



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS FORMADOS POR ETANOL E SULFATO DE AMÔNIO**

BELÉM-PARÁ

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ADRIANE ROSÁRIO DO LAGO

**EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS DO AÇAÍ (*Euterpe oleracea*) EM SISTEMAS AQUOSOS
BIFÁSICOS FORMADOS POR ETANOL E SULFATO DE AMÔNIO**

Dissertação parcial apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Geormenny Rocha dos Santos

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Nádia Cristina Fernandes Corrêa

BELÉM-PARÁ

2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

L177e Lago, Adriane Rosário do.
Extração de antocianinas do açaí (*Euterpe oleracea*) em sistemas aquosos bifásicos formados por etanol e sulfato de amônio / Adriane Rosário do Lago. — 2017.
57 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Geormenny Rocha dos Santos
Coorientação: Prof^a. Dra. Nádia Cristina Fernandes Corrêa
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2017.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Antocianinas. 3. *Euterpe oleracea*. I. Título.

CDD 664.022

ADRIANE ROSÁRIO DO LAGO

Extração de antocianinas do açaí (*Euterpe oleracea*) em sistemas aquosos bifásicos formados por etanol e sulfato de amônio

Dissertação parcial apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora

Profa. Dra. Geormenny Rocha dos Santos

Data da Avaliação: ____/____/____

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Geormenny Rocha dos Santos
(FEA/ITEC/UFPA – Orientadora)

Profa. Dra. Nádia Cristina Fernandes Corrêa
(FEA/ITEC/UFPA – Co-orientadora)

Profa. Dra. Luiza Helena Meller da Silva
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Profa. Dra. Silvana Mattedi e Silva
(FEQ/UFBA – Membro Externo)

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno/Suplente)

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(FEA/ITEC/UFPA – Membro Interno /Suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Heliana, e minha avó Domingas que sempre estiveram comigo, me dando apoio e por serem exemplo de força, determinação e honestidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas bênçãos e por sempre me dar força e sabedoria ao longo de toda minha trajetória.

Aos meus pais Heliana Lago e João Lago por todo apoio, amor e carinho durante todos os momentos. Ao meu irmão e familiares pelo carinho e companheirismo de sempre. A minha avó Domingas Lago por todo amor e por todas as orações que fez em meu nome.

A minha orientadora, Profa. Dra. Geormenny dos Santos, pelos conhecimentos que me foram passados, pelas palavras que me serviram de apoio e incentivo, pela confiança e oportunidade para conclusão deste trabalho, meu muito obrigada.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Nádia Corrêa, por todo apoio, dedicação e sugestões. Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Luiza Helena Meller da Silva e Profa. Dra. Silvana Mattedi e Silva pelas contribuições e sugestões.

Aos Laboratório de Operações de Separação (LAOS) e Laboratório de Equilíbrio de fases (LEF), pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos meus amigos da graduação e da pós-graduação, Elaine Souza, Carla Ramos, Gyorgy Ferreira, Cesar Mesquita, Paulo Chada, Renan Tupinambá, Karina Rodrigues, Sara Monteiro, Ramon Barros e Tassio Gama. E em especial, aos meus queridos amigos Jaqueline Moraes e Rogério Vieira, pela amizade, carinho e estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao meu namorado, Diego Ribeiro, por toda dedicação, carinho e incentivo. A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A *Euterpe oleracea* é uma espécie vegetal que ocorre naturalmente na região amazônica, sendo conhecida como açaizeiro. Seu fruto é considerado um alimento funcional devido o alto teor em compostos fenólicos, principalmente antocianinas, o que confere ao fruto alto poder antioxidante. Além disso, apresenta elevado valor nutritivo apresentando em sua composição fibras, proteínas, vitaminas e minerais. Neste estudo foi aplicada a técnica de extração por Sistema Aquoso Bifásico (SAB) para o estudo da partição das antocianinas presentes no extrato aquoso do açaí. Foi utilizado o extrato alcoólico de açaí para o estudo da estabilidade das antocianinas em diferentes soluções de sais e álcool, onde o extrato apresentou 718,32 mg/L de antocianinas. Foram preparados SABs com sulfato de amônio, etanol e água a 25 e 35 °C. No processo de extração da antocianina via SAB verificou-se o efeito do pH, temperatura e tempo de extração. A melhor condição de extração foi em pH 3,4 a 33 °C durante 30 minutos. O melhor coeficiente de partição obtido foi igual a 2.70, indicando a afinidade do composto estudado pela fase superior do SAB. O processo de extração utilizado neste estudo foi mais eficiente que a técnica analítica de quantificação de extração de antocianinas que é usada convencionalmente.

Palavras-chave: *Euterpe oleracea*, antocianinas, sistemas aquosos bifásicos.

ABSTRACT

Euterpe oleracea is a plant species that occurs naturally in the Amazon region, known as açai. Its fruit is considered a functional food due to the high content of phenolic compounds, mainly anthocyanins, which gives the fruit high antioxidant power. In addition, it presents high nutritional value presenting in its composition fibers, proteins, vitamins and minerals. In this study the technique of extraction by Aqueous Two-Phase System (ATPS) was applied to the study of the partition of the anthocyanins present in the aqueous extract of açai. The alcoholic extract of açai was used to study the stability of anthocyanins in different solutions of salts and alcohol, where the extract had 718.32 mg/L of anthocyanins. ATPS were prepared with ammonium sulfate, ethanol and water at 25 and 35 ° C. In the process of extraction of anthocyanin by ATPS was verified the effect of pH, temperature and time of extraction. The best anthocyanin extraction condition was pH 3.4 at 33 °C for 30 min. The best partition coefficient obtained was 2.70, indicating the affinity of the compound studied for the top phase of ATPS. The extraction process used in this study was more efficient than the conventionally used analytical quantification technique for anthocyanin extraction.

Keywords: *Euterpe oleracea*, anthocyanins, aqueous two-phase extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos do açaí no cacho.....	11
Figura 2. Estrutura básica da aglicona.....	15
Figura 3. Estrutura das principais antocianidinas encontradas na natureza: (a) cianidina, (b) delphinidina, (c) pelargonidina, (d) peonidina, (e) petunidina e (f) malvidina.....	16
Figura 4. Formas estruturais das antocianinas em função do pH.....	17
Figura 5. Diagrama de fases em coordenadas triangulares.....	21
Figura 6. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.....	21
Figura 7. Equilíbrio líquido-líquido ternário: (a) formação de um par de líquidos parcialmente miscíveis – Tipo 1, (b) formação de dois pares de líquidos parcialmente miscíveis, (c) formação de três pares de líquidos parcialmente miscíveis e (d) formação de fases sólidas.....	23
Figura 8. Curva binodal do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C.....	36
Figura 9. Curva binodal do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C.....	36
Figura 10. Curva de calibração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C.....	37
Figura 11. Curva de calibração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C.....	37
Figura 12. Linhas de amarração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C.....	41
Figura 13. Linhas de amarração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C.....	41
Figura 14. Método de Othmer e Tobias e Hand aplicados aos dois sistemas de etanol, sulfato de amônio e água.....	42
Figura 15. Concentração de antocianinas na fase superior extraídas do açaí via SAB.....	43
Figura 16. Coeficiente de partição de antocianinas no processo de extração via SAB.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de frutos de açaí no Brasil no ano de 2013.....	12
Tabela 2. Comercialização da polpa de açaí para o Mercado Externo no ano de 2014.....	12
Tabela 3. Ensaio de extrações de antocianinas do açaí via SAB	30
Tabela 4. Composição centesimal e teor de antocianinas da casca de açaí.....	32
Tabela 5. Antocianinas Totais (AT) e Potencial Hidrogeniônico (pH) dos extratos da polpa de açaí.....	33
Tabela 6. Conservação das antocianinas em soluções de sulfato de amônio	34
Tabela 7. Conservação das antocianinas em soluções de fosfato de potássio monobásico.....	34
Tabela 8. Conservação das antocianinas em soluções de sulfato de sódio.....	35
Tabela 9. Conservação das antocianinas em soluções de álcool etílico.....	35
Tabela 10. Composição global das linhas de amarrações e massa específica das fases superior e inferior do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C.....	38
Tabela 11. Composição global das linhas de amarrações e massa específica das fases superior e inferior do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C.....	39
Tabela 12. Frações mássicas das linhas de amarrações do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C.....	39
Tabela 13. Frações mássicas das linhas de amarrações do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C.....	40
Tabela 14. Comprimento e inclinação das linhas de amarrações, e diferença de massa específica (ρ) entre as fases	40
Tabela 15. Parâmetros e coeficientes de correlação (R^2) das equações de Othmer & Tobias e Hand aplicados aos sistemas a 25 e 35 °C.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 EUTERPE OLERACEA.....	11
3.2 ANTIOXIDANTES.....	13
3.3 ANTOCIANINAS.....	14
3.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS.....	18
3.5 SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB).....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASCA DO AÇAÍ	26
4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DE POLPA DE AÇAÍ E ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	26
4.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs).....	28
4.3.1 Curva Binodal.....	28
4.3.2 Curva de Calibração.....	28
4.3.3 Determinação das linhas de amarração - Tie lines.....	29
4.3.4 Determinação dos parâmetros de equilíbrio.....	30
4.5 EXTRAÇÃO DA ANTOCIANINA.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO DO AÇAÍ	32
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ E ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	32
5.3 CURVA BINODAL E DADOS DE EQUILÍBRIO	36
5.3.1 Curva Binodal.....	36
5.3.2 Curva de calibração.....	37
5.3.3 Linhas de amarrações (LAs).....	38
5.3.4 Parâmetros de Equilíbrio.....	40
5.4 EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO AÇAÍ.....	43
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia possui uma ampla biodiversidade, apresentando variadas espécies de frutas nativas e exóticas, ricas em compostos bioativos, cuja exploração racional contribui para o desenvolvimento sustentável da região. Em virtude disso, diversas espécies vegetais têm sido estudadas devido ao alto teor em compostos fenólicos, entre elas destaca-se a *Euterpe oleracea* (SILVA; ROGEZ, 2013).

A espécie vegetal *Euterpe oleracea*, mais conhecida como açazeiro, ocorre naturalmente na região Amazônica, tendo uma ampla distribuição na floresta de várzea. Seu fruto (açai) é bastante consumido na região e apreciado por apresentar componentes com potencial antioxidante, prevenindo doenças degenerativas (BERNAUD; FUNCHAL, 2011).

A polpa do açai possui vários fitoquímicos, os mais predominantes são as antocianinas, proantocianidina e outros flavonóides. Além desses pigmentos, sua composição em compostos fenólicos contribui para seu alto poder antioxidante.

A extração de compostos antioxidantes é realizada usando geralmente solventes orgânicos, onde parâmetros tais como o tipo e volume de solvente, temperatura e tempo têm uma influência significativa sobre o processo de extração (PEDRO; GRANATO; ROSSO, 2016).

Alguns fatores como tempo, toxicidade e baixa eficiência tem limitado a aplicação da técnica convencional de extração por solvente, promovendo a busca por tecnologias mais eficientes e ambientalmente amigáveis. Algumas técnicas modernas têm recebido destaque, como extração assistida por ultra-som, extração assistida por microondas e alta pressão por CO₂, no entanto são técnicas que necessitam de equipamentos especiais, apresentando custo mais elevado (WU et al, 2014).

A remoção de compostos bioativos utilizando Sistema Aquoso Bifásico tem recebido grande destaque, por ser uma técnica de extração com diversas vantagens, dentre elas a principal é proporcionar um meio neutro e não tóxico com condições adequadas à partição de biomoléculas, conservando a atividade biológica do composto de interesse (WU et al, 2014).

O estudo do tipo de sistema e variáveis de processo, tais como, temperatura, pH e tempo são necessários para avaliação da eficiência de extração e seletividade em relação ao composto de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extração de antocianinas do fruto do açaí a partir do sistema aquoso bifásico constituído de álcool e sal nas temperaturas de 25 e 35 °C.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a casca do açaí, obter e caracterizar os extratos de antocianina do açaí;
- Avaliar a estabilidade da antocianina do extrato de açaí em diferentes concentrações de soluções de álcool etílico, sulfato de amônio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de sódio.
- Determinar os dados de equilíbrio do sistema composto por etanol e sulfato de amônio nas temperaturas de 25 e 35 °C;
- Estudar a influência das condições de processo na extração de antocianinas através do sistema aquoso bifásico e determinar as melhores variáveis de processo, tais como temperatura, tempo e pH nos sistemas propostos, analisando a concentração de antocianinas totais e coeficiente de partição;

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 EUTERPE OLERACEA

O açaizeiro (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira tropical que se desenvolve naturalmente na região amazônica, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá (ROCHA et al., 2007; GORDON et al., 2012).

No Brasil a produção de açaí, fruto da *Euterpe oleracea*, vem aumentando progressivamente nas últimas décadas dentro das várzeas da região amazônica, este aumento tem sido associado ao manejo das plantas da palmeira, assim como também ao aumento das áreas de cultivo (MAPA, 2015).

Os frutos da palmeira são produzidos em cachos a partir do terceiro ano da árvore. Cada fruta é uma pedra sésil com um endocarpo fibroso, de forma redonda, com um diâmetro de 1-2 cm e massa variando 0,8-2,3 gramas (Figura 1). Existem diversas variedades do fruto, na qual cada uma apresenta coloração diferente quando maduras (BICHARA; ROGEZ, 2011).



Figura 1. Frutos do açaí no cacho

Fonte: Palacio (2008).

O açaí é o principal produto oriundo da palmeira apresentando importância socioeconômica por ser fonte de renda da população ribeirinha, sendo considerado um importante produto agroextrativista. Além disso, a evolução do preço deste produto no mercado, devido aos fatores benéficos que o fruto apresenta, tem aumentado o interesse de produtores agrícolas e agroindústrias (MAPA, 2015).

O Estado do Pará é considerado o maior produtor nacional, sendo responsável por cerca de 55,00 % da produção nacional no ano de 2013, o que corresponde a aproximadamente 111.000 toneladas de frutos de açaí, como mostrado na Tabela 1 (MAPA, 2015).

Tabela 1. Produção de frutos de açaí no Brasil no ano de 2013

Estados	Quantidade (t)	Percentual (%)
Pará	111.073	54,93
Amazonas	71.783	35,50
Maranhão	12.837	6,35
Acre	3.050	1,51
Amapá	2.036	1,01
Rondônia	1.435	0,70
Roraima	1	0,00
Total	202.215	100,00

Fonte: MAPA (2015)

Os principais consumidores da polpa de açaí no Exterior são os Estados Unidos e o Japão, sendo responsáveis por comprar cerca de 95,00 % de toda a polpa produzida no Estado do Pará e comercializada para o mercado externo no ano de 2014, como pode ser observado na Tabela 2 (MAPA, 2015).

Tabela 2. Comercialização da polpa de açaí para o Mercado Externo no ano de 2014

Países	Quantidade (t)	Percentual (%)
Japão	2.569,78	48,76
Estados Unidos	2.493,81	47,32
Ucrânia	71,13	1,35
Israel	36,50	0,69
Holanda	30,06	0,57
Austrália	18,35	0,35
Alemanha	16,20	0,31
Portugal	12,60	0,24
Coréia do Sul	10,67	0,20
França	4,86	0,09
Bélgica	3,38	0,06
Colômbia	3,00	0,06
Total	5.270,34	100,00

Fonte: MAPA (2015)

As propriedades nutricionais e o elevado valor energético do açaí têm aumentado a demanda nacional do fruto, pois diversas pesquisas mostram que este é considerado um alimento rico em proteínas, fibras, lipídeos, minerais e vitamina E. Além disso, o elevado teor de antocianinas, que são pigmentos pertencentes à família dos flavonóides, é benéfico à saúde, pois favorece a circulação sanguínea e protege o organismo contra a arteriosclerose

(BERNAUD; FUNCHAL, 2011; GORDON et al., 2012; NEVES et al., 2015; WYCOFF et al., 2015).

A cor característica da bebida de açaí é consequência da elevada concentração desses pigmentos. As principais antocianinas presentes no açaí são a cianidina-3-glicosídeo (C-3-G) e cianidina-3-rutinosídeo (C-3-R) (BICHARA; ROGEZ, 2011).

O principal fator de interesse do fruto é sua propriedade antioxidante, em virtude da presença de antocianinas e outros compostos fenólicos, sendo considerado um alimento funcional. O que tem sido foco de diversas pesquisas que envolvem o fruto da *Euterpe oleracea*. Batista (2016) estudou a extração de açaí em CO₂ supercrítico, avaliando o teor de compostos fenólicos e antocianinas na polpa residual, apresentando potencial aplicação para fins nutracêuticos. Novello (2011) estudou a extração de antocianinas dos frutos do açaí da Mata Atlântica e sua atuação nas atividades antioxidantes e antiaterogênica em camundongos com arteriosclerose.

3.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são substâncias químicas que tem a capacidade de prevenir e reduzir os danos oxidativos de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos promovidos por espécies de oxigênio reativo (radicais livres). Essas espécies produzidas no organismo são responsáveis por causar danos celulares, desencadeando diversas anormalidades fisiológicas e patológicas, tais como inflamação, doenças cardiovasculares, artrite, catarata, câncer e envelhecimento (BERNAUD; FUNCHAL, 2011; FREIRE et al., 2013).

Para prevenir ou combater os prejuízos gerados pelos radicais livres o organismo depende da defesa de antioxidantes, que podem ser endógenos (produzidos no próprio organismo) ou exógenos (fornecidos através de dieta alimentar). O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre o excesso da produção de radicais livres e a velocidade de remoção dessas moléculas pelo sistema de defesa antioxidante (BERNAUD; FUNCHAL, 2011).

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o que confere a característica de instabilidade, meia vida curta e alta reatividade química. A instabilidade da espécie é causada pela alta reatividade química, uma vez que essas moléculas tendem a acoplarem seus elétrons não pareados com outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, passando a comportar-se assim como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (FERREIRA et al., 2010).

Ao grupo dos radicais livres pertencem espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, radicais de hidroxila, alcóxila e peróxido de hidrogênio (BARREIROS et al, 2006). Os antioxidantes impedem que o oxigênio se combine com essas moléculas ou neutralizam a formação de radicais livres e espécies ativas de oxigênio, formando compostos menos reativos (GOTTLIEB et al, 2009).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que desencadeiam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (FERREIRA et al., 2010).

As antocianinas, pertencentes do grupo dos flavonoides, apresentam atividade antioxidante e anti-inflamatória, o que pode reduzir a progressão e instalação de doenças do fígado. As evidências indicam que as antocianinas atenuam o estresse oxidativo, aumentando a resistência das lipoproteínas de baixa densidade à oxidação e reduzindo mediadores de inflamações, tais como citocinas, quimiocinas, e as metaloproteinases de matriz (CARDOSO et al., 2015).

3.3 ANTOCIANINAS

As antocianinas são substâncias fitoquímicas presentes em diversos vegetais, pertencentes à classe de compostos fenólicos. Os fenólicos quimicamente são definidos como compostos que apresentam na sua estrutura um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxil, possuem estruturas diversificadas sendo classificados em ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarina e taninos (CARDOSO; BARRÉRE; TROVÃO, 2009; FREIRE et al., 2013).

Os flavonóides constituem a maior classe de polifenóis, apresentando a mesma estrutura básica, as principais classes de flavonóides são as antocianinas, os flavonóis ou procianidinas e os isoflavonóides, estes tem despertado interesse da indústria de alimentos nutracêuticos e funcionais (VALLS et al., 2009).

As antocianinas são um dos grupos pertencentes aos flavonóides mais estudados na última década, são encontradas em diversos alimentos e são responsáveis pela pigmentação azul, roxo e vermelho de varias frutas. Além de ser utilizada como corante, em virtude de seus benefícios associados as suas propriedades antioxidantes, anti-flamatórias e anti-dibaéticos, tem

mostrado diversas aplicações na área da saúde (VALLS, et al., 2009; RODRIGUES, et al., 2015).

Este grupo de flavonoides são pigmentos solúveis em água encontrados em vacúolos celulares em várias espécies do reino vegetal, derivados polimetoxi ou polihidroxi glicosilados do cátion flavílico (grupo aglicona) que contêm em sua estrutura duplas ligações conjugadas o que confere a absorção de luz em torno de 500 nm e cor típica desses pigmentos. As agliconas ou cátion flavílico (Figura 2) são comumente conhecidos como antocianidinas (PATRÍCIO, 2012).

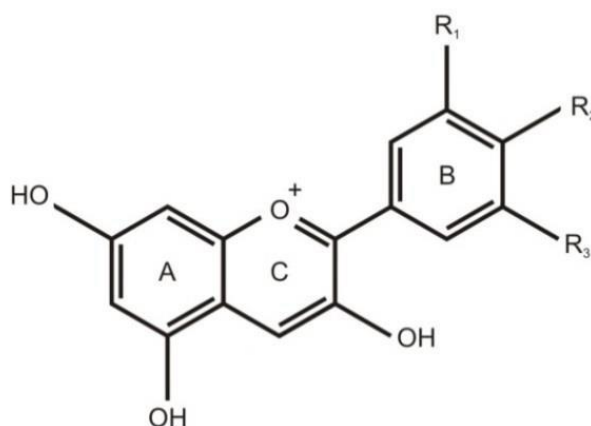


Figura 2. Estrutura básica da aglicona

Fonte: Castañeda-Ovando et al. (2009)

As antocianidinas quando ligadas a açúcares são conhecidas como antocianinas, as diversas estruturas dessa substância dão origem a aproximadamente 600 tipos de antocianinas (PATRÍCIO, 2012). As principais estruturas de antocianidinas podem ser observadas na Figura 3.

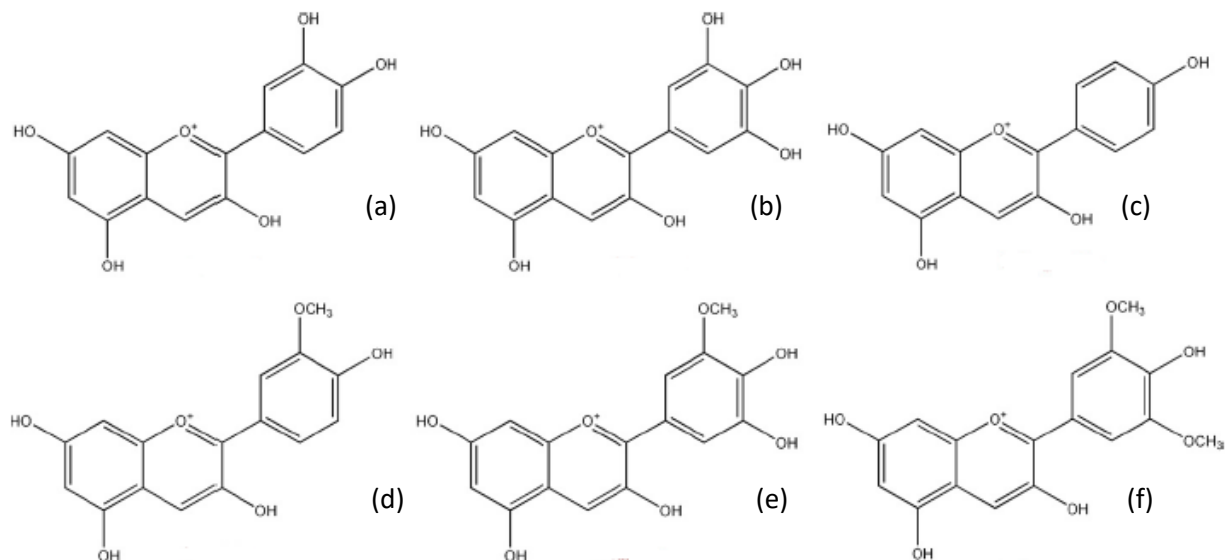


Figura 3. Estrutura das principais antocianidinas encontradas na natureza: (a) Cianidina, (b) Delfinidina, (c) Pelargonidina, (d) Peonidina, (e) Petunidina e (f) Malvidina.

Fonte: Valls et al. (2009)

As principais diferenças entre as antocianinas são o número de grupos hidroxilados ligados a antocianidinas, a natureza e o número de açúcares ligados a sua estrutura, os ácidos alifáticos ou carboxilados aromáticos ligados ao açúcar e a posição dessas ligações na molécula (VALLS et al., 2009; PATRICIO, 2012).

A estrutura das antocianinas influencia nas suas propriedades químicas, o que promove alterações na sua estabilidade, equilíbrio aquoso, cor, reatividade e suas propriedades antioxidantes. O açúcar presente nas moléculas de antocianinas promove maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparado as antocianidinas (MARÇO; POPPI, 2008; PATRICIO, 2012).

Atividades antioxidantes e anti-inflamatórias das antocianinas são produzidas através da sua capacidade de neutralizar os radicais livres, bem como inibir a ação da lipoxigenase e ciclo-oxigenase, enzimas que metabolizam o ácido araquidônico (BOWEN-FORBES, ZHANG, & NAIR, 2010).

A estabilidade das antocianinas depende de fatores como pH, temperatura, presença de ácidos, açúcares íons metálicos. De maneira geral, as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada em meio aquoso ácido (pH ente 1 e 2), devido ao predomínio da forma cátion flavílico (MARÇO; POPPI, 2008).

Em meio ácido, as antocianinas estão em equilíbrio entre quatro estruturas: a base quinoidal A, o cátion flavílico AH⁺, a carbinol ou pseudobase B e a chalcona C (Figura 4).

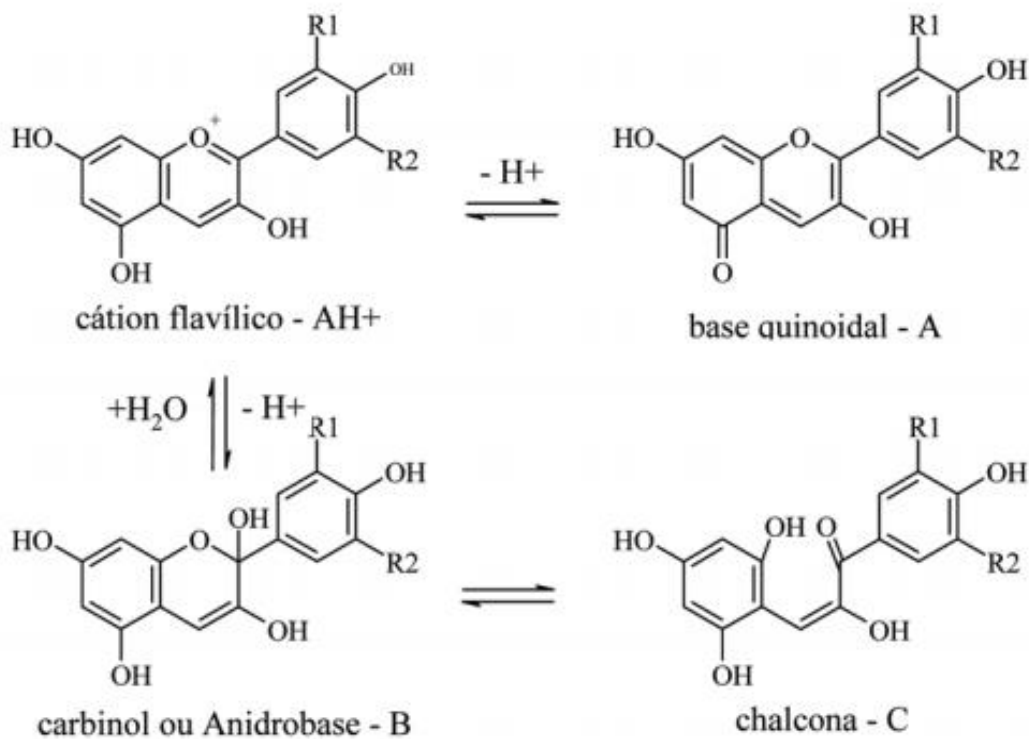


Figura 4. Formas estruturais das antocianinas em função do pH

Fonte: Rein e Heinonen (2004)

Com o aumento do pH (acima de 4) ocorre a redução na concentração do cátion flavílico, havendo a formação do composto pseudobase-carbinol, responsável por promover alteração na coloração para azul claro. Em pH superior a 6 tornam-se incolor, devido a abertura do anel heterocíclico sendo degradadas em pH 7 (MARÇO; POPPI, 2008; SHARMA et al, 2016).

O aumento da temperatura é um fator que acelera a degradação das antocianinas. Na presença de cátions Al, Fe, Sn e outros metais, as antocianinas formam produtos insolúveis. Estes produtos, em relação às antocianinas livres, principalmente no caso do alumínio, apresentam maior estabilidade frente a fatores como calor, pH e oxigênio. Além disso, a luz é um fator de grande influência na estabilidade das antocianinas, promovendo alteração na cor desse pigmento. Quando combinado com o efeito do oxigênio a alteração é mais intensa (MARÇO; POPPI, 2008; SHARMA et al, 2016).

3.4 PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINAS

As antocianinas são moléculas polares devido à presença dos grupos hidroxilas, carboxilas, metoxilas e glicosilas residuais ligados aos seus anéis aromáticos. Em virtude disto, estes compostos são mais solúveis em água do que em solventes não polares. A extração de antocianinas é geralmente realizada utilizando misturas aquosas com solventes orgânicos.

A extração convencional é realizada através extração líquido-líquido com agitação utilizando soluções acidificadas com o objetivo de aumentar a estabilidade das antocianinas. No entanto alguns estudos têm realizado a extração usando outras técnicas. Cai et al., (2016) efetuaram a extração de antocianinas da batata doce roxa assistida por ultra-som e por solvente acelerado, verificando que o método de extração afeta o rendimento, pureza e composição das antocianinas. Rodrigues et al. (2015) também estudaram a extração de antocianinas assistida por ultra-som utilizando como matriz a casca de jabuticaba e verificaram que o rendimento obtido na condição otimizada foi superior a outros métodos de extração.

Outra técnica que vem sendo utilizada para extração desses compostos é por fluido supercrítico (SFE), as grandes vantagens de extratos obtidos por SFE são sua origem natural, ausência de resíduos do solvente orgânico e o controle da composição do extrato pela seletividade processo (PAES et al., 2014).

Estas técnicas são alternativas para extração convencional, evitando o uso de solventes tóxicos, sendo amigáveis ambientalmente. No entanto são técnicas que necessitam do uso de equipamentos sofisticados e necessitam de consumo de energia. A extração de antocianinas via Sistema Aquoso Bifásico (SAB) é uma técnica de fácil operação e financeiramente viável. Diversos estudos têm realizado a extração dessa classe de flavonóides por SAB. Liu et al. (2013) investigaram a extração de antocianinas de batata doce roxa usando SAB constituído por etanol e solução aquosa de sulfato de amônio, utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os autores conseguiram nas condições ideais 9,02% de rendimento de antocianinas e um coeficiente de partição igual a 19,62. Estes resultados sugerem que o SAB é eficiente em extração de antocianinas e tem potencial para ser utilizado na indústria de extração de antocianinas natural.

3.5 SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (SAB)

Sistemas constituídos de duas fases aquosas são excelentes alternativas como método de separação de biomoléculas por favorecer estabilidade de moléculas biológicas, devido oferecerem um meio constituído predominantemente por água.

O SAB pode proporcionar diversas vantagens, como por exemplo: diminuição do tempo de processamento, facilidade no aumento de escala e desenvolvimento de condições adequadas à distribuição das biomoléculas nas fases sem que ocorram mudanças na sua conformação e consequente perda de atividade biológica (COIMBRA; TEIXEIRA, 2009).

Esses sistemas são constituídos por duas fases aquosas imiscíveis que coexistem em equilíbrio, formadas pela adição de compostos hidrossolúveis. Cada fase do sistema torna-se enriquecida com um dos compostos acima da concentração termodinâmica crítica, originando duas fases aquosas de natureza química e física diferentes, conduzindo a migração das biomoléculas para uma das fases por afinidade. (ALBERTSSON, 1971; ALBERTSSON, 1986; GLYK et al., 2014).

A formação dos sistemas aquosos bifásicos é conhecida desde o final do século XIX. Beijerinck (1986) observou a formação de duas fases aquosas após misturar soluções de gelatina e ágar, notando que a mistura primeiramente se tornava turva, mas depois de certo tempo em repouso dava origem a duas fases límpidas, onde a fase inferior tornou-se rica em ágar e a fase superior rica em gelatina. Ostwald e Hertel (1929), em estudos posteriores, verificaram que para diferentes fontes de amido (arroz, milho etc.), possuindo diferentes concentrações originaram diferentes diagramas de fase.

Em 1958, Albertsson foi o primeiro a observar a partição de proteína em SAB, verificando que esta biomolécula é distribuída desigualmente entre essas duas fases formadas. Isto propiciou analogias com processos de extração líquido-líquidos, que são completamente comuns em indústrias químicas. A partir dessas observações, ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação destes sistemas à partição/purificação de materiais biológicos (MERCHUK et al., 1998).

Existem diversos tipos de SABs, porém dois dos muitos tipos de sistemas formados são geralmente aplicados na distribuição de materiais biológicos: os formados por dois polímeros (polietileno glicol - PEG/dextrana) e os formados por um polímero e um sal (polietileno glicol - PEG/sal) (ALBERTSSON, 1971).

A dextrana possui um elevado custo. Devido a isso, estudos estão cada vez mais sendo realizados utilizando sistemas com PEG/sal, que além do baixo custo, apresentam outras vantagens, tais como: menor tempo de separação de fases; podem ser formados à temperatura ambiente e possuem propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como elevada seletividade e diferenças de densidade e viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extrações disponíveis no mercado (ALBERTSSON, 1971).

Outro sistema tem sido bastante utilizado para partição de biomoléculas, o sistema formado por álcool e sal. Hua et al. (2013) estudaram a extração e purificação de antocianinas de resíduos de frutas utilizando Etanol e Sulfato de Amônio. Khayati e Gholitabar (2016) estudaram os dados de Equilíbrio Líquido-Líquido de diferentes álcoois e Sais para a formação Sistemas Aquosos Bifásicos.

Nos sistemas PEG/sal, a fase superior é rica em PEG e a fase inferior é rica em sal. A separação das fases é atingida mais rapidamente em virtude da maior densidade da fase salina em relação à fase polimérica, o que facilita o uso de sistemas polímeros-sal em aplicações industriais. Além disso, tem-se menor custo e baixa viscosidade (SALABAT, 2001; GLYK et al., 2014).

Os sistemas formados por álcoois e sais são frequentemente utilizados na separação de biomoléculas por apresentarem baixa viscosidade, alta polaridade e também devido à fácil recuperação dos álcoois e dos sais (WANG et al., 2010; REIS et al., 2014)

Para a utilização de SAB em estudos de partição de biomoléculas, é necessário o conhecimento prévio do comportamento das fases nos sistemas. Os dados do equilíbrio líquido-líquido são normalmente representados por meio de diagramas de fases, ou diagramas de equilíbrio, que são representações gráficas que descrevem o comportamento do sistema em diferentes condições.

Em sistemas com três componentes (sistemas ternários), as fases são representadas por diagramas de fase em coordenadas triangulares, como representado na Figura 5.

No diagrama está representada a curva binodal, indicando a região monofásica e bifásica do sistema. Os vértices do triângulo correspondem aos componentes puros (1, 2 e 3) e os lados às misturas binárias. No diagrama triangular as composições são normalmente dadas em frações mássicas ou porcentagem.

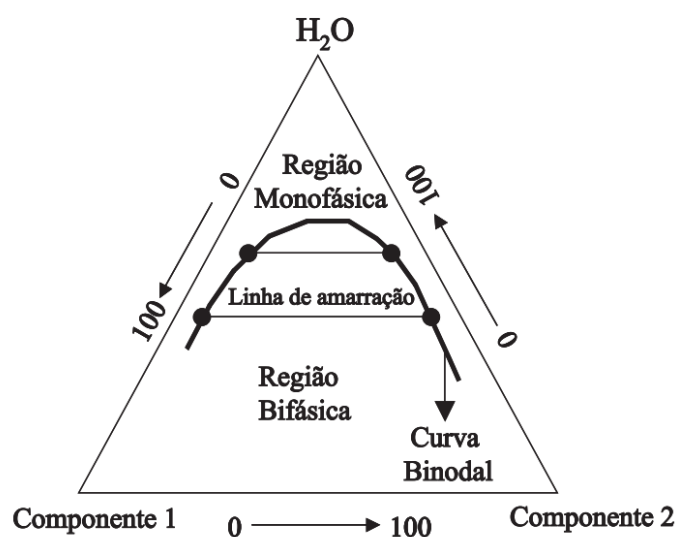


Figura 5. Diagrama de fases em coordenadas triangulares

Fonte: Silva e Loh (2006).

Para SABs no qual a concentração de água é bastante elevada (40 – 80 %, m/m) costuma-se utilizar a forma de eixo cartesiano para representar o diagrama de fases (Figura 6), excluindo-se a composição de água. Nestes diagramas pode ser observada a composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico (SOUZA, 2014).

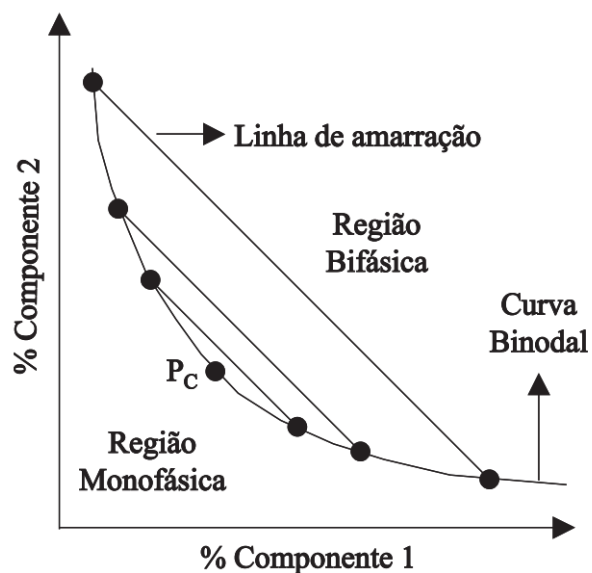


Figura 6. Diagrama de fase para sistemas aquosos bifásicos, expresso em coordenadas retangulares.

Fonte: Silva e Loh (2006).

Uma particularidade de um diagrama de fases é o ponto crítico (P_c), neste ponto as propriedades físico-químicas (composição e volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais. Desta forma, quanto mais a composição do sistema se aproxima do P_c , menor é a diferença entre as fases. No entanto, nas proximidades do P_c existem pequenas alterações na composição dos sistemas, que provocam drásticas mudanças na qual o sistema varia de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

Na Figura 7 (a) o ponto dentro da região bifásica com composição global M formará duas soluções líquidas imiscíveis com composições representadas por L e N, a interseção entre esses dois pontos forma a linha de amarração, ou tie-lines (TL). Todas as misturas representadas sobre a mesma TL possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais e diferentes propriedades termodinâmicas extensivas (TREYBAL, 1951).

Existem vários tipos de curvas binodais para um sistema ternário, que podem ser classificadas pelo número de pares parcialmente miscíveis, algumas dessas estão representadas na Figura 7. De acordo com Treybal (1951), os sistemas ternários podem ser divididos em 4 tipos:

Tipo 1 - Formação de um par de líquidos parcialmente miscíveis.

Tipo 2 - Formação de dois pares de líquidos parcialmente miscíveis.

Tipo 3 - Formação de três pares de líquidos parcialmente miscíveis.

Tipo 4 - Formação de fases sólidas.

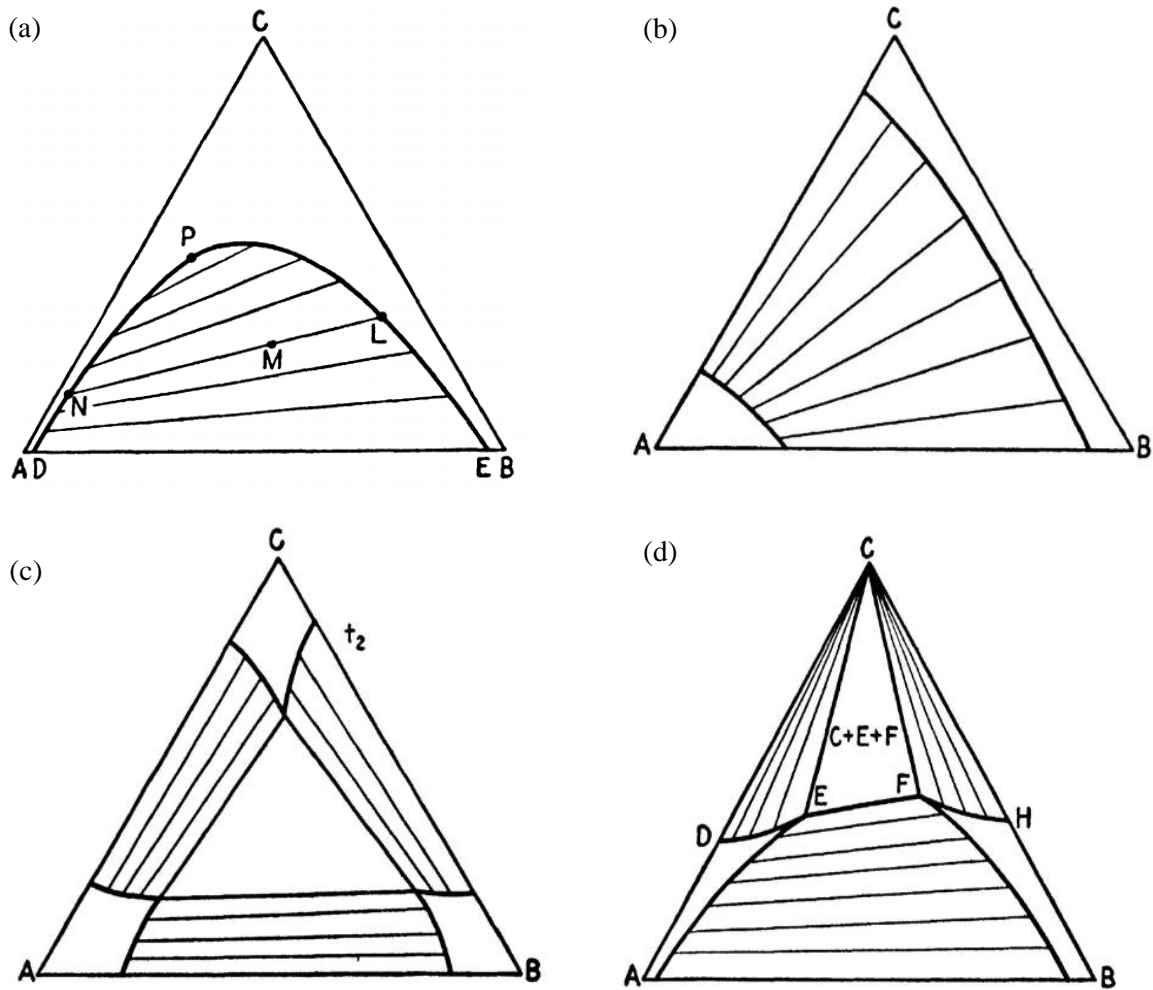


Figura 7. Equilíbrio líquido-líquido ternário: (a) formação de um par de líquidos parcialmente miscíveis – Tipo 1, (b) formação de dois pares de líquidos parcialmente miscíveis, (c) formação de três pares de líquidos parcialmente miscíveis e (d) formação de fases sólidas.

Fonte: Treybal (1951).

Alguns parâmetros termodinâmicos são utilizados na extração líquido-líquido, tais como o Comprimento da Linha de Amarração (CLA), a Inclinação da Linha de Amarração (ILA) e coeficiente de partição (K).

O CLA é uma propriedade termodinâmica utilizada para medir as propriedades intensivas entre as fases formadas no SAB. Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases e aumentando a eficiência na extração e/ou partição de soluto de interesse (BARBOSA, 2013). O valor do CLA pode ser calculado em função das diferenças de concentrações dos componentes nas fases, conforme Equação 1.

$$CLA = [(C_{Ps} - C_{Pi})^2 + (C_{Ss} - C_{Si})^2]^{0,5} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde que C_{Ps} e C_{Pi} são as concentrações de polímeros na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto C_{Ss} e C_{Si} são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente.

A ILA é um parâmetro importante em um diagrama de equilíbrio, pois indica a variação da composição das fases a partir da alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar (BARBOSA, 2013). O valor da inclinação pode ser calculado pela Equação 2,

$$ILA = \frac{(C_{Ps} - C_{Pi})}{(C_{Ss} - C_{Si})} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde C_{Ps} e C_{Pi} são as concentrações de polímeros na fase superior e inferior, respectivamente, enquanto C_{Ss} e C_{Si} são as concentrações do sal na fase superior e inferior, respectivamente.

Quando materiais biológicos são adicionados em SAB, eles se distribuem entre a fase superior e inferior, sem perda da atividade biológica. A relação entre as concentrações de certa biomolécula nessas fases define o coeficiente de partição (K) em sistemas aquosos, ou coeficiente de distribuição, que é dado pela Equação 3 (ALBERTSSON, 1986):

$$K = \frac{C_i^{fs}}{C_i^{fi}} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde C_i^{fs} é a concentração da biomolécula i na fase superior, e C_i^{fi} é a concentração de biomolécula i na fase inferior.

A partição do soluto no SAB está relacionada com a natureza do soluto e do SAB utilizado. Em relação ao soluto, os principais fatores que influenciam a partição são a presença de carga elétrica, hidrofobicidade, composição e conformação. Quanto ao SAB os principais fatores são a massa molar e a concentração do polímero, o pH e a temperatura (PATRICIO, 2012).

Wu et al. (2014) avaliaram a extração e purificação de antocianinas do suco de uva em SAB utilizando fosfato de sódio monobásico e etanol, investigando o efeito da composição do

SAB, a quantidade de suco, tempo de extração e pH sobre a estabilidade e extração da molécula de interesse. Em condições ótimas, os autores conseguiram um rendimento de 99% de antocianinas na fase superior.

Barbosa (2013) avaliaram o efeito do peso molecular do polietileno glicol (PEG) e da temperatura para SAB constituído de polímero e sulfato de sódio em pH 2, avaliando as condições para aplicação na extração de antocianinas do jamelão. O autor verificou que o aumento da massa molar do polímero promoveu o decréscimo do coeficiente de partição da antocianina, além disso, observou que os sistemas na temperatura de 40 °C acarretou na degradação da biomolécula de interesse, apresentando coloração amarelada.

Patrício (2012) avaliou o efeito de diversos tipos de sais e PEG com diferentes pesos moleculares, e fatores que influenciam o comportamento de partição das antocianinas usando SAB. O autor verificou que a partição do composto é dependente do comprimento da linha de amarração, natureza do eletrólito, massa molar e hidrofobicidade do polímero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO DO AÇAÍ

Os frutos de açaí (*Euterpe oleracea*) *in natura* foram coletados na Vila de Ponta Negra, pertencente ao município de Muaná no estado do Pará. Foram adquiridos cerca de 10 Kg de fruto no mês de novembro de 2016, os mesmos foram transportados ao Laboratório de Operações e Separação da Universidade Federal do Pará.

Para a realização das análises físico-químicas, os frutos de açaí foram descascados manualmente e na casca do fruto foram feitas as análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, sendo os resultados expressos em porcentagem (%). Além disso, foi feita a quantificação de antocianinas totais presentes na casca do fruto. As análises foram realizadas em triplicata segundo as metodologias descritas a seguir:

Umidade: foi determinada via método gravimétrico, por secagem em estufa a 105°C, até peso constante, de acordo com o método 920.151 da AOAC (2002).

Cinzas: foram determinadas gravimetricamente, por calcinação da amostra a 550°C, de acordo com o método 940.26 da AOAC (2002).

Proteína: foram determinadas a partir do nitrogênio total contido na amostra, de acordo com o método Kjeldahl, número 920.152 da AOAC (2002).

Lipídios: foram determinados por extração intermitente da fração lipídica, pelo método Soxhlet, usando éter de petróleo como solvente, segundo o método no 922.06 da AOAC (1997).

Carboidratos totais: foram determinados por diferença, de acordo com Brasil (2003).

Antocianinas Totais: a quantificação das antocianinas foi realizada conforme o método espectrofotométrico de pH único, de acordo com o descrito por Fuleki e Francis (1968).

4.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE ANTOCIANINAS DE POLPA DE AÇAÍ E ESTUDO DA ESTABILIDADE

Para obtenção dos extratos de antocianinas do açaí foi utilizada a polpa do fruto processada e comercializada no município de Belém. Foram obtidos dois tipos de extratos, um com adição de álcool etílico anidro P.A (Synth, 99.8%), na proporção 2:1 (polpa:álcool) e outro utilizando a polpa apenas centrifugada. Esses extratos foram mantidos a temperatura constante de 20°C e submetidos a centrifugação por 20 minutos a 3000 rpm em centrífuga (SIGMA, modelo 6-15 H). O sobrenadante foi coletado e dividido em duas amostradas, sendo

armazenado em vidro âmbar sob-refrigeração a aproximadamente 5 °C. Em uma das amostras foi feita a correção do pH para 2,0 usando solução a 25% de ácido cítrico (Synth, 99.5%) e a outra foi separada para análises de antocianinas totais e pH.

A quantificação das antocianinas totais foi realizada de acordo com o método do pH diferencial descrito por Hosseinian et al. (2008). Foram preparadas duas diluições, uma para pH 1,0 usando tampão de cloreto de potássio e outra para pH 4,5, deixando as soluções estabilizarem por um período de 15 minutos. Em seguida, um espectrofotômetro de UV-visível (Thermo Scientific, modelo Genesys 10-S) foi utilizado para a leitura das absorbâncias da amostra a $\lambda_{510\text{nm}}$ e a $\lambda_{700\text{nm}}$. O registro da absorbância a um comprimento de onda de 700 nm permite eliminar desvios na leitura provocados pela eventual presença de materiais coloidais, a este comprimento de onda não existe absorbância por parte das antocianinas (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

O cálculo da concentração das antocianinas, expresso em equivalentes de cianidina-3-glucósido, será realizado utilizando a Equação 4.

$$\textit{Antocianinas totais} \left(\frac{\textit{mg}}{\textit{L}} \right) = \frac{(A \times MM \times FD \times 10^3)}{(\varepsilon \times L)} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

A = $(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$, em que A é a absorbância;

MM = massa molar da cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol);

FD = fator diluição

ε = coeficiente absorvidade molar da cianidina (26.900);

L = comprimento da trajetória em centímetros

Após a quantificação de antocianinas o melhor extrato, de acordo com a maior concentração de antocianinas, foi submetido ao estudo da estabilidade das antocianinas em diferentes soluções de álcool e sal. O álcool utilizado foi o etanol e os sais foram sulfato de amônio (Synth, 99%), sulfato de sódio (Synth, 99%), fosfato de potássio monobásico (Synth, 99%). Foi avaliado o efeito dos componentes dos sistemas sobre a conservação das antocianinas de acordo com a metodologia empregada por Wu et al. (2014). O efeito de cada componente foi avaliado separadamente com controle de temperatura (25°C) e protegido da luz.

Para avaliar o efeito do etanol sob a antocianina, sistemas com várias concentrações de etanol (10%, 20% e 30%) foram preparados adicionando 2 mL de extrato com pH corrigido a

2,0 em 10 mL de cada solução. A mistura foi deixada em repouso e foi avaliada a taxa de conservação de antocianina de cada sistema através da análise de conteúdo de antocianinas totais nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min.

Do mesmo modo, para investigar o efeito do sal na antocianina, sistemas com várias concentrações de sal (5%, 10% e 15%) foram preparados adicionando 2 mL de extrato com pH 2,0 em 10 mL de cada solução de salina e a taxa de conservação de antocianinas totais de cada sistema foi analisada nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min.

Os resultados foram avaliados através do teste de Tukey para a comparação entre as médias ao nível de 5% de significância.

4.3 PREPARAÇÃO DOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABs)

Primeiramente foram determinados os dados de equilíbrio dos sistemas constituídos por etanol + sulfato de amônio + água a 25 e 35 °C. Para a formação dos SABs foi utilizado álcool etílico anidro P.A. 99,8 % e solução de sulfato de amônio (Synth, 99%) com fração mássica de sal a 0,4205. Para o preparo da solução salina foram pesados em balança analítica com precisão de $\pm 0,0001$ (Quimis, modelo Q500L210C) 59,6383 g de sulfato de amônio e 82,1700 g de água.

4.3.1 Curva Binodal

As curvas binodais do sistema etanol + sulfato de amônio + água foram determinadas pelo do método gravimétrico de turbidez (*cloud-point*) (GALAEV e MATIASSON, 1993) nas temperaturas de 25 °C e 35 °C. Para isto, foi utilizada uma célula de equilíbrio encamisada, feita em vidro com capacidade para 23 mL, acoplada num banho termostático (Quimis, modelo Q214M2).

4.3.2 Curva de Calibração

A construção da curva de calibração se dá pelo preparo de sistemas com concentrações conhecidas sobre a curva binodal e realização da leitura de alguma propriedade física, nesse caso foi utilizada a massa específica em g/cm^3 através do densímetro digital (Anton Paar, modelo DMA 35) de acordo com a temperatura de cada sistema. Os dados de concentração e massa específica (g/cm^3) foram correlacionados para obtenção da equação da curva de calibração de cada sistema.

4.3.3 Determinação das linhas de amarração - Tie lines

As linhas de amarração (LA) ou “tie lines” de cada diagrama de fase foi determinada através da seleção de um ponto dentro da zona de miscibilidade parcial, através da qual passa a LA. A partir das concentrações pré-definidas de sal, etanol e água, foram preparados seis sistemas em células de equilíbrio. Os sistemas foram preparados através da pesagem dos componentes para uma quantidade adequada a célula de equilíbrio encamisada acoplada a um banho termostático. Os sistemas foram homogeneizados utilizando um agitador magnético (Quimis, modelo Q221.1) a uma taxa de agitação a 100 rpm e foi mantido em repouso durante 16 horas (nas temperaturas de cada sistema) para ocorrer a separação das fases. Após esse tempo, amostras de ambas as fases foram coletadas para medição da massa específica (g/cm^3).

A determinação das composições dos componentes das LA foi realizada através do método indireto, que se baseia na resolução do sistema de equações montado a partir das Equações geradas pela curva binodal e curva de calibração juntamente com uma terceira (Equação 5).

$$W_{PEG} + W_{SAL} + W_{ÁGUA} = 1 \quad \text{Eq. 5}$$

Em seguida, para verificar a confiabilidade dos dados experimentais, foram utilizadas as equações empíricas de Othmer-Tobias (1942) e Hand (1930). Essas equações avaliam a linearidade das linhas de amarração, indicando concordância dos dados experimentais.

As Equações 6 e 7 são, respectivamente, as equações de Othmer-Tobias e Hand. Onde W_1^S é a fração mássica de etanol na fase rica em etanol, W_2^I é a fração mássica de sal na fase rica em sal, W_3^S é fração mássica de água na fase rica em etanol e W_3^I é a fração de água na fase rica em sal.

$$\ln\left(\frac{1-W_1^S}{W_1^S}\right) = A + B \ln\left(\frac{1-W_2^I}{W_2^I}\right) \quad \text{Eq. 6}$$

$$\ln\left(\frac{W_3^S}{W_1^S}\right) = A + B \ln\left(\frac{W_3^I}{W_3^I}\right) \quad \text{Eq. 7}$$

4.3.4 Determinação dos parâmetros de equilíbrio

Os parâmetros de equilíbrio determinados foram comprimento das linhas de amarração (CLA) e inclinação das linhas de amarração (ILA) de acordo com as Equações 1 e 2 , respectivamente. Além disso, foi feita a variação da massa específica entre as fases superior e inferior de cada LA.

4.5 EXTRAÇÃO DA ANTOCIANINA

A extração das antocianinas foi conduzida em região de equilíbrio bifásica do sistema Etanol-sal-água. A metodologia empregada foi feita de acordo com a Wu et al (2014) com algumas modificações. Foi utilizada uma proporção 1:5 (m/m) em relação à quantidade de casca do fruto utilizado e a massa de sistema constituído por etanol, sal e água. A composição do sistema foi correspondente à linha de amarração que apresentou maior comprimento, sendo mais vantajoso para extração de biomoléculas.

As extrações foram feitas dentro da faixa de temperatura dos digramas de fases deste trabalho, usando temperaturas de 27 e 33 °C, tempos de 30 e 50 minutos e pH de 3,4 e 4,6. Os parâmetros de temperatura e pH foram escolhidos de acordo com as melhores condições encontradas nos estudos de Liu et al. (2013) e Wu et al. (2011). Os tempos foram selecionados a partir dos resultados encontrados no estudo de estabilidade realizados no item 2.4. Foram realizadas oito extrações em triplicata de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Ensaios de extrações de antocianinas do açaí via SAB

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	2,5	25	60
2	3,5	25	60
3	2,5	30	60
4	3,5	30	60
5	2,5	25	120
6	3,5	25	120
7	2,5	30	120
8	3,5	30	120

Foram preparadas soluções hidroalcoólicas com frações correspondentes a água e etanol de acordo com a composição global da linha de amarração utilizada. As soluções apresentaram pH 6,6 sendo corrigido para 3,4 e 4,6 com solução de ácido cítrico a 25%. Em tubos de ensaios foram pesados solução hidro alcoólica, sal e casca do açaí, depois da pesagem os tubos foram

homogeneizados em Vortex Mixer (Kylin-Bell, modelo QL-901) durante 3 minutos. Após a homogeneização os tubos foram colocados em banho termostático de acordo com a temperatura utilizada e o tempo estabelecido.

Após o tempo de extração, foram coletadas a fase superior e inferior e submetidas a filtração a vácuo. Posteriormente foi quantificada a concentração de antocianinas de ambas as fases pelo método do pH diferencial descrito por Hosseinian et al. (2008).

Após a quantificação de antocianinas foram calculados o coeficiente de partição de acordo com a Equação 3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO FRUTO DO AÇAÍ

Na Tabela 4 estão expressos os resultados da composição centesimal do fruto do açaí e concentração de antocianinas. Os resultados de umidade, cinzas e lipídeos deste estudo foram semelhantes aos relatados por Sanabria e Sangronis (2007) que obtiveram para o fruto de açaí cerca de 40 % de umidade, 2 % de cinzas e 33% de lipídeos, todos expressos em base seca.

Gordon et al (2012) encontraram 58% de carboidratos na polpa proveniente do fruto imaturo de açaí e verificaram que o fruto maduro apresentou 36% desse constituinte. Malcher (2011) estudou a influência da sazonalidade na composição do açaí, os valores obtidos pelo autor foram semelhantes ao obtido nesse estudo para a safra do mês de novembro.

Tabela 4. Composição centesimal e teor de antocianinas da casca de açaí

Constituinte	Casca do açaí	Sanabria & Sangronis (2007)
Umidade (%)	38,48 ± 0,36	41,8
Cinzas (%)	2,19	2,2
Lipídeos (%)	32,15	33,1
Proteínas (%)	6,91	15,9
Carboidratos (%)	58,75	48,8
Antocianinas totais (mg/100g)	178,06	

Com relação as antocianinas totais, o presente estudo encontrou valores superiores a Bobbio et al. (2000) que utilizando o método descrito por Lees e Francis (1972), encontraram 50 mg/100g de antocianinas totais no fruto do açaizeiro. Teixeira et al. (2008) encontraram na polpa de açaí 21,23 mg/100g de antocianinas totais. Pacheco-Palencia e Talcott (2010) e Rufino et al (2010) relataram 51,9 e 111 mg/100g de antocianinas totais da polpa do açaí, respectivamente. Rogez et al (2011) obteve maior teor de antocianinas totais na polpa de açaí (144,3 mg/100g). A diferença entre esses valores relatados se dá principalmente pela sazonalidade do fruto, pois interfere na composição do mesmo.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DA POLPA DE AÇAÍ E ESTUDO DA ESTABILIDADE

Os valores de Antocianinas Totais (AT) e potencial Hidrogenionico (pH) obtidos a partir dos extratos da polpa de açaí estão apresentados na Tabela 5. De acordo com os resultados obtidos na Tabela 5, o teor de AT do extrato aquoso (318,55 mg/L) foi menor e apresentou

diferença significativa quando comparado ao extrato alcoólico (718,32 mg/L). O mesmo comportamento pode ser observado quanto ao pH, onde o extrato aquoso apresenta pH 4,80 e o alcoólico pH 5,44.

Apesar do pH do extrato alcoólico ser maior e influenciar sobre a estabilidade das antocianinas, nota-se que a extração foi mais eficiente pela maior concentração de antocianinas nesse extrato. A adição do álcool altera a polaridade da solução extratora, colaborando para uma melhor extração. O resultado encontrado foi semelhante ao encontrado na polpa de açaí por Lisbeth et al. (2007) que foi de $729,3 \pm 3,4$ mg/L.

Tabela 5. Antocianinas Totais (AT) e Potencial Hidrogenionico (pH) dos extratos da polpa de açaí.

Amostra	AT (mg/L)	pH
Extrato Aquoso	$318,55 \pm 3,74^a$	$4,80 \pm 0,02^a$
Extrato Alcoólico	$718,32 \pm 9,99^b$	$5,44 \pm 0,14^b$

Letras minúsculas na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo Teste Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Em virtude dos resultados encontrados, o extrato alcoólico foi utilizado para o estudo da estabilidade das antocianinas diluídas em diferentes soluções salinas e alcoólicas em diferentes concentrações.

A Tabela 6 revela os teores de Antocianinas Totais (AT) em várias concentrações de soluções de Sulfato de Amônio (5, 10 e 15%) adicionados de extrato alcoólico da polpa de açaí com pH 2,0 em diferentes tempos.

Verifica-se na Tabela 6 que na solução de sulfato de amônio a 5% não houve diferença significativa entre a concentração de AT no tempo 0 e a concentração de AT no tempo de 120 minutos. Por outro lado, é possível observar uma diferença significativa na concentração de AT nas Soluções de Sulfato de Amônio a 10 e 15% nos tempos 0 e 120 minutos.

Tabela 6. Conservação das antocianinas em soluções de Sulfato de Amônio

Tempo (min)	Antocianinas Totais (mg/L)		
	Sulfato de Amônio 5%	Sulfato de Amônio 10%	Sulfato de Amônio 15%
0	653,26 ± 2,40 ^{BCc}	634,02 ± 0,80 ^{Ab}	609,18 ± 1,60 ^{Ba}
30	643,64 ± 4,01 ^{ABCa}	634,02 ± 0,80 ^{Aa}	617,19 ± 1,60 ^{Ab}
60	642,04 ± 2,40 ^{ABa}	634,02 ± 8,82 ^{Aa}	611,6 ± 0,80 ^{ABa}
90	638,83 ± 0,80 ^{Ab}	625,21 ± 4,81 ^{Aab}	617,99 ± 0,80 ^{Aa}
120	656,47 ± 0,80 ^{Ccz}	343,86 ± 0,80 ^{Bb}	332,64 ± 0,80 ^{Ca}

Letras minúsculas e iguais na mesma linha e letras maiúsculas e iguais na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

A Tabela 7 apresenta os teores de AT em diferentes concentrações de soluções de Fosfato de Potássio Monobásico (FPM) (5, 10 e 15%) adicionados de extrato alcoólico da polpa de açaí com pH 2,0 em diferentes tempos.

Tabela 7. Conservação das antocianinas em soluções de Fosfato de Potássio Monobásico (FPM)

Tempo (min)	Antocianinas Totais (mg/L)		
	FPM 5%	FPM 10%	FPM 15%
0	643,64 ± 0,80 ^{Bb}	605,17 ± 0,80 ^{Aa}	608,37 ± 0,80 ^{Ca}
30	630,02 ± 1,60 ^{Ac}	606,77 ± 0,80 ^{Ab}	608,79 ± 1,60 ^{Ca}
60	662,08 ± 1,60 ^{Ca}	660,47 ± 1,60 ^{Ba}	663,68 ± 1,60 ^{Aa}
90	710,17 ± 1,60 ^{Eb}	687,73 ± 1,60 ^{Ca}	672,50 ± 5,61 ^{Aa}
120	685,32 ± 0,80 ^{Db}	656,47 ± 2,40 ^{Ba}	660,47 ± 1,60 ^{Aa}

Letras minúsculas e iguais na mesma linha e letras maiúsculas e iguais na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

De acordo com os resultados expressos na Tabela 7 não houve diferença significativa entre as soluções de FPM a 10 e 15 % nos tempos de 60, 90 e 120 minutos. É possível observar que as mesmas soluções apresentam maior concentração de AT no tempo de 90 minutos, o mesmo comportamento é observado para a solução de FPM a 5 %. Além disso, nota-se um aumento concentrações de AT até o tempo de 90 minutos em todas as soluções.

A Tabela 8 mostra as concentrações de AT nas diferentes concentrações de soluções de Sulfato de Sódio (5 e 10 %) adicionados de extrato alcoólico da polpa de açaí com pH 2,0, sendo avaliados em diferentes tempos.

Através dos resultados da Tabela 8 verifica-se que no tempo de 60 e 120 minutos não apresenta diferença significativa nas concentrações de AT nas soluções de Sulfato de Amônio.

Além disso, nota-se um aumento na concentração de AT no decorrer no tempo atingindo maior concentração nos tempos de 90 e 120 minutos nas duas soluções.

Tabela 8. Conservação das antocianinas em soluções de Sulfato de Sódio

Tempo (min)	Antocianinas Totais (mg/L)	
	Sulfato de Sódio 5%	Sulfato de Sódio 10%
0	624,40 ± 0,80 ^{Ba}	643,64 ± 0,80 ^{Ab}
30	622,80 ± 0,80 ^{Ba}	643,64 ± 0,80 ^{Ab}
60	679,71 ± 1,60 ^{Aa}	677,31 ± 0,80 ^{Ba}
90	683,72 ± 0,80 ^{Aa}	702,96 ± 2,40 ^{Cb}
120	683,72 ± 0,80 ^{Aa}	689,33 ± 1,60 ^{Ca}

Letras minúsculas e iguais na mesma linha e letras maiúsculas e iguais na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

A Tabela 9 revela as concentrações de AT em várias concentrações de soluções de Álcool Etílico (10, 20 e 30 %) adicionados de extrato alcoólico em diferentes tempos.

Tabela 9. Conservação das antocianinas em soluções de Álcool Etílico

Tempo (min)	Antocianinas Totais (mg/L)		
	Álcool Etílico 10%	Álcool Etílico 20%	Álcool Etílico 30%
0	634,02 ± 0,80 ^{Bb}	678,91 ± 0,80 ^{Aa}	673,30 ± 3,21 ^{Aa}
30	660,47 ± 1,60 ^{Cb}	678,11 ± 1,60 ^{Aa}	672,50 ± 0,80 ^{Aa}
60	671,70 ± 1,60 ^{Da}	674,90 ± 1,60 ^{Aa}	671,70 ± 1,60 ^{Aa}
90	693,34 ± 2,40 ^{Ab}	672,50 ± 0,80 ^{Aa}	670,09 ± 4,81 ^{Aa}
120	697,35 ± 1,60 ^{Ab}	653,26 ± 0,80 ^{Ba}	659,67 ± 0,80 ^{Aa}

Letras minúsculas e iguais na mesma linha e letras maiúsculas e iguais na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Observa-se na Tabela 9 que há diminuição na concentração de AT nas Soluções de Álcool Etílico a 20 e 30%, no entanto essa diminuição não é significativa até o tempo de 90 minutos somente na Solução a 20%. Verifica-se menor estabilidade das antocianinas quando utilizada uma menor diluição de álcool etílico (Solução a 10%). No entanto, não existe diferença significativa nas concentrações de AT nas três soluções alcoólicas utilizadas no tempo de 60 minutos.

5.3 CURVA BINODAL E DADOS DE EQUILÍBRIO

O sistema com fosfato de potássio não foi feito, pois não foi possível a obtenção de pontos suficientes para formação da curva binodal, possivelmente pelo fato do sal possuir baixa solubilidade em água. O sistema constituído por sulfato de sódio não foi finalizado devido não haver a possibilidade de aplicá-lo na extração de antocianinas do açaí, pois parte das amostras foram perdidas num incidente com a câmara onde as mesmas estavam armazenadas.

5.3.1 Curva Binodal

As frações mássicas de Etanol, Sulfato de amônio e água de cada ponto que foi obtido através do método gravimétrico de turbidez para construção das curvas binodais a 25 e 35 °C estão expressos no Anexo A e B, respectivamente.

A partir dos dados de frações mássicas foi possível plotar o diagrama de fases em função da fração mássica de etanol *versus* a fração mássica de sal para os dois sistemas, os diagramas na temperatura de 25 e 35 °C podem ser observados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

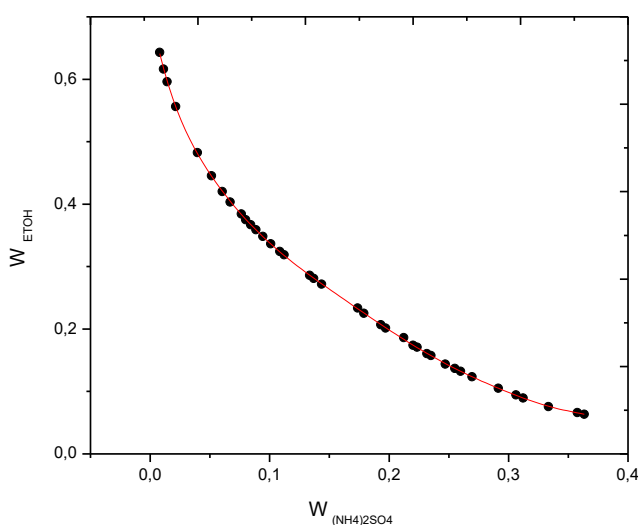


Figura 8. Curva binodal do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C

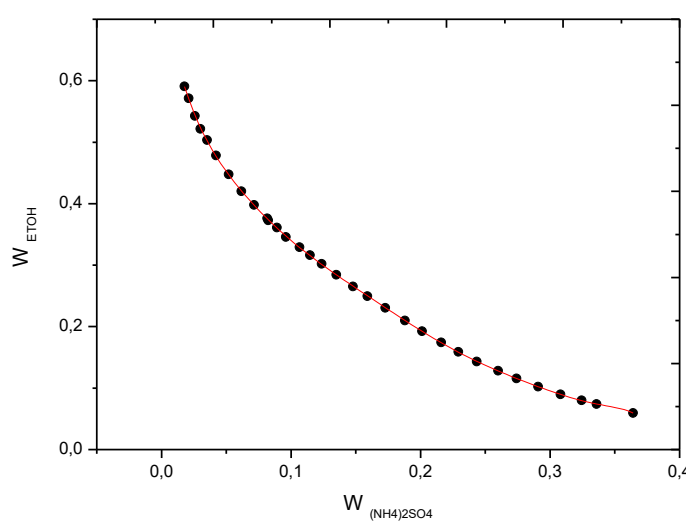


Figura 9. Curva binodal do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C

A curva binodal delimita duas diferentes regiões, na qual a região acima da curva é heterogênea e a região abaixo é homogênea. As curvas binodais obtidas são representadas pelas Equações 8 e 9, as quais representam respectivamente os sistemas a 25 e 35 °C. Os coeficientes de correlação (R^2) ajustaram bem as curvas, tendo valores próximos à unidade.

$$y = 0.71448 - 10.5788x + 199.651x^2 - 2962.9391x^3 + 28909.35x^4 - 180217.749x^5 + 705659.61763x^6 - (1.67355 * 10^6)x^7 + (2.19346 * 10^6)x^8 - (1.21835 * 10^6)x^9$$

Eq. 8

$$R^2 = 0,99996$$

$$y = 0,7507 - 12,27002x + 231,7571x^2 - 3215,7518x^3 + 29074,3001x^4 - 169412,38193x^5 + 625937,2236x^6 - (1,40948 * 10^6)x^7 + (1,75995 * 10^6)x^8 - 932886,24594x^9$$

$$R^2 = 0,99997$$

Eq. 9

Onde y é corresponde a fração mássica de etanol e x corresponde a fração mássica de sulfato de amônio.

5.3.2 Curva de calibração

Os dados correspondentes aos pontos que foram reproduzidos das curvas binodais nas temperaturas de 25 e 35 °C utilizados para construção da curva de calibração de cada sistema estão nos Anexos C e D respectivamente.

A curva de calibração relaciona a variação dos valores de massa específica (ρ) com diferentes composições de etanol e sal. As Figuras 10 e 11 representam as Curvas de calibração dos sistemas etanol + sulfato de amônio + água a 25 e 35°C, respectivamente.

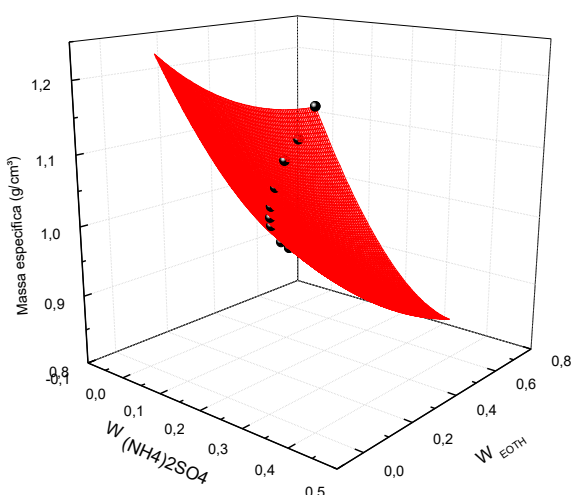


Figura 10. Curva de calibração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C

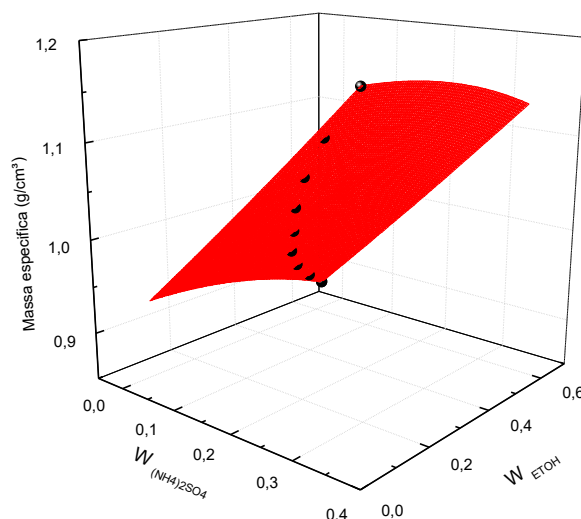


Figura 11. Curva de calibração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C

Através da correlação dos dados foi possível obter as equações da curva de calibração para os dois sistemas. As Equações 10 e 11 representam os sistemas a 25 e 35 °C, respectivamente.

$$\rho = 1.27935 - 0.40578x - 0.93742y + 0.8062x^2 + 0.50689y^2$$

$$R^2 = 0,99993 \quad \text{Eq. 10}$$

$$\rho = 0.92849 + 0.68101x + 0.00957y + 0.08573x^2 - 0,16164y^2$$

$$R^2 = 0,99984 \quad \text{Eq. 11}$$

Onde y é corresponde a fração mássica de etanol, x a fração mássica de sulfato de amônio e ρ a massa específica.

Os dados foram correlacionados de maneira satisfatória apresentando coeficientes de correlação (R^2) próximos de 1.

5.3.3 Linhas de amarrações (LAs)

As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores de massas específicas obtidas a partir das fases superior e inferior que foram coletadas de cada Linha de Amarração (LA) com suas concentrações globais pré- definidas de cada sistema. A composição da fase superior e inferior de cada LA do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25 e 35 °C estão expressas nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 10. Composição global das linhas de amarrações e massa específica das fases superior e inferior do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C

LA	Massa específica (g/cm ³)		Global		
	Fase Superior	Fase Inferior	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}
1	0,979 ± 0,000	1,120 ± 0,000	0,1527	0,2731	0,5742
2	0,958 ± 0,000	1,139 ± 0,000	0,1583	0,2821	0,5596
3	0,949 ± 0,000	1,154 ± 0,000	0,1631	0,2870	0,5500
4	0,932 ± 0,002	1,172 ± 0,000	0,1712	0,3027	0,5261
5	0,919 ± 0,000	1,183 ± 0,000	0,1811	0,3163	0,5026
6	0,937 ± 0,000	1,165 ± 0,000	0,1677	0,2953	0,5370

Tabela 1. Composição global das linhas de amarrações e massa específica das fases superior e inferior do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C

LA	Massa específica (g/cm ³)		Global		
	Fase Superior	Fase Inferior	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}
1	0,956 ± 0,001	1,116 ± 0,001	0,1510	0,2810	0,5680
2	0,941 ± 0,000	1,134 ± 0,001	0,1611	0,2818	0,5570
3	0,910 ± 0,000	1,173 ± 0,000	0,1798	0,3031	0,5171
4	0,918 ± 0,000	1,164 ± 0,000	0,1712	0,3027	0,5261
5	0,904 ± 0,000	1,182 ± 0,000	0,1809	0,3160	0,5031
6	0,927 ± 0,000	1,153 ± 0,001	0,1666	0,2941	0,5393

A composição dos componentes de cada LA do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C obtidas através da resolução do sistema formado pelas Equações 4,7 e 10 esta representada na Tabela 12, na qual os dados estão expressos em frações mássicas.

Tabela 12. Frações mássicas das linhas de amarrações do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C

LA	Fase Superior			Fase Inferior		
	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}
1	0,0890	0,3580	0,5530	0,2693	0,1241	0,6066
2	0,0654	0,4083	0,5263	0,2956	0,1026	0,6018
3	0,0562	0,4315	0,5124	0,3174	0,0871	0,5955
4	0,0404	0,4780	0,4816	0,3498	0,0711	0,5792
5	0,0300	0,5164	0,4536	0,3719	0,0629	0,5652
6	0,0448	0,4639	0,4913	0,3357	0,0768	0,5876

A Tabela 13 apresenta a composição de cada componente das LAs do sistema constituído por etanol + fosfato de potássio dibásico + água a 35°C. As frações mássicas foram determinadas através da resolução do sistema formado pelas Equações 4, 8, e 11.

Tabela 13. Frações mássicas das linhas de amarrações do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C

LA	Fase Superior			Fase Inferior		
	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}	W _{SAL}	W _{ETOH}	W _{H2O}
1	0,0716	0,3971	0,5313	0,2680	0,1201	0,6119
2	0,0565	0,4338	0,5096	0,2920	0,1013	0,6067
3	0,0303	0,5229	0,4468	0,3442	0,0669	0,5888
4	0,0363	0,4980	0,4657	0,3322	0,0740	0,5938
5	0,0262	0,5424	0,4314	0,3563	0,0607	0,5830
6	0,0437	0,4716	0,4847	0,3175	0,0835	0,5990

5.3.4 Parâmetros de Equilíbrio

Na Tabela 14 estão os valores de comprimento das linhas de amarração (CLA) e Inclinação das Linhas de Amarração (ILA) dos dois sistemas obtidos. Além disso, estão expressas as diferenças entre a massa específica (ρ) da fase superior e inferior de cada LA de cada sistema.

Tabela 14. Comprimento e inclinação das linhas de amarrações, e diferença de massa específica (ρ) entre as fases

Linha de amarração (LA)	25 °C			35 °C		
	CLA	ILA	$\Delta \rho$	CLA	ILA	$\Delta \rho$
1	0,30	-1,30	0,141	0,34	-1,41	0,160
2	0,38	-1,33	0,182	0,41	-1,41	0,193
3	0,43	-1,32	0,204	0,55	-1,45	0,263
4	0,51	-1,32	0,240	0,52	-1,43	0,246
5	0,57	-1,33	0,264	0,58	-1,46	0,278
6	0,48	-1,33	0,228	0,47	-1,42	0,226

Através da Tabela 14 verifica-se que quanto maior o CLA, maior é diferença de massa específica entre as fases, este fato favorece a partição de biomoléculas. Quanto à inclinação das linhas de amarrações, as mesmas são influenciadas com a variação de temperatura. É possível observar que as linhas têm menor inclinação na temperatura de 35 °C.

As Figuras 12 e 13 mostram as LAs do sistema etanol + sulfato de amônio + água nas temperaturas de 25 e 35 °C, respectivamente.

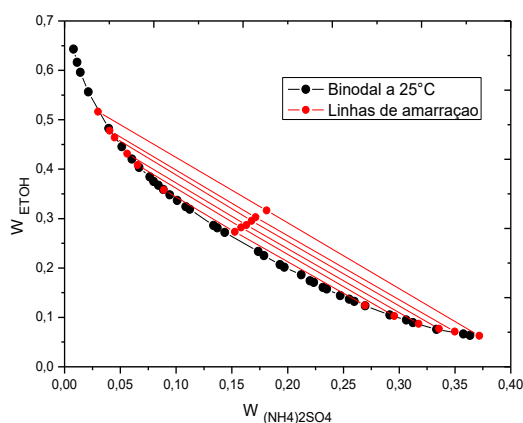


Figura 12. Linhas de amarração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 25°C

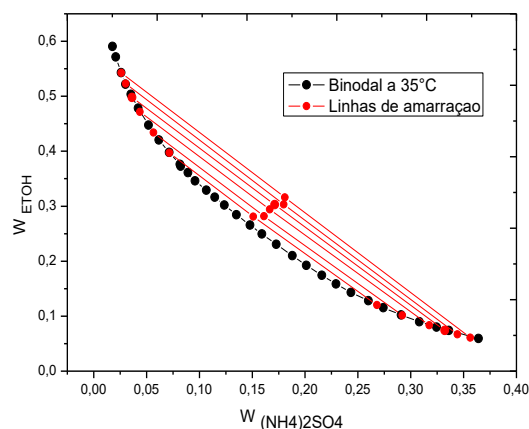


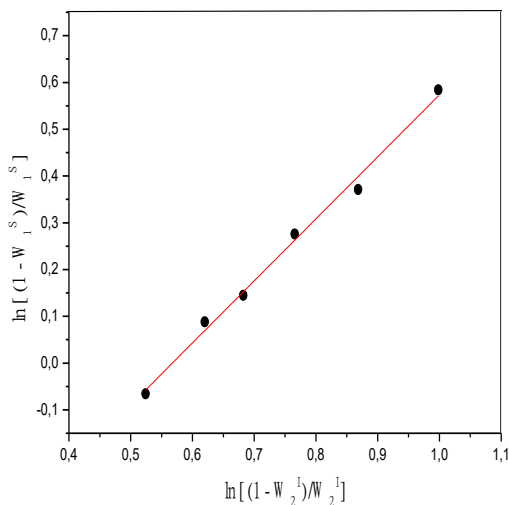
Figura 13. Linhas de Amarração do sistema etanol + sulfato de amônio + água a 35°C

As LAs são traçadas pela ligação dos pontos correspondentes a composição da fase superior e inferior de cada LA, a ligação entre esses pontos deve passar pelo ponto global correspondente a cada LA. Os extremos de cada LA devem sobrepor à curva binodal. Nesse caso, é possível observar uma boa sobreposição das linhas à curva binodal, além disso, apresentam boa linearidade dos pontos obtidos.

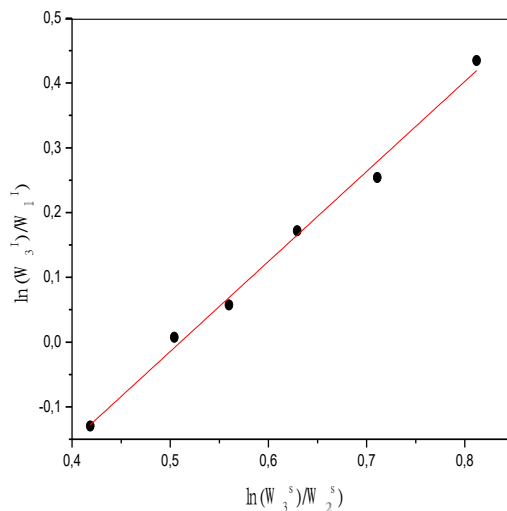
Segundo Silva e Loh (2006) quaisquer pontos que pertençam à região heterogênea e que estejam sobre a mesma linha de amarração forneceram fases que apresentarão propriedades termodinâmicas intensivas iguais, tais como densidade, volume molar, entalpia molar, etc., porém as variáveis termodinâmicas extensivas, como por exemplo, massa, volume, etc., serão diferentes.

A linearidade das linhas de amarração, de acordo com a aplicação das equações empíricas de Othmer & Tobias e Hand, pode ser observada na Figura 14.

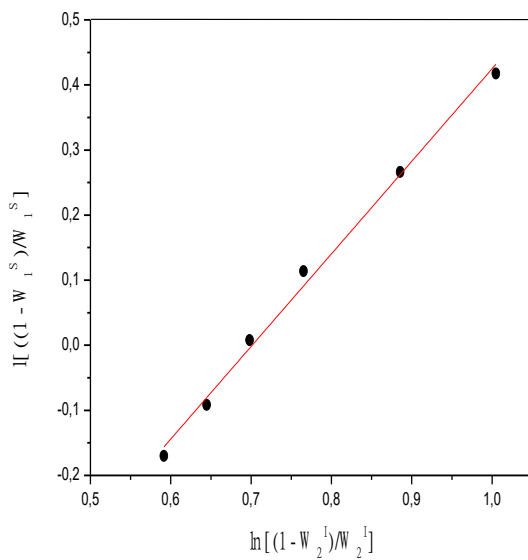
(a)



(c)



(b)



(d)

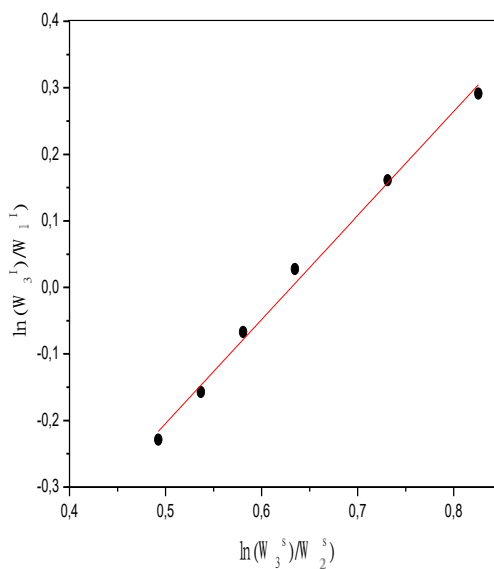


Figura 14. Método de Othmer e Tobias e Hand aplicados aos dois sistemas de etanol, sulfato de amônio e água.

As Figuras 14 (a) e (b) correspondem ao método de Othmer & Tobias nos sistemas de 25 e 35 °C, respectivamente. O método de Hand nas temperaturas de 25 e 35 °C é representado respectivamente pelas Figuras 14 (c) e (d).

Na Tabela 15 são apresentados os parâmetros das equações e os coeficientes de correlação (R^2) dos dois métodos aplicados. Verifica-se uma boa correlação dos dados de forma linear com R^2 próximo da unidade, mostrando que os dados dos sistemas são confiáveis.

Tabela 15. Parâmetros e Coeficientes de correlação (R^2) das Equações de Othmer & Tobias e Hand aplicados aos sistemas a 25 e 35 °C

Correlação	a	b	R^2
Othmer & Tobias (25°C)	1,3264	-0,7527	0,9940
Hand (25°C)	1,3902	-0,7096	0,9935
Othmer & Tobias (35°C)	1,4225	-0,9976	0,9951
Hand (35°C)	1,564	0,9866	0,9946

5.4 EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS DO AÇAÍ

Os resultados das oito extrações feitas variando pH, tempo e temperatura, de acordo com a Tabela 3, são apresentados nas Figuras 15 e 16.

Os resultados da concentração de antocianinas na fase superior em diferentes condições de extração via SAB está apresentado na Figura 15.

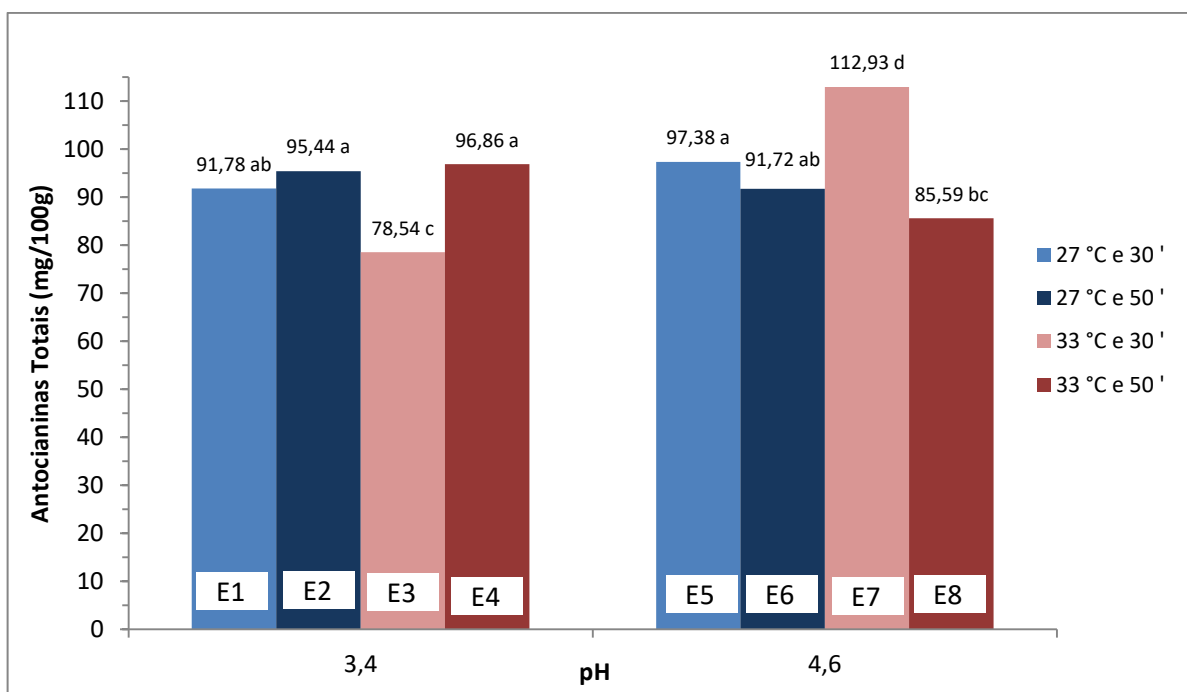


Figura 15. Concentração de antocianinas na fase superior extraídas do açaí via SAB

Letras minúsculas e iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Observa-se que nas extrações em pH 3,4 há um aumento na concentração de antocianinas quando tem-se maior tempo de extração, independente da variação de temperatura. É possível verificar que neste pH só houve diferença significativa entre o ensaio E3 em relação aos outros ensaios realizados no pH 3,4. No entanto, nas extrações realizadas no pH 4,6 houve um comportamento inverso, ocorrendo um decréscimo na concentração de antocianinas com o aumento do tempo de extração, independente da temperatura. Verifica-se ainda que no pH 4,6 as extrações apresentam maior diferença significativa entre si.

Wu et al. (2014) verificaram que uma temperatura mais elevada provoca o aumento da solubilidade do sal, acarretando na transferência da água da fase rica em etanol para a fase rica em sal, conduzindo mais rapidamente a fase de segregação sendo vantajoso para a extração. Porém, o aumento da temperatura provoca a degradação de antocianinas, isso justifica o decréscimo no teor desse composto nas extrações com maior tempo no pH 4,6. Além disso, o aumento do pH ocasiona alterações na estrutura da molécula e conseqüentemente a sua degradação. Por tanto, o aumento da temperatura é favorável somente no tempo de 30 minutos.

Comparando os dois pH's utilizados no processo de extração, nota-se que os ensaios realizados na temperatura de 27 °C não diferem significativamente, mesmo em diferentes tempos. Liu et al. (2013) verificaram o mesmo comportamento durante a extração de antocianinas da batata doce roxa, onde as variáveis tempo e temperatura não apresentaram influência significativa sobre o processo de extração ($p < 0,05$).

Com relação à concentração do composto de interesse, o ensaio E7 mostrou-se mais eficiente para o processo de extração, apresentando maior concentração de antocianinas na fase superior, apesar de um pH menos ácido.

A Figura 16 expressa os resultados obtidos através do processo de extração via SAB para o coeficiente de partição das antocianinas em diferentes condições de pH, tempo e temperatura.

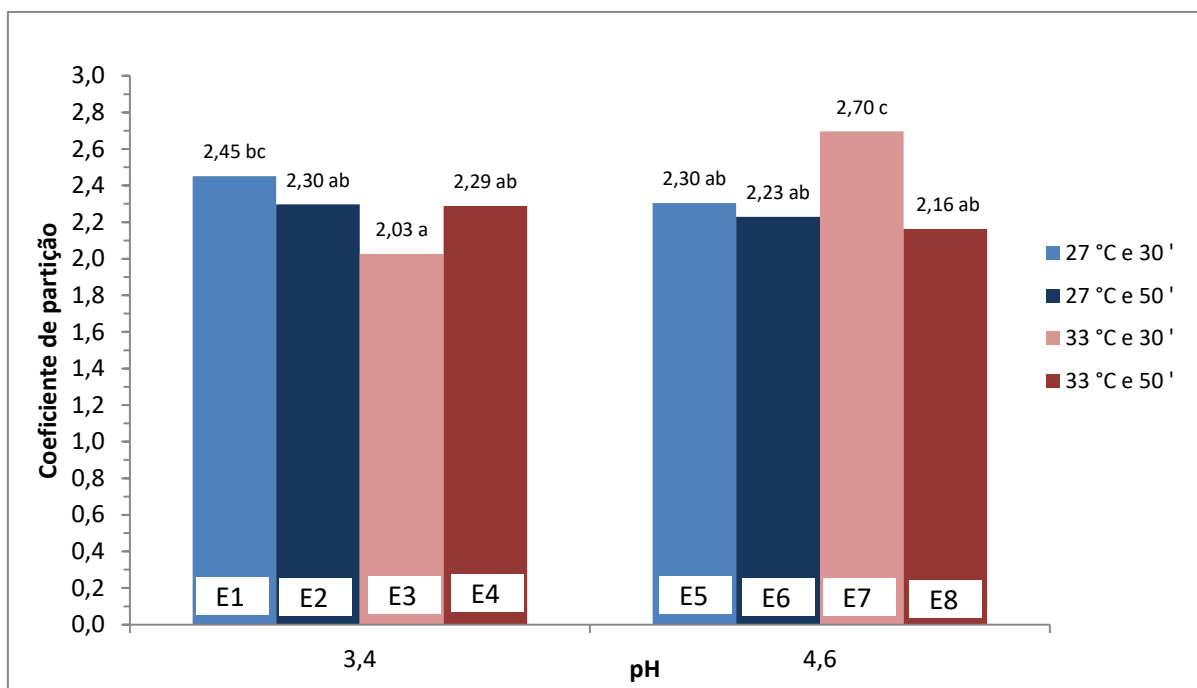


Figura 16. Coeficiente de partição de antocianinas no processo de extração via SAB

Letras minúsculas e iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Observando a Figura 16, verifica-se que variando o pH a diferença mais significativa foi entre os ensaios 3 e 7, realizados a 33 °C durante 30 minutos. Nesse caso, ocorreu um aumento no coeficiente de partição das antocianinas, passando do pH 3,4 para 4,6. Esse comportamento também foi observado no estudo feito por Wu et al. (2014), que constataram que o aumento do pH (3 para 4) foi proporcional ao coeficiente de partição. Os autores notaram que quando pH variou de 3 para 4, o coeficiente de partição melhorou de 9,52 a 17,46, justificando que possivelmente devido ao decréscimo do pH, as antocianinas combinadas gradualmente com H^+ enfraquecem a força de ligação da fase de topo, diminuindo o coeficiente de partição. No entanto, o aumento do pH pode aumentar o potencial elétrico, sendo este proporcional ao coeficiente de partição, desta forma acarretam em um maior coeficiente de partição. Isso pode ser observado no presente estudo, onde o Ensaio 7 apresentou um maior coeficiente de partição das antocianinas.

Os coeficientes de partição em todos os ensaios foram superiores a 1, o que indica que as antocianinas têm maior afinidade com a fase superior (rica em etanol), devido a maior polaridade da solução extratora, acarretando uma melhor extração com maior partição.

O Ensaio 7 foi o mais satisfatório analisando a concentração de antocianinas e o coeficiente de partição, apesar do maior pH e temperatura. Tabaraki e Nateghi (2011) relatam

que o aumento da temperatura de extração está correlacionado a um maior rendimento de extração, pois o aquecimento suave pode amaciar o tecido da planta, enfraquecendo a integridade da parede celular e aumentando a solubilidade fitoquímicos, permitindo mais compostos para distribuição no solvente.

A concentração de antocianinas na fase superior do ensaio 7 foi maior ao obtido pelo método de Lees e Francis (1972) realizado na caracterização do fruto que foi 109,55 g/100 g de fruto, ratificando a eficiência de extração da técnica utilizada.

CONCLUSÃO

Os dados de equilíbrio dos sistemas compostos por etanol, sulfato de amônio e água nas temperaturas de 25 e 35 °C delimitaram de maneira satisfatória as regiões monofásicas e bifásicas nos dois sistemas, apresentando boas correlações o que indica a confiabilidade dos dados.

No estudo da estabilidade as soluções de sulfato de amônio e etanol apresentaram resultados satisfatórios na conservação das antocianinas presentes no extrato de açaí até 60 minutos, sendo boas alternativas para aplicação na partição desta biomolécula. Foi verificado que na linha de amarração com maior comprimento (0.56) foi possível obter melhor partição das antocianinas utilizando a casca de açaí.

A melhor condição de extração deste estudo (33°C, 30 minutos e pH 4,6) apresentou um coeficiente de partição de antocianinas igual a 2,70, indicando a afinidade do composto pela fase rica em etanol. A quantificação de antocianinas na fase superior do melhor ensaio de extração via SAB foi 10.89% maior que o quantificado inicialmente pelo método de solução extratora convencional, ratificando a eficiência da técnica utilizada para extração.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1971.
- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Edited by Patricia Cunniff. 16^a ed., 3 rd, v. 2, cap. 37, 1997.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17^a ed., Washington, 2002.
- BARBOSA, A.A. **Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos formados por PEG, sulfato e água e partição de antocianina do Jamelão**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.
- BARREIROS; A. L. B. S.; DAVIS, J. M. DAVID, J. P. **Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas**. Quim. Nova, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
- BATISTA, C. C. R.; OLIVEIRA, M; S; ARAÚJO, M. E.; RODRIGUES, A. M. C.; BOTELHO, J. R. S.; SOUZA FILHO, A. P. S.; MACHADO, N. T.; CARVALHO JUNIOR, R. N. **Supercritical CO₂ extraction of açai (Euterpe oleracea) berry oil: Global yield, fatty acids, allelopathic activities, and determination of phenolic and anthocyanins total compounds in the residual pulp**. J. of Supercritical Fluids. Vol 107, 364–369, 2016.
- BEIJERINCK, M. W.; ZBL. BAKT. II Natur. , 627, 698. 1896
- BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C. **Atividade antioxidante do açai**. Nutrição Brasil. Vol. 10, No. 5, 310-316, 2011.
- BICHARA, C.M.G. ; ROGEZ, H. Açai (Euterpe oleracea Mart.). In: YAHIA, E.M.. (Org.). **Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits**, Volume 2: Açai to citrus. Cambridge: Woodhead Publishing, p.1-26, 2011.
- BOBBIO, F. O.; DRUZIAN, J. I.; ABRÃO, P.A; BOBBIO, P. A.; FADELLI, S. **Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (euterpe oleracea) Mart**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 20, n. 3, p. 388-390. 2000.
- BOWEN-FORBES, A. S.; ZHANG, Y.; NAIR M. G. **Antocianinas, antioxidante, propriedades anti-inflamatórias e anti-cancerígenos de frutas amora e framboesa**. Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 23, No. 6, p. 554-560, 2010.
- BRASIL. Ministerio da Saude, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Resolucao – RDC no 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento tecnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diario Oficial da Republica Federativa do Brasil**. Brasilia, 2003.
- CAI, Z. QU, Z.; LAN, Y.; ZHAO, S.; MA, X.; WAN, X.; WAN, Q.; JING, P. **Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes**. Food Chemistry. Vol. 197, 266–272, 2016.

CARDOSO, L. M.; NOVAES, R. D.; CASTRO, C. A.; NOVELLO, A. A.; GONÇALVES, R. V.; RICCI-SILVA, M. A.; RAMOS, H. J. O.; PELUZIO, M. C. G.; LEITE, J. P. V. **Chemical composition, characterization of anthocyanins and antioxidant potential of *Euterpe edulis* fruits: applicability on genetic dyslipidemia and hepatic steatosis in mice.** Nutr Hosp. Vol. 32, No. 2, 702-709, 2015.

CARDOSO, R. M.; BARRÉRE, A. P. N.; TROVÃO, F. C. S. **Os fitoquímicos e seus benefícios na saúde.** Educ Contin Saúde. Vol. 7, 106-109, 2009.

CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E., RODRÍGUEZ, J. A., & GALÁN-VIDAL, C. A. **Chemical Studies of Anthocyanins: A review.** Food Chemistry. Vol. 113, No. 4, p. 859–871, 2009.

COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products.** Boca-Raton, CRC Press, 2009.

FERREIRA, R. M. A.; FERNANDES, P. L. O.; FONTES, L. O.; RODRIGUES, A. P. M. S.; SILVA, L. T. **Antioxidantes e sua importância na alimentação.** Revista Verde. Vol.5, No.5, 26 – 30, 2010.

FREIRE, J. M.; ABREU, C. M. P.; ROCHA, D. A.; CORRÊA, A. D.; MARQUES, N. R. **Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango.** Ciência Rural. Vol.43, No.12, 2291-2296, 2013.

FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. **Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries.** Journal of Food Science. Chicago, v. 33, n. 1, p. 72-77, 1968.

GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B. **Thermoreactive water-soluble polymers nonionic surfactants and hydrogels as reagents in biotechnology.** Enzyme Microbial Technol, v.15, p. 354–366, 1993.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. **Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy.** Current protocols in Food Analytical Chemistry, 2001.

GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. **Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems.** Journal of Chemical & Engineering Data, 59, n. 3, p. 850-859, 2014

GORDON, A.; CRUZ, A. P.; CABRAL, L. M. C.; FREITAS, S. C.; TAXI, C. M. A. D.; DONANGELO, C. M.; MATTIETTO, R. A.; FRIEDRICH, M.; MATTA, V. M.; MARX, F. **Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açaí fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening.** Food Chemistry. Vol. 133, No. 2, 256-263, 2012.

GOTTLIEB, M. G. V.; SCHWANKE, C. H. A.; BODANESE, L. C.; CRUZ, I. B. M. **Status antioxidante, diabetes mellitus II e aterosclerose.** Revista Saúde e Pesquisa. Vol. 2, No. 1, 99-106, 2009.

HAND, D.B. **Dimeric distribution.** L. Phys, Chem., 34, p. 1961-200, 1930.

- HOSSEINIAN, F. S.; LI, W.; BETA, T. **Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat.** Food Chemistry. Vol. 109, 916–924, 2008.
- HUA, Z.; YUESHENG, D.; GE, X.; MENGLU, L.; LIYA, D.; LIJIA, A., ZHILONG, X. **Extraction and Purification of Anthocyanins from the Fruit Residues of Vaccinium uliginosum Linn.** J Chromat Separation Techniq. Vol. 4, No. 2, 1 – 5, 2013.
- KHAYATI, G.; GHOLITABAR, A. **Liquid–Liquid Equilibrium of Hydrophilic Alcohols with Three Different Salts of Chloride: Experiment and Correlation.** Journal of Chemical and Engineering. Vol. 61, No. 4, 1454 – 1461, 2016.
- LEES, D.H.; FRANCIS, F.G. **Standardization of pigment analysis in cranberries.** Hortscience. v. 7, p. 83-84, 1972.
- LISBETH, A.; PACHECO-PALENCIA; PALO, H.; STEPHEN T. T. **Phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage.** Food Research International. Vol. 40, No. 5, 620-628, 2007.
- LIU, X.; UM, T.; SUN, H.; ZHANG, M.; CHEN, J. **Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology.** Food Chemistry. Vol. 141, 3034–3041, 2013.
- MALCHER, E. S. L. T. **Influência da sazonalidade sobre a composição química e atividade antioxidante do açai (*Euterpe oleracea* Mart.)** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amapá, 2011.
- MAPA, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Relatório da Produção da Polpa de Açai no Estado do Pará. 2015.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J. **Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais.** Quim. Nova, Vol. 31, No. 5, 1218-1223, 2008.
- MERCHUK, J. C., ANDREWS, B. A., ASENJO, J. A. **Aqueous two-phase systems for proteinseparation studies on phase inversion.** Journal of Chromatography B, v. 711, p. 285-293, 1998.
- NEVES, L. T. B. C.; CAMPOS, D. C. S. C.; MENDES; J. K. S.; URNHANI, C. O.; ARAÚJO, K. G. M. **Qualidade de frutos processados artesanalmente de açai (*Euterpe oleracea* MART.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* MART.).** Rev. Bras. Frutic. Vol. 37, No 3, 729-738, 2015.
- NOVELLO, A. A. **Extração de antocianinas dos frutos do açai da Mata Atlântica (*Euterpe edulis* Martius) e sua atuação nas atividades antioxidantes e antiaterogênica em camundongos com aterosclerose.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2011.
- OSTWALD, W.; HERTEL, R. H.; KOLLOID Z. Z. **Polym.** , 47, 357.1929.
- OTHMER, D.F.; TOBIAS, P.E. **Tie-line correlation.** Ind. Eng. Chem., 34, p. 693–696, 1942.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S.T. **Chemical stability of acai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems.** Food Chemistry. Vol. 118, p. 17-25, 2010.

PAES, J.; DOTTA, R.; BARBERO, G. F. MARTÍNEZ, J. **Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry(*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO₂ and pressurized liquids.** J. of Supercritical Fluids. Vol. 95, 8–16, 2014.

PALACIO, D. N. M. **Concentração de suco clarificado de açaí por Osmose Inversa.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

PATRICIO, P. R. **Extração e purificação de antocianina utilizando sistemas aquosos bifásicos.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. 2012.

PEDRO, A. C.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. **Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability.** Food Food Chemistry. Vol. 191, 12–20, 2016.

REIN, M. J.; HEINONEN, M. **Stability and enhancement of berry juice color.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 52, No.10, 3106-3114, 2004.

REIS, I.A.O.; SANTOS, S.B.; PEREIRA, F.D.S.; SOBRAL, C.R.S.; FREIRE, M.G.; FREITAS, L.S.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. **Extraction and Recovery of Rutin from Acerola Waste using Alcohol-Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems .** Separation Science and Technology. Vol. 49, No. 5, p. 656-663, 2014.

ROCHA, A. P. M.; CARVALHO, L. C. R. M.; SOUSA, M. A. V.; MADEIRA, S. V. F.; SOUSA, P. J. C.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V. B.; RESENDE, A. C.; SOARES DE MOURA, R. **Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat.** Vasc Pharmacol. Vol. 46, No 2, 97-104, 2007.

RODRIGUES, S.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S.; SOUSA, A. D.; NARAIN, N. **Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel.** Industrial Crops and Products. Vol. 69, 400–407, 2015.

ROGEZ, H.; POMPEU, D.R.; AKWIE, S. N. T.; LARONDELLE, Y. **Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açaí fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits.** Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 24, p. 796-800, 2011.

RUFINO, M. S. M.; AÇVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMENEZ, P.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. **Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil.** Food Chemistry. Vol.121, p. 996-1002, 2010.

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

SANABRIA, N; SANGRONIS, E. **Caracterización del acai o manaca (*Euterpe oleracea* Mart.): un fruto del Amazonas.** Archivos Latinoamericanos de Nutricion. v. 5, n. 1, p. 94-98. 2007.

SHARMA, S. J.; GUPTA, R. C.; SINGH, S.; BANSAL, A. K. SINGH, I. P. **Stability of anthocyanins- and anthocyanidins-enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun')**. Food Chemistry. Vol. 190, 808–817, 2016.

SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. **Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe Oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos**. Quim. Nova, Vol. 36, No. 3, 400-406, 2013.

SILVA, L. H. M. da; LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas**. Quimica Nova, v. 29, n. 6, p.1345-1351, 14 jun. 2006.

SOUSA, R. L. **Sistemas aquosos bifásicos formados por constituintes não convencionais para purificação de enzimas lipolíticas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes. 2014.

TABARAKI, R., NATEGHI, A. **Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology**. Ultrasonics Sonochemistry, Vol. 18, No. 6, 1279-1286, 2011.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A.; **Comparação de métodos para quantificação de antocianinas**. Revista Ceres. Vol. 55, No. 4, p. 297-304, 2008.

TREYBAL, R. E. **Liquid Extraction**. New York: McGraw-Hill, 1951.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTI, M. P.; BORRAS, E.; AROLA, L. **Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols**. Journal of Chromatography A. Vol. 1216, 7143–7172, 2009.

WANG, Y.; YAN, Y. S.; HU, S. P.; HAN, J., XU, X. H. **Phase diagrams of ammonium sulfate + ethanol/1-propanol/2-propanol + water aqueous two-phase systems at 298.15 K and correlation**, J. Chem. Eng. Vol. 55, No. 2, p 876-886, 2010.

WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; YANG, L. **Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.)**, Food Chemistry. Vol. 129, p. 443–453, 2011.

WU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W.; HAN, J.; LIU, Y.; HU, Y.; NI, L. **Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system**. Separation and Purification Technology. Vol. 124, 170–178, 2014.

WYCOFF, W.; LUO, R.; SCHAUSS, A. G.; NEAL-KABABICK, J.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MAIA, J. G. S.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M. ; SMITH, R. E. **Chemical and nutritional analysis of seeds from purple and white açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 41, 181–187, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Frações mássicas dos pontos da Curva Binodal referentes ao Sistema composto por Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C

Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}	Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}
1	0,3635	0,0634	0,5732	20	0,1436	0,2719	0,5845
2	0,3576	0,0662	0,5762	21	0,1369	0,2811	0,5821
3	0,3334	0,0757	0,5910	22	0,1336	0,2859	0,5805
4	0,3123	0,0895	0,5982	23	0,1122	0,3189	0,5689
5	0,3063	0,0945	0,5992	24	0,1086	0,3243	0,5672
6	0,2915	0,1050	0,6036	25	0,1009	0,3365	0,5626
7	0,2695	0,1234	0,6072	26	0,0944	0,3481	0,5575
8	0,2598	0,1322	0,6080	27	0,0885	0,3591	0,5524
9	0,2551	0,1367	0,6082	28	0,0841	0,3672	0,5487
10	0,2471	0,1439	0,6090	29	0,0799	0,3749	0,5452
11	0,2350	0,1575	0,6076	30	0,0764	0,3842	0,5394
12	0,2317	0,1606	0,6077	31	0,0669	0,4035	0,5296
13	0,2235	0,1707	0,6058	32	0,0603	0,4203	0,5194
14	0,2200	0,1741	0,6060	33	0,0513	0,4453	0,5034
15	0,2122	0,1862	0,6016	34	0,0395	0,4825	0,4781
16	0,1970	0,2014	0,6017	35	0,0214	0,5564	0,4222
17	0,1931	0,2068	0,6001	36	0,0141	0,5959	0,3900
18	0,1788	0,2250	0,5962	37	0,0112	0,6162	0,3727
19	0,1737	0,23347	0,59283	38	0,0080	0,6430	0,3490

ANEXO B – Frações mássicas dos pontos da Curva Binodal referentes ao Sistema composto por Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C

Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}	Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}
1	0,3982	0,0397	0,5621	18	0,3982	0,0397	0,5621
2	0,3642	0,0594	0,5765	19	0,3642	0,0594	0,5765
3	0,3360	0,0740	0,5900	20	0,3360	0,0740	0,5900
4	0,3244	0,0799	0,5957	21	0,3244	0,0799	0,5957
5	0,3081	0,0899	0,6020	22	0,3081	0,0899	0,6020
6	0,2909	0,1022	0,6069	23	0,2909	0,1022	0,6069
7	0,2741	0,1155	0,6104	24	0,2741	0,1155	0,6104
8	0,2600	0,1281	0,6119	25	0,2600	0,1281	0,6119
9	0,2434	0,1431	0,6135	26	0,2434	0,1431	0,6135
10	0,2293	0,1587	0,6120	27	0,2293	0,1587	0,6120
11	0,2159	0,1742	0,6099	28	0,2159	0,1742	0,6099
12	0,2012	0,1925	0,6063	29	0,2012	0,1925	0,6063
13	0,1880	0,2100	0,6020	30	0,1880	0,2100	0,6020
14	0,1727	0,2306	0,5967	31	0,1727	0,2306	0,5967
15	0,1591	0,2496	0,5913	32	0,1591	0,2496	0,5913
16	0,1479	0,2655	0,5867	33	0,1479	0,2655	0,5867
17	0,1351	0,2845	0,5804				

Anexo C – Dados da curva de calibração do Sistema Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 25°C

Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}	ρ (g/cm³)
1	0,3722	0,0458	0,5819	0,3722 ± 0,0002
2	0,3123	0,0895	0,5982	0,3123 ± 0,0001
3	0,2580	0,1317	0,6104	0,2580 ± 0,0001
4	0,1949	0,2012	0,6039	0,2012 ± 0,0003
5	0,1432	0,2690	0,5878	0,2690 ± 0,0004
6	0,1115	0,3169	0,5716	0,3169 ± 0,0002
7	0,0843	0,3660	0,5497	0,3660 ± 0,0007
8	0,0390	0,4844	0,4767	0,4767 ± 0,0003
9	0,0214	0,5499	0,4287	0,4287 ± 0,0005
10	0,0073	0,6564	0,3363	0,3363 ± 0,0001

ANEXO D – Frações mássicas dos pontos da Curva Binodal referentes ao Sistema composto por Etanol + Sulfato de Amônio + Água a 35°C

Ponto	W_{SAL}	W_{ETOH}	W_{H2O}	ρ (g/cm³)
1	0,010146	0,519257	0,470597	0,9138 ± 0,0002
2	0,014399	0,469683	0,515918	0,9348 ± 0,0005
3	0,021951	0,417456	0,560593	0,9445 ± 0,0003
4	0,030323	0,3861	0,583578	0,9559 ± 0,0001
5	0,039312	0,36312	0,597568	0,9664 ± 0,0001
6	0,080303	0,267937	0,65176	1,0154 ± 0,0002
7	0,108549	0,22527	0,666181	1,0458 ± 0,0002
8	0,151544	0,177589	0,670867	1,0914 ± 0,0003
9	0,203464	0,127735	0,668801	1,1498 ± 0,0001
10	0,217127	0,114496	0,668377	1,1666 ± 0,0006
11	0,259492	0,079265	0,661242	1,2173 ± 0,0003
12	0,286985	0,061408	0,651607	1,2503 ± 0,0003
13	0,31611	0,044416	0,639474	1,2909 ± 0,0006
14	0,320938	0,041939	0,637123	1,2948 ± 0,0003
15	0,397407	0,01794	0,584653	1,3894 ± 0,0002