulfato de sódio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$ (KJ/mol)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (5 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (5 °C)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (25 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (25 °C)
<b>27,17</b>	22,7	0,12	81,19	1,62	70,70
<b>28,77</b>	15,7	-0,16	57,00	1,35	48,13
<b>30,42</b>	7,45	-0,53	28,70	1,03	21,53
<b>PEG 4000 + Sulfato de sódio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$
<b>28,56</b>	49,37	2,86	167,20	1,35	161,06
<b>32,60</b>	16,94	2,24	52,86	1,22	52,71
<b>36,89</b>	44,60	1,60	154,58	1,18	145,61

Para os sistemas formados por sulfato de lítio, o processo de transferência do corante é exotérmico tanto para PEG 1500 quanto para PEG 4000. No caso de sistemas formados por PEG 4000, à medida que o CLA aumenta, este processo libera mais energia na forma de calor ( $\Delta_{tr}H < 0$ ). Com o aumento do CLA, a concentração de PEG 4000 na fase superior aumenta, favorecendo a formação de mais interações PEG-corante nesta fase e de íon-água e água-água na fase inferior, liberando um conteúdo de energia maior, em módulo, do que aquele gasto para romper interações íon-corante e corante-água na fase inferior e PEG-água e PEG-íon na fase superior.

Em sistemas formados por PEG 1500 e sulfato de lítio, o processo passou de espontâneo a não espontâneo quando a temperatura aumento de 5 para 25 °C, sendo o processo dirigido entalpicamente (Tabela 3).

**Tabela 3.** Parâmetros termodinâmicos médios obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de lítio.

<b>PEG 1500 + Sulfato de Lítio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$ (KJ/mol)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (5 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (5 °C)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (25 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (25 °C)
<b>39,98</b>	-80,18	-1,50	-282,88	4,12	-282,73
<b>42,48</b>	-75,53	-1,76	-265,22	3,44	-264,85
<b>45,02</b>	-74,16	-2,26	-258,49	2,60	-257,46
<b>PEG 4000 + Sulfato de Lítio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$
<b>42,82</b>	-4,68	-0,42	-15,31	-0,10	-15,37
<b>45,62</b>	-16,10	-0,71	-55,33	0,40	-55,35
<b>48,41</b>	-27,97	-1,06	-96,75	0,85	-96,66

Em sistemas formados pelo sal fosfato de potássio (Tabela 4), o processo de transferência é favorecido entalpicamente e desfavorecido do ponto de vista entrópico. Essa diminuição da entropia de transferência do corante está em acordo com o modelo de Haynes devido ao resultado da maior densidade numérica de partículas da fase inferior em relação à superior.

**Tabela 4.** Parâmetros termodinâmicos médios obtidos pela equação de Van't Hoff para a transferência da betalaína nos SABs formados por PEG 1500, PEG 4000 e fosfato de potássio.

<b>PEG 1500 + Fosfato de Potássio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$ (KJ/mol)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (5 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (5 °C)	$\Delta_{tr}G$ (KJ/mol) (25 °C)	$\Delta_{tr}S$ J/(mol.K) (25 °C)
<b>37,57</b>	-50,73	-2,81	-172,28	0,55	-172,00
<b>40,60</b>	-49,50	-3,03	-167,06	0,23	-166,81
<b>43,58</b>	-43,61	-3,04	-145,84	-0,19	-145,63
<b>PEG 4000 + Fosfato de Potássio</b>					
<b>CLA</b>	$\Delta_{tr}H$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$	$\Delta_{tr}G$	$\Delta_{tr}S$
<b>47,33</b>	-2,01	0,12	-7,65	0,29	-7,71
<b>49,69</b>	-3,63	-0,26	-12,11	-0,05	-12,01
<b>52,05</b>	-4,51	-0,70	-13,72	-0,41	-13,75

#### 5.4 – PARTIÇÃO DA CLOROFILA

Para a partição do corante comercial de clorofila, foram utilizados os polímeros PEG 1500 e PEG 4000, os sais citrato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de lítio e fosfato de potássio, nas temperaturas de 5, 25 e 45 °C.

**Tabela 5.** Coeficiente de partição da clorofila para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e citrato de sódio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000
1	-	*	9,01	*	18,97	33,71
2	-	*	15,27	63,05	19,44	20,32
3	-	26,59	20,92	24,03	26,62	19,44
4	-	11,21	15,68	18,61	28,04	81,57
5	-	*	*	23,74	20,98	87,32

Os valores que apresentam um asterisco (\*) correspondem a uma partição total para a fase superior.

**Tabela 6.** Coeficiente de partição da clorofila para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de sódio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000
1	4,36	7,54	3,86	42,84	-	6,66
2	*	16,59	33,04	64,84	-	36,20
3	*	28,39	172,35	67,33	-	43,82
4	*	144,12	111,16	458,79	-	*
5	*	*	5,00	*	-	244,09

Os valores que apresentam um asterisco (\*) correspondem a uma partição total para a fase superior.

**Tabela 7.** Coeficiente de partição da clorofila para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e sulfato de lítio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000
1	-	*	-	2,42	10,39	-
2	16,21	*	11,28	12,10	12,88	36,00
3	21,35	27,41	*	24,79	13,52	45,40
4	23,31	8,52	*	*	14,73	47,99
5	39,66	7,64	*	14,48	10,74	30,41

Os valores que apresentam um asterisco (\*) correspondem a uma partição total para a fase superior.

**Tabela 8.** Coeficiente de partição da clorofila para os sistemas formados por PEG 1500, PEG 4000 e fosfato de potássio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000	PEG 1500	PEG 4000
1	*	7,05	2,63	24,33	-	48,77
2	*	5,72	35,28	184,22	*	92,44
3	*	502,58	158,05	*	*	*
4	22,90	*	108,73	*	560,23	*
5	*	*	5,11	*	143,50	*

Os valores que apresentam um asterisco (\*) correspondem a uma partição total para a fase superior.

Os resultados obtidos com a partição da clorofila mostram que, em todos os sistemas e temperaturas trabalhados, o corante se concentrou na fase superior, ou seja, na fase polimérica.

Termodinamicamente, pode-se dizer que a força motriz que rege a partição deste corante é a entalpia.

## 5.4.1 – Caracterização dos extratos de clorofila

### 5.4.1.1 – Físico-química

Os teores de clorofilas a, b e totais dos extratos estudados são mostrados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores médios de pH e clorofilas A, B e totais ( $\mu\text{g/g}$  de espinafre).

<b>Solvente</b>	<b>pH</b>	<b>Clorofila A (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Clorofila B (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Clorofilas totais (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<b>Etanol 92,8%</b>	7,33 <sup>d</sup>	280,9 <sup>b</sup>	100,4 <sup>abc</sup>	381,2 <sup>b</sup>
<b>Etanol 70%</b>	7,73 <sup>b</sup>	243,1 <sup>b</sup>	89,6 <sup>bc</sup>	332,6 <sup>b</sup>
<b>Metanol</b>	7,87 <sup>a</sup>	398,4 <sup>a</sup>	131,43 <sup>ab</sup>	529,7 <sup>a</sup>
<b>Metanol 70%</b>	7,66 <sup>c</sup>	40,4 <sup>d</sup>	27,61 <sup>d</sup>	68,0 <sup>d</sup>
<b>Acetona</b>	7,06 <sup>e</sup>	431,9 <sup>a</sup>	151,4 <sup>a</sup>	583,1 <sup>a</sup>
<b>Acetona 70%</b>	7,3 <sup>d</sup>	164,3 <sup>c</sup>	64,63 <sup>cd</sup>	228,9 <sup>c</sup>

Os valores representam a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

O teor de clorofilas encontrado nos extratos provenientes do espinafre foi suficientemente alto para considerá-lo fonte viável deste pigmento. O solvente acetona mostrou ser o extrator de clorofila mais eficiente, confirmando estudos de Arnon (1949) e Porra (2002), não tendo apresentado a 70% o mesmo desempenho. Em geral, os solventes utilizados a 70% obtiveram valores mais baixos nas três determinações de clorofila, sugerindo redução da eficiência da extração com a adição de água.

Os valores encontrados de pH nos extratos estão dentro da faixa esperada para uma adequada estabilidade, principalmente das clorofilas a e b (KOCA; KARADENIZ; BURDURLU, 2006). Segundo estes autores, a diminuição do pH aumenta a taxa de degradação desses pigmentos, sendo que em valores próximos a pH 7,5, a taxa de degradação é menor quando

comparada a valores mais baixos, mesmo quando são utilizadas altas temperaturas (70-80°C).

#### 5.4.1.2 – Análise de cor

De acordo com Guimarães (2004), a cor é definida por três características: a matiz ou tonalidade ( $h^*$ ), o brilho ou luminosidade ( $L^*$ ) e a saturação ou croma ( $C^*$ ). A tonalidade é uma grandeza que caracteriza a qualidade da cor, permitindo que as cores sejam diferenciadas. A luminosidade é o parâmetro que caracteriza o grau de claridade da cor, indicando se as cores são claras ou escuras ( $L^* = 0$ , preto a 100, branco). Já a saturação, também chamada de pureza ou croma, descreve a intensidade ou quantidade de uma tonalidade, indicando a proporção em que ela está misturada com o preto, branco ou cinza, permitindo diferenciar cores fortes de fracas (PONTES, 2004).

A Tabela 10 apresenta os valores referentes à cor dos extratos. Observa-se que os extratos apresentaram valores que retratam as cores verde e amarela. Este fato é explicado pelos valores negativos de  $b^*$ , indicando que tais valores se aproximaram mais do eixo da cromaticidade do verde, e que os valores positivos de  $a^*$  se aproximaram mais do eixo da cromaticidade do amarelo. O valor de  $a^*$  corresponde a (-) verde/vermelho (+); e o valor de  $b^*$  corresponde (-) azul/amarelo (+) (Figura 6).

**Tabela 10.** Valores médios de L\*, a\*, b\*, h\* e C\*.

<b>Solvente</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>h*</b>	<b>C*</b>
<b>Etanol 92,8%</b>	52,23 <sup>c</sup>	-32,96 <sup>b</sup>	38,80 <sup>a</sup>	139,65 <sup>c</sup>	50,91 <sup>a</sup>
<b>Etanol 70%</b>	56,81 <sup>bc</sup>	-29,02 <sup>b</sup>	42,66 <sup>a</sup>	145,77 <sup>bc</sup>	51,59 <sup>a</sup>
<b>Metanol</b>	56,81 <sup>bc</sup>	-26,78 <sup>b</sup>	45,16 <sup>a</sup>	149,33 <sup>b</sup>	52,50 <sup>a</sup>
<b>Metanol 70%</b>	69,61 <sup>a</sup>	-15,88 <sup>a</sup>	43,35 <sup>a</sup>	159,88 <sup>a</sup>	46,17 <sup>b</sup>
<b>Acetona</b>	51,96 <sup>c</sup>	-27,07 <sup>b</sup>	38,99 <sup>a</sup>	145,23 <sup>bc</sup>	47,46 <sup>b</sup>
<b>Acetona 70%</b>	57,59 <sup>b</sup>	-30,03 <sup>b</sup>	44,50 <sup>a</sup>	145,98 <sup>bc</sup>	53,68 <sup>a</sup>

Os valores representam a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

A coordenada L\*, que mostra quão mais clara ou mais escura é a amostra, apresentou valores de L\* correspondentes a cores mais claras, com ênfase no extrato obtido de metanol 70%, que é o extrato mais claro e com menor teor de clorofilas. É possível ainda relacionar os valores obtidos de a\* com a quantidade de clorofila extraída. O extrato obtido pela extração de metanol a 70% apresentou menores valores de clorofilas e valores menos negativos de a\*, indicando a cor verde menos acentuada.

O croma (C\*) é definido pela distância de h ao centro do diagrama tridimensional, sendo o zero no centro e aumentando de acordo com a distância (Figura 6). Um maior valor de c\* indica uma maior pureza ou intensidade da cor. Apesar de estatisticamente diferentes, todos os extratos avaliados obtiveram valores elevados para este parâmetro, indicando possuir cores mais brilhantes e saturadas.

O parâmetro h\* mostra a localização da cor em um diagrama, em que o ângulo 0° representa o vermelho puro; o 90°, o amarelo puro; o 180°, o verde puro; e o 270°, o azul puro (Figura 6). Os dados referentes a este parâmetro indicam que os extratos avaliados estão localizados entre o amarelo e o verde, como esperado, mediante os valores de a\* e b\*.

#### 5.4.1.3 – Avaliação antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos, foram realizadas as análises de ABTS e DPPH, além da determinação de fenólicos totais. Os valores estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Valores das análises de atividade antioxidante e fenólicos totais.

<b>Sovente</b>	<b>ABTS</b> ( $\mu\text{M/g}$ )	<b>DPPH</b> ( $\mu\text{M/g}$ )	<b>Fenólicos totais</b> (mg AGE/100g)
<b>Etanol 92,8%</b>	4,63 <sup>c</sup>	1,26 <sup>e</sup>	157,66 <sup>a</sup>
<b>Etanol 70%</b>	4,87 <sup>c</sup>	1,17 <sup>f</sup>	149,1 <sup>c</sup>
<b>Metanol</b>	6,72 <sup>b</sup>	2,49 <sup>c</sup>	155,94 <sup>b</sup>
<b>Metanol 70%</b>	8,35 <sup>a</sup>	2,67 <sup>b</sup>	121,46 <sup>e</sup>
<b>Acetona</b>	5,6b <sup>c</sup>	1,62 <sup>d</sup>	139,71 <sup>d</sup>
<b>Acetona 70%</b>	8,29 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	151,09 <sup>bc</sup>

Os valores representam a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ).

Os valores obtidos com o ensaio TEAC do teste ABTS foram menores que os obtidos por Murcia e colaboradores (2009) em água, o que pode explicar os maiores valores obtidos em extratos aquosos de metanol e acetona.

Os resultados obtidos com o teste do DPPH confirmam o trabalho desenvolvido por Arabshahi-Delouee e Urooj (2007), que pesquisaram a influência do tipo do solvente na análise antioxidante de extratos de amora. Eles também obtiveram maiores valores com metanol, seguido de acetona e água. Para os extratos de espinafre, os maiores valores obtidos foram com metanol, seguido de acetona e etanol. A porcentagem aquosa nos extratos proporcionou mudanças nos valores, estatisticamente, porém não alterando a ordem do solvente.

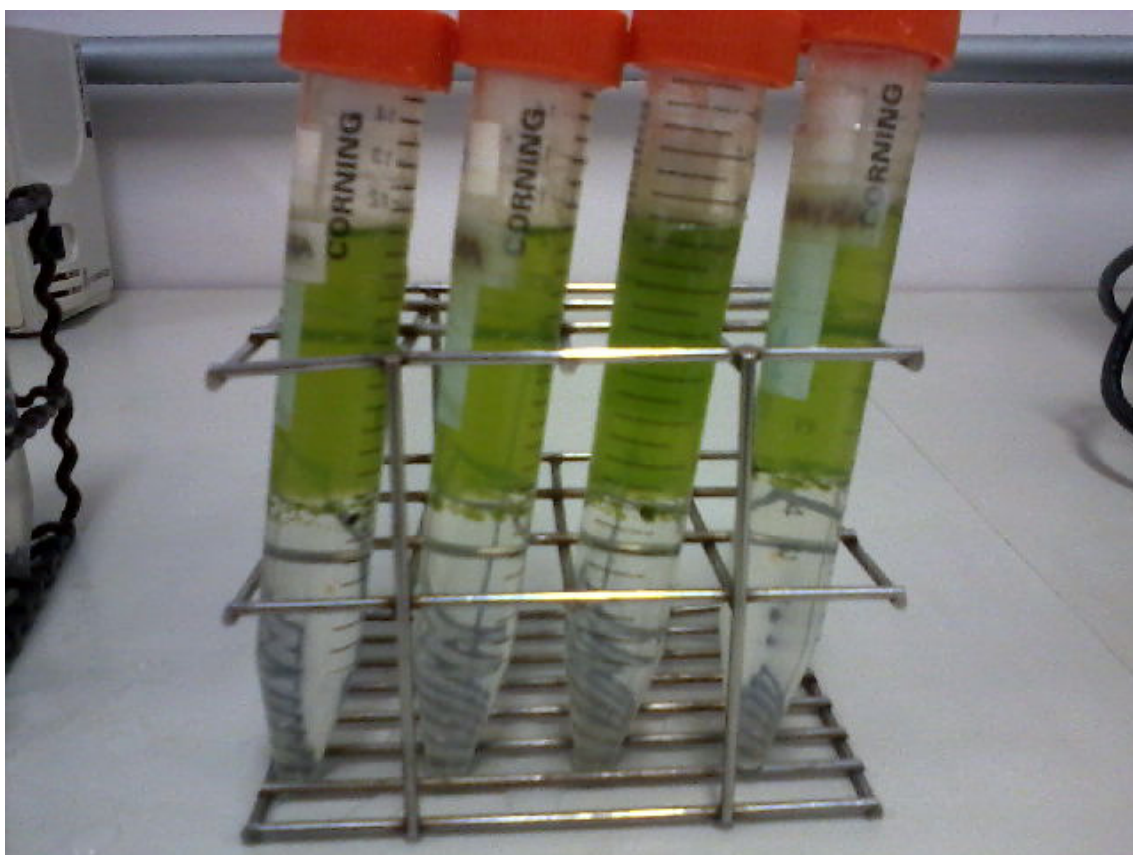
Os maiores valores de fenólicos totais podem ser explicados, pois o método empregado para esta análise pode ter determinado frações que os

métodos de antioxidante não determinaram. Os valores encontrados foram, inclusive, maiores que os encontrados por Isabelle e colaboradores (2010).

#### 5.4.2 – Coeficientes de partição do extrato de espinafre

O extrato utilizado para a partição do extrato de clorofila em sistema aquoso bifásico foi o obtido com o solvente etanol 92,8%. A escolha foi função da toxicidade do solvente e também das análises de cor e fenólicos totais.

Os sistemas utilizados para a partição do extrato foram compostos por PEG 1500 e sulfato de lítio a 25°C, PEG 1500 e fosfato de potássio a 5°C e PEG 1500 e sulfato de sódio a 5°C. Os sistemas foram escolhidos pelos resultados de partição obtidos com o corante comercial.



**Figura 28.** Partição do extrato de espinafre.

Os resultados da partição dos extratos de clorofila podem ser vistos na Tabela 12. É possível perceber que a partição foi total para a fase superior para

a maioria dos CLAs dos sistemas empregados, como é possível observar na Figura 28.

**Tabela 12.** Coeficiente de partição do extrato de clorofila

PONTO GLOBAL	T = 278,2K	T = 278,2K	T = 298,2K
	PEG 1500 +	PEG 1500 +	PEG 1500 +
	Sulfato de sódio	fosfato de potássio	sulfato de lítio
1	4,36	*	-
2	*	*	-
3	*	*	*
4	*	*	*
5	*	*	*

Os valores que apresentam um asterisco (\*) correspondem a uma partição total para a fase superior.

Este resultado, em comparação com os obtidos pela clorofila comercial, sugere que o átomo central da molécula de clorofila exerce uma grande influência sobre o processo de partição do soluto. Trabalhos anteriores já verificaram este tipo de comportamento (DA SILVA et al., 2008), quando foi estudado o comportamento da partição de um ânion complexo com a modificação do seu centro metálico.

## 6 – CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, concluiu-se que o uso de sistemas aquosos bifásicos na extração dos corantes betalaína e clorofila mostrou-se eficiente, nas condições trabalhadas, exceto para betalaína a 45°C, no qual o corante foi degradado.

Na extração de betalaína, um estudo termodinâmico da partição desse corante foi realizado com duas temperaturas. Assim, foi possível observar que

foram encontrados maiores valores de coeficiente de partição para sistemas formados por PEG 1500, em relação ao PEG 4000; houve aumento do  $K_p$  com o aumento do CLA para a maioria dos sistemas estudados, causando uma mudança na força motriz que rege a partição, de acordo com o modelo de Haynes. Observou-se ainda que para sistemas formados por PEG 1500 e todos os sais estudados, o processo de transferência do corante foi exotérmico. Em sistemas formados por PEG 4000 e citrato de sódio a 5°C e PEG 4000 e sulfato de lítio a 25°C, a componente entrópica prevaleceu em relação à entalpia.

Na extração da clorofila, foram observados altos valores de coeficiente de partição para vários CLAs dos sistemas estudados e, em muitos casos, a partição foi completa para a fase superior. No estudo de partição com extrato de clorofila de espinafre, constatou-se que a utilização do etanol 92,8% como solvente extrator foi a mais eficiente, apesar do metanol ter sido o solvente que mais extraiu clorofilas; pois apresentou cor verde mais acentuada, maior valor de fenólicos totais e possuir menor toxicidade. Na partição de extrato de clorofila houve partição completa dos extratos para a fase polimérica, sugerindo uma forte prevalência da componente entálpica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A . **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986. 346 p.

ALONSO, A.M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D.A.; BARROSO, C.G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method as its correlation with phenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.3112-3115, 2002.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo do equilíbrio líquido-líquido da partição de insulina e da pré-purificação da proteína de fusão precursora da insulina humana em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG/Sal**. 2003. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

AMIM JÚNIOR, J. **Efeito hifrofóbico de macromoléculas sobre a partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa/UFV, Viçosa, 50 p., 2006.

ARABSHAHI-DELOUSE, S.; UROOJ, A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L) leaves. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1233-1240, 2007.

ARGENTA, G.; DA SILVA, P. R.; BORTOLONI, C. G. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 158-167, 2001.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, n. 1, p.1-15, 1949.

ASENJO, J.A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 801p.,1990.

BAMBERGER, S.; BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; VAN ALSTINE, J. M.; WEBBER, T. J. "Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 32, p. 85-100, 1992.

BEIJERINCK, M. W. **Entralblatt Fur Bakteriologie-International Journal Of Medical Microbiology Virology Parasitology And Infectious Diseases**, v.627, p.698, 1896.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Introdução à química de alimentos. São Paulo: Editora Varela, 2ª edição, 223 p., 1989.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**, v.30, n.1, p.609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Aprova o Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para suplementos vitamínicos e ou minerais. Resolução RDC n°24, de 15 de fevereiro de 2005. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Diário Oficial da União*. Brasília, 16 de fevereiro de 2005.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4841-4844, 2001.

BROOKS D. E., SHARP K. A, FISHER D. **Theoretical Aspects of Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems**. IN: Protein Purification Process Engineering Ed. KUBEK, D. J., HARRISON, R. G. (Ed.), p. 89-114, 1994.

CABEZAS JR, H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 680, p. 3-30, 1996.

CARDOSO, M. V. C. **Efeito do centro metálico nas interações intermoleculares dos compostos  $[M(CN)_5NO]^{x-}$  com o poli(óxido de etileno) em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa/UFV, Viçosa, 77 p., 2007.

CARVALHO, C. **Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água**. Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2004.

CHETANA, S. NAYAK, C. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 679-687, 2007.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Xilanase Recovery. Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental desing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.629, p. 70-72, 1998.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylenolitic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.

DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.; FRANCISCO, K. R.; CARDOSO, M. V. C.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. PEO-[M(CN)<sub>5</sub>NO]<sup>x-</sup> (M = Fe, Mn, or Cr) interaction as a driving force in the partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: Strong effect of the central atom. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 11669-11678, 2008.

DA SILVA, L. H. M; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 10069-10073, 2000.

DA SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

DOBRY, A. **Bulletin des Societes Chimiques Belges**, v. 57, p. 280, 1948.

DOBRY, A.; BOYER-KAWENOKI, F. **Polymer Science**, v. 2, p. 90, 1947.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J.; GARCÍA-VIGUEIRA, C. . Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, p.1588-1592, 2000.

FARINA, M. **Psicodinâmica das cores em publicidade**. São Paulo : Edgard Blucher, 2<sup>a</sup> ed., 1975.

FORCINITI, D., HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p.243-262, 1991.

GHISELLI, A., SERAFINI, M.; NATELLA F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental date. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.11, p.1106-1114, 2000.

GIRALDO ZUÑIGA A.D. **Sistemas aquosos polietileno glicol-sal: Separação de  $\alpha$ -lactoglobulina e  $\beta$ -lactoglobulina do soro de queijo e hidrodinâmica em um extrator Graesser**. Dissertação Mestrado, UFV; Viçosa; 2000.

GOMIS, D.B.; PALOMINO, N.F.; ALONSO, J.J.M. Capillary liquid chromatographic determination of neutral phenolic compounds in apples juices. **Analytica Chimica Acta**, v. 426, p. 111-117, 2001.

GUIMARÃES, L. **A cor como informação: a construção biofísica, lingüística e cultural da simbologia das cores**. 3. ed. São Paulo: Annablume, 2004.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.255-258, 2000.

GUSTAFSSON, A.; WENNERSTRUM, H.; TJERNELD, F. Aqueous polymer two-phase systems in biotechnology. **Fluid Phase Equilibria**, v. 29, p. 365-371, 1986.

HATFIELD, J. L.; GITELSON, A. A.; SCHEPERS, J. S. Application os spectral remote sensing for agronomic decisions. **Agronomy Journal**, v. 100 (Supplement), p. 117-131, 2008.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems: A general overview. **Molecular Biotechnology**, v. 19, p. 269-277, 2001.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUSTED H.; CORNER K.H.; KULA, M.R. Partition in aqueous two-phase systems; **Trends Biotech**; 3; 139-144; 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. (Série A - Normas e Manuais Técnicos).

ISABELLE, M.; LEE, B. L.; LIM, M. T.; KOH, W. P.; HUANG, D.; ONG, C. N. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. **Food Chemistry**, v. 120, p. 993-1003, 2010.

JOHANSSON, G.; ANDERSON, M.; AKERLUND, H-E. Counter distribution of yeast enzymes with polymer-bound triazine dye affinity ligands. **Journal of Chromatography**, v.289, p.483-493, 1984.

JOHANSSON, H.O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F.; HAYNES, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 3-17, 1998.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5178-5185, 2001.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. **Food Chemistry**, n. 100, p. 609-615, 2006.

KUSKOSKI, E. M. ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 227-242, 2003.

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: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623-7629, 2009.

MERCK. Disponível em: <http://chemdat.merck.de>, abril, 2011.

MINOLTA. **Precise color communication: color control from perception to Instrumentation**. Japan: Minolta Co. Ltd., 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry – Review**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Vegetables antioxidante losses during industrial processing and refrigerated storage. **Food Research International**, v. 42, p. 1046-1052, 2009.

NACHAY, K. A new color palette emerges. **Food Technology**, v. 4, n. 9, p. 50-62, 2009.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexoquinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p. 787-797, 2003.

OLIVEIRA, L. A.; SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; TAMBOURGI, E. B. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**. v. 766, p. 27-36, 2001.

OLIVEIRA, R. M. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** Dissertação de Mestrado, UFV; Viçosa; 2006.

OSTWALD, W.; HERTEL, R. H. **Kolner Zeitschrift Fur Soziologie Und Sozialpsychologie**, v. 47,p. 258, 1929.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

PONTES, L.V. **Avaliação sensorial e instrumental da cor de misturas em pó para refresco, bebida isotônica e gelatina utilizando corantes naturais.** Viçosa, 2004, 97p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**, v. 73, p. 149-156, 2002.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

PUKALSKAS, A.; BEEK, T.A.V.; VENSKUTONIS, R.P.; LINSSEN, J.P.H.; VELDHUIZEN, A.V.; De GROOT, A. Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochioe odorata*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 50, p. 2914-2919, 2002.

RAMOS, E. M. ; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes : Fundamentos e metodologias.** Editora UFV : Viçosa, 299 p, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REH, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. **Journal of Chromatography B**, v. 780, p. 389-396, 2002.

RENAUD, S. C.; GUEGUEN, R.; SHENKER, J.; D´HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middled-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v. 9, p. 184-188, 1998.

RIBEIRO, M. Z. **Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, 138 p., 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAPAGANDA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RITCHIE, R. J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c* and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol or ethanol solvents. **Photosynthetica**, v. 46, p. 115-126, 2008.

SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**, v. 187–188, p. 489–498, 2001.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophylls in Foods. **Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 1, 1990.

SIGMA-ALDRICH; Catálogo 2001.

SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 57 p., 2007.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., AND LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 514-525, 2007.

STINTZING, F. C.; TRICHTERBORN, J.; CARLE, R. Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. **Analytical, Nutritional and Clinical Methods**, v. 94, p. 296-309, 2006.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, n. 3, p. 247-269, 2003.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

STRINGHETA, P. C.; VOLP, A. C. P.; OLIVEIRA, T. T. In: Alimentos Funcionais: Benefícios para a Saúde. Ed.: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Viçosa, 2008.

TABOADA, M. E. Liquid–liquid and solid–liquid equilibrium of the 1-propanol+ lithium sulfate + water system at 25, 35 and 45 °C. **Fluid Phase Equilibria**, v. 5111, p. 1–11. 2002.

TJERNELD, F.; PERSSON, I.; ALBERTSSON, P-A. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous two-phase systems. Partition of cellulases from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p. 1036-1043, 1985.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

VERLANGIERI, A. J.; KAPEGHIAN, J. C.; EL-DAN, S.; BUSH, M. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. **Medical Hypotheses**, v. 16, n. 1, p. 7-15, 1985.

VON ELBE, J. H., Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los Alimentos**. Zaragoza: Wisconsin. 2ª edição. Cap. 10, p. 782-799, 2000.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**. New York: Marcel Decker, 1995. 696 p.

## ANEXO I

### Composições globais para os sistemas utilizados

**Tabela 1.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500 + fosfato de potássio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	15,85	10,60	15,02	9,95	15,44	10,70
2	17,11	12,07	15,97	11,27	16,32	11,52
3	17,86	13,19	16,96	11,97	17,55	12,50
4	19,60	14,85	17,96	13,01	18,69	13,71
5	20,84	16,39	19,32	14,00	19,67	16,12

**Tabela 2.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000 + fosfato de potássio.

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	17,31	9,5	17,56	9,49	16,65	8,65
2	19,31	10,36	20,17	10,67	18,60	9,84
3	21,48	11,6	21,90	11,54	20,54	10,63
4	23,52	12,81	23,34	12,49	23,11	12,01
5	25,21	13,77	25,52	13,65	24,50	12,52

**Tabela 3.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500 + citrato de sódio

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	18,34	10,68	18,32	12,01	18,34	12,00
2	20,39	11,57	20,24	12,99	20,22	12,98
3	22,45	12,55	22,26	14,01	22,26	14,00
4	24,52	13,45	24,25	14,97	24,25	14,96
5	26,26	14,17	26,34	16,02	26,31	15,99

**Tabela 4.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000 + citrato de sódio

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	18,32	10,67	18,29	12,02	18,31	12,00
2	20,37	11,57	20,20	12,99	20,24	13,00
3	22,43	12,56	22,21	14,01	22,25	14,05
4	24,50	13,45	24,16	14,97	24,24	14,96
5	26,24	14,17	26,29	16,02	26,33	16,03

**Tabela 5.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500 + sulfato de sódio

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	11,07	8,99	9,98	9,58
2	11,65	9,25	11,28	10,48
3	12,26	9,50	12,48	11,58
4	12,77	9,77	13,79	12,88
5	13,49	9,99	15,01	13,59

**Tabela 6.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000 + sulfato de sódio

PONTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	8,61	8,02	8,74	7,65	19,28	6,60
2	11,27	9,02	11,13	9,12	22,43	7,33
3	12,37	9,99	12,80	10,05	24,90	7,87
4	14,86	10,95	14,98	10,40	28,14	8,58
5	17,17	10,81	17,23	11,08	33,31	9,89

**Tabela 7.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 1500 + sulfato de lítio

PUNTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	20,77	9,17	19,96	9,14
2	21,54	9,75	21,93	9,61
3	23,34	10,73	22,21	10,76
4	24,58	11,69	23,44	11,61
5	25,80	12,53	24,56	12,41

**Tabela 8.** Composições globais para os sistemas formados por PEG 4000 + sulfato de lítio

PUNTO GLOBAL	T = 278,2K		T = 298,2K		T = 318,2K	
	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)	Polímero/ (% m/m)	Sal/ (%m/m)
1	23,73	7,45	23,05	7,36	21,67	6,98
2	24,86	8,25	24,65	8,15	23,00	7,30
3	27,29	9,21	26,99	9,00	24,55	8,24
4	29,57	10,02	28,85	9,92	25,96	9,06
5	31,30	10,12	32,58	10,71	27,69	9,64

## ANEXO II

### Valores de CLA (% m/m) calculados para os sistemas utilizados

**Tabela 9.** Valores de CLA (% m/m) calculados para SABs formados por PEG 1500 e diferentes sais a 5°C.

<b>PEG 1500</b>				
	<b>Citrato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Lítio</b>	<b>Fosfato de Potássio</b>
<b>1</b>	23,14	17,40	31,10	26,89
<b>2</b>	31,51	21,20	35,51	35,19
<b>3</b>	38,83	25,75	44,56	37,25
<b>4</b>	43,18	29,51	48,29	44,20
<b>5</b>	46,09	30,64	50,98	51,89

**Tabela 10.** Valores de CLA (% m/m) calculados para SABs formados por PEG 1500 e diferentes sais a 25°C.

<b>PEG 1500</b>				
	<b>Citrato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Lítio</b>	<b>Fosfato de Potássio</b>
<b>1</b>	28,91	26,79	29,35	19,67
<b>2</b>	39,22	29,74	37,57	31,55
<b>3</b>	42,15	35,12	42,79	34,86
<b>4</b>	45,96	38,36	48,42	40,22
<b>5</b>	48,06	44,26	51,87	44,41

**Tabela 11.** Valores de CLA (% m/m) calculados para SABs formados por PEG 4000 e diferentes sais a 5°C.

<b>PEG 4000</b>				
	<b>Citrato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Lítio</b>	<b>Fosfato de Potássio</b>
<b>1</b>	32,59	17,73	31,70	32,47
<b>2</b>	39,61	27,46	35,03	37,09
<b>3</b>	45,33	32,83	44,96	43,77
<b>4</b>	50,26	38,00	45,04	51,59
<b>5</b>	53,70	42,71	52,73	54,13

**Tabela 12.** Valores de CLA (% m/m) calculados para SABs formados por PEG 4000 e diferentes sais a 25°C.

<b>PEG 4000</b>				
	<b>Citrato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Sódio</b>	<b>Sulfato de Lítio</b>	<b>Fosfato de Potássio</b>
<b>1</b>	41,48	16,16	35,08	33,61
<b>2</b>	45,42	29,89	41,06	42,02
<b>3</b>	50,93	34,93	45,81	46,58
<b>4</b>	55,42	38,08	46,96	49,44
<b>5</b>	60,71	44,16	53,22	55,43