



PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAÍ UTILIZANDO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Adriana Marcela Moreno Saboya

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química PPGEQ/ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadore(s):

Prof^ª. Dr^ª. Geormenny Rocha dos Santos

Prof^ª. Dr^ª. Mariana Conceição da Costa

BELÉM, PA - BRASIL
FEVEREIRO DE 2021

PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAÍ UTILIZANDO EQUILIBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Adriana Marcela Moreno Saboya

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PPGEQ/ITEC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Dr^a. Geormenny Rocha dos Santos,
(PPGEQ/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof^a.Dr^a. Mariana Conceição da Costa,
(PPGEQ/UNICAMP-Coorientador)

Prof. Dr. Luiz Henrique Fasolin,
(FEA/UNICAMP-Membro Externo)

Prof. Dr. Davi Do Socorro Barros Brasil
(PPGEQ/ITEC/UFPA -Membro Interno)

BELÉM, PA – BRASIL

FEVEREIRO DE 2021



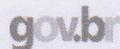
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
 INSTITUTO DE TECNOLOGIA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, NA ÁREA DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS – **ENGENHARIA DE PROCESSOS ORGÂNICOS**, REALIZADA EM 04 DE FEVEREIRO DE 2021, TENDO INÍCIO ÀS 14:32 HS, APRESENTADA PELA CANDIDATA **ADRIANA MARCELA MORENO SABOYA** DIANTE DA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELOS MEMBROS: **Profa. Dra. GEORMENNY ROCHA DOS SANTOS** – ORIENTADORA, **Profa. Dra. MARIANA CONCEIÇÃO DA COSTA** – COORIENTADORA, **Prof. Dr. DAVI DO SOCORRO BARROS BRASIL** E **Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE FASOLIN**. A DISSERTAÇÃO INTITULADA **"PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAÍ UTILIZANDO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS"** FOI EXPOSTA EM SESSÃO PÚBLICA POR VIDEOCONFERÊNCIA VIA "GOOGLE MEET" PELA CANDIDATA DURANTE 40 MINUTOS. EM SEGUIDA FOI ARGÜIDO ORALMENTE PELOS MEMBROS DA BANCA, DEMONSTRANDO SUFICIÊNCIA DE CONHECIMENTO NO TEMA ABORDADO. A BANCA EXAMINADORA OPINOU DE FORMA FAVORÁVEL À APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO COM AS RESTRIÇÕES DE QUE A CANDIDATA DEVE EFETUAR AS CORREÇÕES E REVISÕES SUGERIDAS PELA BANCA NO ATO DA DEFESA. NA FORMA REGULAMENTAR FOI LAVRADA A PRESENTE ATA, ASSINADA PELOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA E PELA CANDIDATA.

Belém, 04 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:



Documento assinado digitalmente
 Geormenny Rocha dos Santos
 Data: 25/02/2021 12:01:15-0300
 CPF: 399.814.102-25

PRESIDENTE: _____

MEMBROS: _____

Davi do S. B. Brasil

CANDIDATA: _____

Adriana Marcela Moreno Saboya

Documento assinado eletronicamente por **Mariana Conceição da Costa, PROFESSOR DOUTOR II**, em 05/02/2021, às 10:50 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Fasolin, PROFESSOR DOUTOR I**, em 05/02/2021, às 16:20 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **64CB814A 16964CE4 A4D23D1B 8E4C1175**



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, NA ÁREA DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS - ENGENHARIA DE PROCESSOS ORGÂNICOS, REALIZADA EM 04 DE FEVEREIRO DE 2021, TENDO INÍCIO ÀS 14:32 HS, APRESENTADA PELA CANDIDATA ADRIANA MARCELA MORENO SABOYA DIANTE DA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELOS MEMBROS: *Prof. Dra. GEORMENNY ROCHA DOS SANTOS - ORIENTADORA, Prof. Dra. MARIANA CONCEIÇÃO DA COSTA - COORIENTADORA, Prof. Dr. DAVI DO SOCORRO BARROS BRASIL E Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE FASOLIN*. A DISSERTAÇÃO INTITULADA "PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAI UTILIZANDO EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS" FOI EXPOSTA EM REDE SOCIAL PÚBLICA POR VIDEOCONFERÊNCIA VIA "GOOGLE MEET" PELA CANDIDATA DURANTE 40 MINUTOS. EM SEGUIDA FOI ARGUIDO ORALMENTE PELOS MEMBROS DA BANCA, DEMONSTRANDO SUFICIÊNCIA DE CONHECIMENTO NO TEMA ABORDADO. A BANCA EXAMINADORA OPINOU DE FORMA FAVORÁVEL À APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO COM AS RESTRIÇÕES DE QUE A CANDIDATA DEVE EFETUAR AS CORREÇÕES E REVISÕES SUGERIDAS PELA BANCA NO ATO DA DEFESA. NA FORMA REGULAMENTAR FOI LAVRADA A PRESENTE ATA, ASSINADA PELOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA E PELA CANDIDATA.

Belém, 04 de fevereiro de 2021

BANCA EXAMINADORA:



PRESIDENTE:

MEMBROS:

[Handwritten signatures of examiners]

CANDIDATA:

[Handwritten signature of candidate]
Adriana Marcela Moreno Saboya

**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)**

M843p Moreno Saboya, Adriana Marcela.
PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAÍ UTILIZANDO
EQUILÍBRIO LÍQUIDO - LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES
EUTÉTICOS PROFUNDOS / Adriana Marcela Moreno Saboya. —
2020.
xix,101 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Geormenny Rocha dos Santos
Coorientação: Prof^ª. Dra. Mariana Conceição da Costa
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Belém, 2020.

1. Equilíbrio Líquid-Líquido. 2. DES. 3. Designer
solvents. 4. Partição de antocianinas. I. Título.

CDD 660.28

Dedico este trabajo a ti, madre, Maria Anatilde Saboya quien siempre me ha apoyado y guiado hasta ser la persona que soy.

Te amo Mamá.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, por ter me guiado e protegido ao longo do caminho.

Agradeço a minha mãe Maria Anatilde Saboya, pai Bernardo Antonio Moreno e família por sempre ser meu suporte e minha companhia nos momentos mais difíceis.

Á professora Dr^a. Geormenny Rocha dos Santos pela orientação, conhecimento, paciência e disposição em desenvolver este trabalho e estar presente nos momentos mais críticos.

Á professora Dra. Mariana C. da Costa por ter me recebido em Campinas-SP e me brindar a oportunidade de fazer parte da equipe LEF/UNICAMP.

A minha equipe de trabalho Izadora Ramos, Deyvid Reyes, Eliane Oliveira e Elisangela Andrade por seu apoio no LEF/UFPA. Ao professor Lênio Farias pelo apoio e conselhos.

Aos colegas de laboratório do LEF/UNICAMP Fernanda Pelaquim, Túlio Oliveira, Débora Nascimento, Ludmila Prado e Rafael Macedo pelos grandes aportes de conhecimentos e colaboração durante minha estadia em Campinas.

Ao meu melhor amigo Andrés Pérez pela paciência, apoio, amor e suporte nessa travessia juntos, apesar da distância, você sempre esteve ao meu lado.

Aos meus amigos Cindy Torres, Josué Espinal, Luiz Teixeira, Adriano Lucena e a família Texeira por ser uma família no Brasil e uma força nessa etapa.

A todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram para o desenvolvimento deste projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Á CAPES pelo suporte financeiro – projeto PROCAD-AMAZONIA.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

(Bill Gates)

PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS DE AÇAÍ UTILIZANDO SISTEMAS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO A BASE DE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS

Adriana Marcela Moreno Saboya

Orientador(es): Pra. Dra. Geormmeny Rocha dos Santos

Pra. Dra. Mariana Conceição da Costa

Área de concentração: Desenvolvimento de processos.

A antocianina do açaí é um dos compostos mais atrativos industrialmente, utilizado como corante natural devido à coloração roxa. Uma técnica alternativa para a extração de biomoléculas é a extração utilizando os sistemas de equilíbrio líquido-líquido (ELL), constituídos por Solventes Eutéticos Profundos, do inglês *Deep Eutectic Solvents* (DESs) caracterizados por serem econômicos, eficientes e de baixa toxicidade. Assim, este trabalho teve como objetivo determinar dados de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas a base de DES: ChCl:GLI (cloreto de colina:glicose) + 2-propanol + água e ChCl:SAC (cloreto de colina:sacarose) + 2-propanol + água em duas temperaturas, 25°C e 35°C e avaliar suas aplicações na partição de antocianinas do açaí. Primeiramente, realizou-se a caracterização físico-química do açaí liofilizado. Em seguida, por meio do planejamento fatorial Box-Behnken, realizou-se a análise e otimização do processo de extração para verificar a influência das condições operacionais (razão água:2-propanol, razão sólido:líquido, temperatura) da extração de antocianinas e polifenóis totais do açaí liofilizado. Uma vez encontradas as condições ótimas de extração, foram preparados os DES utilizados nos sistemas ELL. Também foram caracterizadas as propriedades térmicas com DSC e estruturais com FTIR para cada um dos solventes. Para conhecer o comportamento de fases dos DES em misturas contendo água e 2-propanol, os dados de equilíbrio líquido-líquido foram determinados: as curvas binodais foram construídas pelo método de ponto de névoa, e as linhas de amarração quantificadas por gravimetria e métodos analíticos (HPLC e Karl-Fischer). Os sistemas foram caracterizados como quaternários e os dados experimentais foram correlacionados com o modelo NRTL, obtendo-se um desvio quadrático médio (RMSD) de 0,438%. A partição das antocianinas nos sistemas em ELL foi realizada utilizando os extratos de antocianinas obtidos nas condições ótimas. Finalmente foi comprovado que os componentes individuais do DES têm uma alta afinidade com as antocianinas, evidenciando a migração total das

biomoléculas na fase inferior. Foi quantificado o coeficiente de partição dos polifenóis totais obtendo valores de $K > 1$ indicando a preferência das biomoléculas na fase inferior e porcentagem de eficiência de extração (EE) de 70% com sistemas formados por ChCl + Glicose + 2-propanol + água, confirmando o potencial uso desses sistemas para extração de pigmentos naturais e visando um provável aproveitamento da separação de biomoléculas apolares (lipídeos do açaí) na fase rica de álcool.

Palavras-chaves: Sistemas ELL, DES, *Designer solvents*, partição de antocianinas.

PARTITION OF AÇAÍ ANTHOCIANINS USING LIQUID-LIQUID EQUILIBRIUM BASED ON DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Advisor(s): Pra. Dra. Geormmeny Rocha dos Santos

Pra. Dra. Mariana Conceição da Costa

Research area: Development of processes.

ABSTRACT. The anthocyanin in the acai fruit is one of the most attractive industrial compounds. It is used as a natural dye due to its violet pigment and its antioxidant power. An alternative technique for the extraction of biomolecules is extraction using Liquid-Liquid Equilibrium (LLE) systems, composed of Deep Eutectic Solvents (DESs) characterized by being economical, efficient and of low toxicity to the environment and human body. Therefore, this study aimed to determine liquid-liquid equilibrium data of DES-based systems: ChCl:GLI (choline chloride:glucose) + isopropanol + water and ChCl:SAC (choline chloride:saccharose) + isopropanol + water at temperatures of 25°C and 35°C, and to assess its application in the partition of the acai anthocyanins. First, the physical-chemical characterization of the lyophilized acai was carried out. Second, Box-Behnken factorial design was applied to analyze and optimize the extraction process to evaluate the influence of experimental conditions on the extraction of anthocyanin and total polyphenols from the lyophilized acai. Once the optimization conditions were found, the DESs that would be used in the LLE system were prepared. Furthermore, the thermal and structural properties for each DESs were determined with DSC and FTIR respectively. Third, aiming to research DESs behavior with water and isopropanol mixtures in equilibrium phases, the LLE data at 25°C and 35°C were determined. The binodal curves were obtained by cloud point titration, and the tie lines were determinate for gravimetric and analytical (HPLC and Karl-fischer) methods. The systems studied were characterized as quaternary systems and the experimental LLE data were correlated by NRTL obtaining a mean quadratic deviation (RMSD) of 0.438%. The anthocyanin partition in ELL was carried out using the anthocyanin extract obtained in optimal conditions. Finally, it was proven that the individual components of DESs have a high affinity with the anthocyanins, showing the total migration of the biomolecules in the bottom phase. The partition coefficients of total polyphenols (K^{PT}) were higher than 1, showing the preference of biomolecules in the bottom phase and the extraction efficient (%EE) of 70% with ChCl + Glucose + isopropanol + water system. This result confirmed

the potential of using these systems to extract natural pigments aiming at a probable use of the separation of nonpolar biomolecules (acai lipids) in the alcohol-rich phase.

KEY-WORDS: ELL systems, DESs, designer solvents, anthocyanin partition.

Sumário

CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 - MOTIVAÇÃO	20
1.2 – OBJETIVOS	22
1.2.1 – Objetivo geral.....	22
1.2.2 – Objetivos específicos.....	22
CAPITULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 - AÇAÍ	23
2.1.1 – Estrutura e estabilidade química das antocianinas	23
2.1.2 – Extração de antocianinas do açaí por métodos convencionais.....	27
2.1.3 – Extração de antocianinas de açaí com métodos não convencionais.....	28
2.2 – SOLVENTES EUTETICOS PROFUNDOS	29
2.2.1 – Aplicações do DESs para extração de antocianinas	32
2.3 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) A BASE DE DES	33
2.3.1 – Partição de biomoléculas com ExLL a base de DES	33
2.3.2 – Equilíbrio líquido-líquido (ELL).....	35
2.3.2.1 – Modelo NRTL (Non- Random two-liquid):.....	36
2.3.2.2 – Diagramas de equilíbrio	38
3.1. AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (ETAPA 1)	43
3.2 – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ETAPA 2)	43
3.3 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DES:	46
3.4 – DETERMINAÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETAPA 3)	48
3.5 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS E POLIFENÓIS TOTAIS (ETAPA 4)	52
CAPITULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 – AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL (ETAPA 1):	54
4.2 – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ETAPA 2)	54
4.3 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DESs (ETAPA 2)	65
4.4 – DETERMINAÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETAPA III)	69
4.5 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) -PARTIÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS	83
CAPITULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	88
5.1 – CONCLUSÕES	88
5.2 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÉNDICE A	95
APENDICE B	98
APENDICE C	99
APENDICE D	100
APENDICE E.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Estrutura química das antocianinas.....	23
Figura 2.2	Estrutura das antocianinas predominantes do açai.....	24
Figura 2.3	Estrutura do cátion <i>flavilium</i>	25
Figura 2.4	Transformação estrutural das antocianinas em suas bases quinodais....	25
Figura 2.5	Transformação da estrutura química das antocianinas por hidratação em formas hemiacetais e chalconas.....	26
Figura 2.6	Diagrama ESL da mistura ChCl:Ureia.....	29
Figura 2.7	Diagrama esquemático ESL da mistura real e ideal ChCl:Ureia.....	30
Figura 2.8	Estrutura ChCl e os sítios ativos de ligações.....	30
Figura 2.9	Esquema das ligações de hidrogênio influenciadas pela adição de água.....	31
Figura 2.10	Extração seletiva dos corantes têxteis Sudan III e PA29 com sistemas bisáfcicos a base de DES.....	34
Figura 2.11	Esquema de diagrama de fases em coordenadas retangulares.....	38
Figura 2.12	Esquema das linhas de amarração no diagrama de fases.....	39
Figura 3.1	Esquema dos sistemas multicomponentes estudados em equilíbrio líquido-líquido (ELL).....	41
Figura 3.2	Fluxograma da metodologia implementada.....	42
Figura 3.3	Processo de extração de antocianinas ao abrigo da luz.....	44
Figura 4.1	Superfície de resposta e curvas de contorno ATM.....	59
Figura 4.2	Superfície de resposta e curvas de contorno PT.....	60
Figura 4.3	Gráfico da distribuição dos resíduos para o modelo de ATM.....	61
Figura 4.4	Gráfico de distribuição dos resíduos para PT.....	62
Figura 4.5	Distribuição normal para ATM.....	62
Figura 4.6	Distribuição normal para PT.....	63
Figura 4.7	Função de desejabilidade para ATM e PT.....	64
Figura 4.8	Preparação do DES.....	65
Figura 4.9	Termograma DSC do ChCl:GLI com 10% (p/p) de água.....	65
Figura 4.10	Termograma DSC do ChCl:SAC com 10% (p/p) de água.....	66
Figura 4.11	Espectro FTIR do cloreto de colina puro (-●-), glicose pura (---) e ChCl:GLI (—).....	67
Figura 4.12	Espectro FTIR do cloreto de colina de colina puro (-●-), sacarose pura (---) e ChCl:SAC (—).....	68
Figura 4.13	Curvas binodais dos sistemas.....	70
Figura 4.14	Curvas binodais dos sistemas: a) ChCl:GLI + 2-propanol + água a 25°C presente estudo (□) e literatura (◻), b) ChCl:GLI + 2-propanol + água a 35°C (□), ChCl:SAC + 2-propanol + água a 25°C (○) e 35°C (◊).....	71
Figura 4.15	Linhas de amarração calculadas por Merchuck.....	72
Figura 4.16	Curvas binodais dos sistemas quaternários.....	78
Figura 4.17	Linhas de amarração sistemas ChCl +Glicose + 2-propanol + água.....	80
Figura 4.18	Linhas de amarração sistemas ChCl +Sacarose +2-propanol+água.....	80
Figura 4.19	Partição de ATM e PT em sistemas bifásicos.....	84

Figura 4.20	a) Partição de antocianinas em sistema ChCl + GLI +2-propanol+água a 25°C, b) Partição de antocianinas em sistemas ChCl +SAC+2-propanol+água a 25°C.....	85
Figura 4.21	Coeficiente de partição de PT de linhas de amarração: L2 (■), L4 (■), L6 (■).....	85
Figura 4.22	%EE de PT de linhas de amarração: L2 (■), L4 (■),L6 (■).....	86
Figura E1	Cromatogramas para análise de HPLC.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Valores de antocianinas do açáí encontradas na literatura.....	28
Tabela 2.2	Valores de polifénóis totais do açáí na literatura.....	28
Tabela 3.1	Propriedades dos reagentes utilizados.....	40
Tabela 3.2	Variáveis operacionais e níveis aplicados no planeamento Box-Behnken.....	44
Tabela 3.3	Planeamento Experimental por Box-Behnken.....	45
Tabela 3.4	Relação molar das misturas eutéicas profundas.....	47
Tabela 4.1	Composição centesimal do açáí liofilizado.....	54
Tabela 4.2	Matriz de experimento do planeamento Box-Behnken.....	55
Tabela 4.3	Estimativa dos efeitos e probabilidade de significância.....	57
Tabela 4.4	Análise de variância (ANOVA) para ATM.....	57
Tabela 4.5	Análise de variância (ANOVA) para PT.....	58
Tabela 4.6	Análise de resíduos dos modelos propostos para as respostas.....	63
Tabela 4.7	Dados experimentais das linhas de amarração por Merchuck dos sistemas bifásicos a base de ChCl:GLI.....	73
Tabela 4.8	Dados experimentais das linhas de amarração por Merchuck dos sistemas bifásicos a base de ChCl:SAC.....	74
Tabela 4.9	Dados ELL experimentais por métodos analíticos.....	76
Tabela 4.10	Dados da razão molar do DES.....	77
Tabela 4.11	Parâmetros de interação binária dos modelos NRTL para os sistemas estudados.....	81
Tabela 4.12	Desvio médio quadrático de cada sistema.....	81
Tabela 4.13	Dados de pH e densidade de cada uma das fases dos sistemas.....	82
Tabela 4.14	Avaliação dos critérios de seleção dos sistemas bifásicos para este estudo.....	83
Tabela A1	Dados experimentais da curva binodal em fração mássica (w_i) para sistemas ChCl + GLI + 2-propanol + água, a 25°C e 35°C.....	95
Tabela A2	Dados experimentais da curva binodal em fração mássica (w_i) para sistemas ChCl + SAC + 2-propanol + água, a 25oC e 35oC.....	97
Tabela B1	Dados experimentais das linhas de amarração por gravimetria.....	98
Tabela C1	Dados experimentais de %w ^{ANT} em cada fase.....	99
Tabela C2	Dados experimentais de %w ^{PT} em cada fase.....	99
Tabela D1	Valores de K ^{PT} dos sistemas estudados.....	100
Tabela D2	Valores de %EE ^{PT} dos sistemas estudados.....	100

NOMENCLATURA

AG	Ácido Gálico
AGE	Ácido Gálico equivalente
ANOVA	<i>Analyse of variance</i>
ATM	Antocianinas monoméricas
cia-3-gli	Cianidina-3-glicosídeo
cia-3-rut	Cianidina-3-rutosídeo
CLA	Comprimento da linha de amarração
DES	Deep eutectic solvente
DH	Doador de hidrogênio
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
ELL	Equilíbrio líquido-líquido
ESL	Equilíbrio sólido-líquido
ExLL	Extração líquido-líquido
ExSL	Extração sólido líquido
FD	Factor de diluição
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
HPLC	<i>High performance Liquid Cromatography</i>
ILA	Inclinação da linha de amarração
ILA	Inclinação da linha de amarração
KF	<i>Karl Fischer</i>
NRTL	<i>Non-Randow Two Liquid</i>
PCC	Planejamento composto central
PCCR	Planejamento composto central rotacional
PT	Polifenóis Totais
RH	Receptor de hidrogênio
RMF	Residual mineral fixo
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
UV-vis	Ultravioleta visível

COMPOSTOS QUÍMICOS

HCl	Ácido clorídrico
ChCl	Cloreto de colina
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
PPG 400	Polipropilenoglicol 400
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Absorbância
ϵ	Absortividade molar
K _i	Coefficiente de distribuição do componente i
FI	Fase Inferior
FS	Fase Superior
x_i	fração molar do componente i
M _w	Massa molecular
P	Pressão
T	Temperatura
T _g	Transição vítrea
\hat{f}_i	Fugacidade do componente i
γ_i	Coefficiente de atividade
G ^E	Energia livre de Gibbs em excesso
α_{ij}	Parâmetro de não aleatoriedade
τ_{ij}	Parâmetro de energia de interação binária ij no modelo NRTL
g_{ij}	Parâmetro de interação energética do binário ij no modelo NRTL

CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 - MOTIVAÇÃO

O açaí, é um fruto amazônico conhecido na gastronomia internacional e nacional pelos seus benefícios nutricionais e terapêuticos; em especial o fruto da espécie *Euterpe oleracea Martius*, uma palmeira oriunda da Amazônia oriental do Brasil, de grande importância cultural e econômica para essa região (YAMAGUCHI et al., 2015). A partir da fricção dos frutos e adição de água, é extraída uma bebida líquida de coloração roxa de alto valor nutricional, rico em ácidos graxos monoinsaturados, fibras e compostos fenólicos (ROGEZ, 2000).

Um dos compostos de maior atenção na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética são as antocianinas, pigmentos hidrofílicos com um alto poder antioxidante, responsáveis pela coloração roxa característica do fruto. As antocianinas também são associadas ao fortalecimento das defesas antioxidantes do ser humano que combate doenças desencadeadas por espécies reativas do oxigênio, em inglês *Reactive Oxygen Species* (ROS), além disso, existem estudos que relatam as propriedades funcionais pelo consumo da bebida de açaí (PALA et al., 2018).

Assim, para a obtenção de extratos ricos em antocianinas do fruto açaí tem-se aplicado técnicas de extração convencional usando solventes orgânicos como o etanol acidificado com ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido acético (ALCÁZAR-ALAY et al., 2017; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009; SILVA et al., 2019). Também existem outras técnicas para a concentração de antocianinas da bebida de açaí, com operações de centrifugação, filtração, microfiltração e osmose que permitem obter extratos ricos em antocianinas, separando as porções lipídicas do açaí e os sólidos (CESAR et al., 2014), porém são técnicas que precisam de muita infraestrutura e alto investimento inicial.

A extração líquido-líquido (ExLL), é uma técnica alternativa para extração de biomoléculas que têm sido estudadas nos últimos anos, caracterizada por permitir o aumento de escala, do laboratório para a indústria, facilmente, introduzindo processos mais limpos e sustentáveis. Em geral, os sistemas nos quais se observa a formação de duas fases líquidas, podem ser compatíveis com o meio ambiente, sempre e quando, os componentes desses sistemas apresentam baixa toxicidade. Para isso, recentemente tem-se destacado a habilidade de solventes verdes, como os

solventes eutéticos profundos, do inglês *Deep Eutectic Solvents* (DESs), em formar sistemas bifásicos (FARIAS; SOSA; et al., 2017; PASSOS et al., 2016).

A vantagem de utilizar sistemas de duas fases constituídos por DESs, é que os mesmos podem ser projetados, de modo que, a molécula de interesse tenha maior afinidade química com uma das fases, melhorando a seletividade durante a partição e sem prejudicar a natureza química da molécula de interesse. Assim, existe um potencial latente no uso de sistemas bifásicos constituídos de DESs para a concentração de antocianinas do açaí e separação de compostos apolares, como os lipídios.

Nessa ordem de ideias, é necessário conhecer e compreender o equilíbrio de fases dos sistemas constituídos por DESs formados por cloreto de colina e açúcares (glicose ou sacarose), geralmente hidrofílico, e 2-propanol, menos hidrofílico que os DESs de açúcares devido a cadeia alquílica. A compreensão do equilíbrio de fases de tais sistemas permitirá desenvolver projetos cuja principal característica será a alta seletividade para biomoléculas, com destaque para as biomoléculas oriundas de plantas da Amazônia como o açaí.

Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo a partição das antocianinas do açaí em sistemas bifásicos formados por DES de açúcares, glicose e sacarose, com 2-propanol, e determinar o coeficiente de partição das antocianinas e polifenóis totais do açaí, além disso, observar a afinidade química dessas antocianinas no processo de partição.

1.2 – OBJETIVOS

1.2.1 – Objetivo geral

Determinar dados de equilíbrio líquido-líquido (ELL) de sistemas a base de DESs, 2-propanol e água e determinar o coeficiente de partição e eficiência de extração das antocianinas e polifenóis totais do açaí.

1.2.2 – Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do açaí liofilizado.
- Avaliar as condições ótimas de extração sólido-líquido (ExSL) das antocianinas monoméricas (ATM) e polifenóis totais (PT) do açaí liofilizado utilizando uma solução extratora de 2-propanol e água.
- Preparar DES de cloreto de colina com glicose (ChCl:GLI) e cloreto de colina com sacarose (ChCl:SAC) e caracterizá-los em termos de propriedades físico-químicas e térmicas.
- Determinar dados de equilíbrio líquido-líquido (ELL) de sistemas formados por ChCl:GLI + 2-propanol + água a 35°C e ChCl:SAC+2-propanol+água a 25°C e 35°C.
- Modelar os dados de ELL de sistemas formados por ChCl + Glicose + 2-propanol + água e ChCl + Sacarose + 2-propanol + água a 25°C e 35°C.
- Determinar o coeficiente de partição das antocianinas e polifenóis totais do extrato do açaí.

CAPITULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

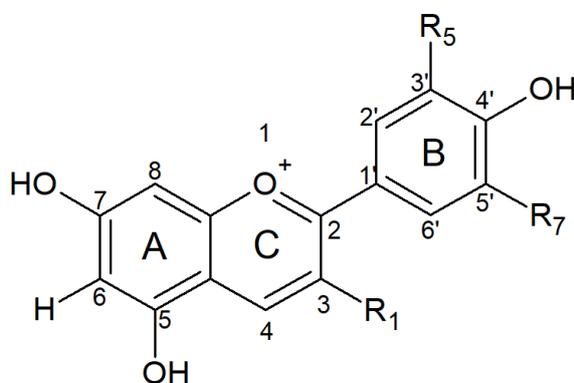
2.1 - AÇAÍ

Na amazônica oriental do Brasil encontra-se distribuída uma das palmeiras do género *Euterpe* de maior importância na economia dessa região, a *Euterpe oleracea Martius*. Essa espécie é amplamente conhecida pelo seu fruto, o açaí; um fruto globoso de diâmetro médio entre 10-20 mm, que apresenta uma coloração característica roxo-violácea. A partir do fruto, é elaborada um tipo de bebida calórica com conteúdo alto de lipídeos, fibras e polifenóis, denominada como açaí. Por esse motivo, o açaí é classificado como um alimento nutritivo e funcional no mercado internacional e nacional (CHANG; ALASALVAR; SHAHIDI, 2019; ROGEZ, 2000).

No caso do açaí, as antocianinas são os compostos de maior interesse da família dos polifenóis para a indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica devido a coloração roxa que pode ser usada para diversos produtos e suas propriedades terapêuticas, que torna esses extratos atrativos para os consumidores (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Um dos desafios na indústria, é encontrar as melhores condições para extrair as antocianinas de forma que a coloração característica do composto não seja danificada;

2.1.1 – Estrutura e estabilidade química das antocianinas

As antocianinas consistem em uma molécula antocianidina (aglicona) unida a um açúcar (forma glicosilada encontrada na natureza). A aglicona é constituída por um anel aromático (A) junto a um anel heterocíclico (C) com um oxigênio, esse anel está unido por uma ligação carbono-carbono a um terceiro anel aromático (B) (Ver Figura 2.1) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).



Nome	Substituição Padrão		
	R1	R5	R7
Cianidina	OH	OH	H
Delfinidina	OH	OH	OH
Malvidina	OH	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	OH	H	H
Peonidina	OH	OCH ₃	H

Figura 2.1 – Estrutura química das antocianinas

Fonte: Adaptado de Castañeda-Ovando *et al.* (2009).

Na natureza existem uma imensa variedade de antocianinas e a principal diferença estrutural entre elas é o número de grupos hidroxilas no anel B, a natureza e o número de açúcares ligados no anel C (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Segundo a literatura, o açaí é rico principalmente em dois tipos de antocianinas, cianidina-3-glicosídeo (cia-3-gli) e cianidina-3-rutósídeo (cia-3-rut) (Ver Figura 2.2), com aproximadamente 1365 mg de antocianinas/kg de fruto açaí no estágio final de maturação (ROGEZ et al., 2011).

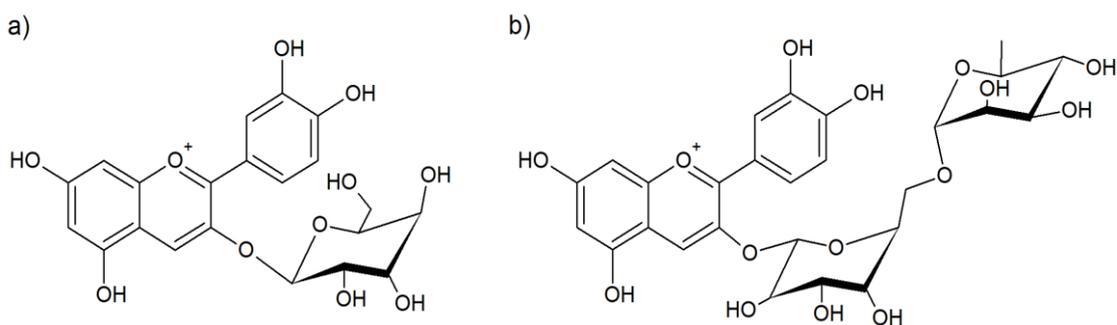


Figura 2.2 – Estrutura das antocianinas predominantes do açaí; a) cianidina-3-glicosídeo, b) cianidina-3-rutinosídeo.

Fonte: Adaptado de SCHAUSS *et al.*, 2006.

Existem vários fatores que afetam a coloração e estabilidade das antocianinas, como a estrutura e a concentração de antocianinas, pH, temperatura, luz, oxigênio, enzimas, íons metálicos, outros flavonóides e compostos fenólicos, além do ácido ascórbico, açúcares e sulfitos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

As antocianinas podem existir em diversas formas químicas, influenciadas principalmente pelo pH, sendo essas transformações evidentes na mudança da cor. A forma mais estável é encontrada em valores de pH abaixo de 2, conhecida como cátion *flavilium* (Ver Figura 2.3), que apresenta sempre uma coloração vermelha intensa (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; TROUILLAS et al., 2016).

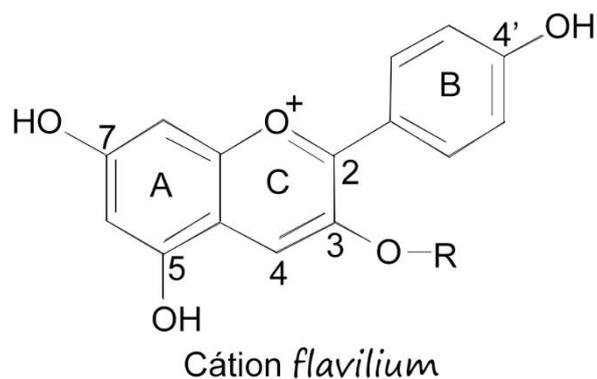


Figura 2.3 – Estrutura do cátion *flavilium*

Fonte: Adaptado de TROUILLAS *et al.*, 2016.

A transformação gradual da estrutura química do cátion *flavilium* é observada na perda do próton desse cátion, em condições de baixa acidez é convertida em uma mistura de tautômeros neutros de metona e quinona, conhecidos como bases com colorações roxas (Ver Figura 2.4 a). Essas bases quinodais perdem um segundo próton próximo da neutralidade para formar uma base quinodal aniônica de coloração azul (Ver Figura 2.4 b) (TROUILLAS *et al.*, 2016).

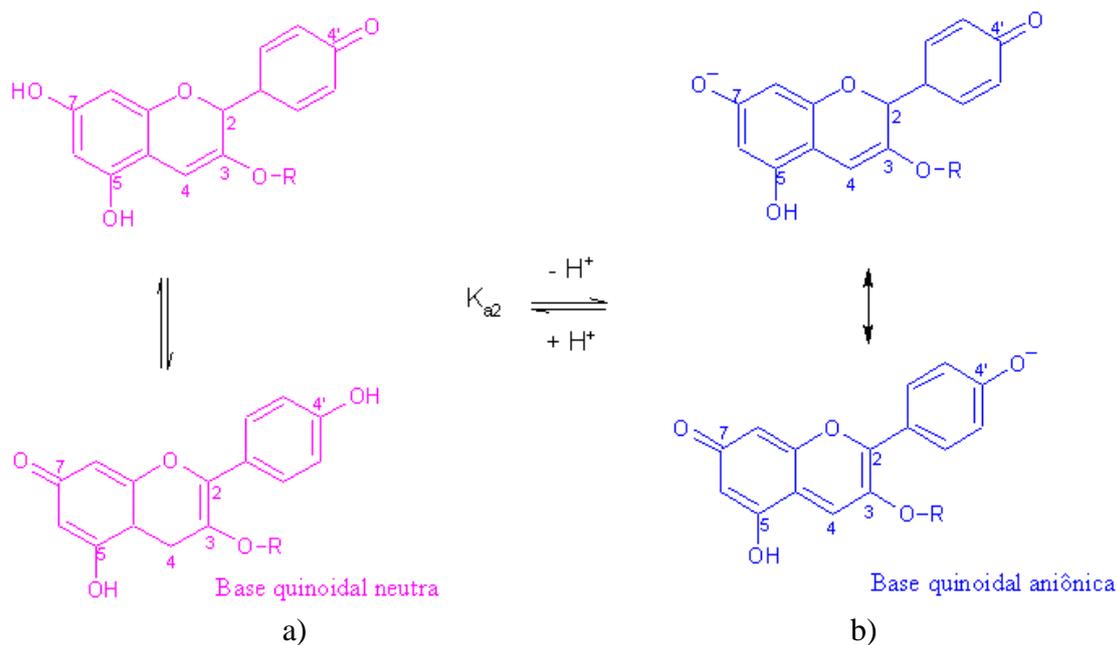


Figura 2.4 – Transformação estrutural das antocianinas em suas bases quinodais: a) Base quinoidal neutra, b) Base quinoidal aniônica.

Fonte: Adaptado de TROUILLAS *et al.*, 2016.

A transformação estrutural das antocianinas em hemiacetais epímeros é evidente durante o ataque nucleofílico da água (hidratação) ao anel C2, observando uma abertura do anel cromóforo que interfere a absorção da luz visível fazendo da estrutura incolor (chalcona) (Ver Figura 2.5) (TROUILLAS et al., 2016).

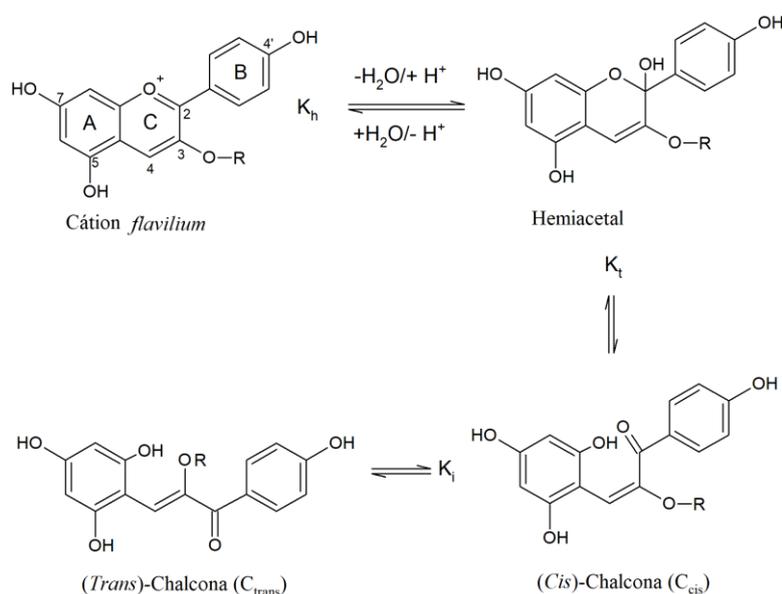


Figura 2.5 – Transformação da estrutura química das antocianinas por hidratação em formas hemiacetais e chalconas.

Fonte: Adaptado de TROUILLAS *et al.*, 2016.

Por outro lado, existem reações de copigmentação que ajudam a estabilidade das antocininas devido à proteção fornecida pelo copigmento frente à reação de hidratação do cation *flavilium* (FALCÃO et al., 2003). A copigmentação é definida como a formação de complexos não covalentes envolvendo a associação de outros compostos como íons metálicos, flavonóides, compostos fenólicos, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos ou mesmo entre as diferentes estruturas químicas da antocianina, gerando uma mudança (efeito batocrômico) ou um incremento na intensidade da cor (efeito hiperocrômico) na região UV-vis (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; EIRO; HEINONEN, 2002; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; TROUILLAS et al., 2016).

As reações de copigmentação promovem a estabilidade das antocianinas na natureza, por isso é geralmente encontrada na sua forma antocianina (aglicona ligada a um açúcar) que ocorrem através de interações intra e intermolecular (EIRO; HEINONEN, 2002). Quando a copigmentação é desenvolvida entre duas antocianinas, as interações

são geralmente encontradas entre o enlace glicosídico de uma antocianinas e o anel A da aglicona (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Pelo mencionado acima, fatores como pH, hidratação e copigmentação são importantes no momento de extração das antocianinas e em especial na seleção de solventes polares afins à natureza polar desses bioativos. A literatura tem reportado diferentes estudos para a obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos do açaí utilizando diversas técnicas convencionais e não convencionais que serão discutidas a seguir.

2.1.2 – Extração de antocianinas do açaí por métodos convencionais

Na atualidade existem técnicas convencionais utilizando solventes orgânicos para a obtenção de compostos fenólicos do açaí, em especial da *Euterpe oleracea Martius*, e também de outros frutos do mesmo gênero como a jussara (*Euterpe edulis*). Geralmente o solvente usado é o etanol, por ter alta afinidade com compostos polares como as antocianinas e ser de grau alimentício.

Pompeu *et al.* (2009) fizeram uma avaliação das condições ótimas de extração de compostos fenólicos do fruto açaí utilizando etanol e ácido clorídrico (HCl). Os autores fizeram um planejamento composto central rotacional (PCCR), encontrando condições ótimas de operação na razão etanol:água (74:26), concentração HCl 0,065 M e temperatura de 58 °C para extração de antocianinas com valores em média de 264,02 mg antocianinas/100g de fruto (POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009).

Para o caso da extração de antocianinas da polpa de fruta da *Euterpe edulis*, Borges *et al.* (2011) identificaram que os melhores solventes para extração de antocianinas foram metanol/1,5 M HCl, etanol/1,5 M HCl e metanol/0,01 M HCl obtendo em média valores de 254,57, 231,54 e 205,90 mg de cia-3-gli¹/100g de polpa de jussara, respectivamente (BORGES et al., 2011).

Na tabela 2.1 reportam-se alguns valores de antocianinas extraídas de açaí por grama de açaí encontrados na literatura.

¹ cianidina-3-glicosídeo

Tabela 2.1 – Valores de antocianinas encontradas na literatura.

Matéria Prima	Quantidade	Referência
Açaí Liofilizado	3,19 mg AT ² /g peso seco.	(SCHAUSS et al., 2006)
Açaí Liofilizado	1,37 mg AT/g açaí liofilizado.	(RODRIGUES BATISTA et al., 2015)
Polpa de açaí	4,58 mg cia-3-gli/g peso seco	(GARZÓN et al., 2017)
Açaí Liofilizado	5,87 mg cia-3-gli/g açaí liofilizado	(LUCAS; ZAMBAZI; COSTA, 2018)

Também foram encontrados valores para polifenóis totais e estes são reportados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Valores de polifenóis totais (PT) encontradas na literatura.

Matéria Prima	Quantidade	Referencia
Polpa de açaí	34,37 mg AGE /g peso seco	(GORDON et al., 2012)
Açaí Liofilizado	75,65 mg AGE/ g açaí liofilizado	(RODRIGUES BATISTA et al., 2015)
Polpa de açaí	47,86 mg AGE/g peso seco	(GARZÓN et al., 2017)

2.1.3 – Extração de antocianinas de açaí com métodos não convencionais

Uma das técnicas não convencionais mais utilizadas para extração de antocianinas da bebida de açaí é a clarificação, onde são utilizados pré-tratamentos com enzimas para eliminação de pectinas e de amido. O pré-tratamento leva à diminuição das densidades facilitando a filtração que ocorre em várias etapas (micro, ultra, nano filtração e, em alguns casos osmose reversa), porém durante o processo existe evidência da diminuição de 50% do conteúdo de antocianinas durante a etapa de filtração (CESAR et al., 2014).

Por outro lado, nos últimos anos seguem emergindo novas técnicas e solventes não convencionais que têm potencial para serem utilizados na extração de biomoléculas, como por exemplo os solventes eutéticos profundos, ou em sua sigla em inglês *Deep*

² AT – Antocianinas Totais

Eutectic Solvents (DESs) que serão discutidos no item 2.2. Na atualidade, ainda não existe estudos de extração de antocianinas de açaí com esses solventes.

2.2 – SOLVENTES EUTETICOS PROFUNDOS

A denominação solvente eutético profundo (Em inglês, *Deep Eutectic Solvents* – DESs) foi utilizada pela primeira vez por Abbott *et al.* (2003), para designar um tipo de solvente preparado com cloreto de colina (ChCl) e uréia, que apresentou um ponto de fusão muito baixo em uma proporção molar específica. Esse ponto de fusão foi observado através da construção de um diagrama de fases de equilíbrio sólido-líquido (ESL) (Ver Figura 2.6) dividido em 4 regiões, representada por L₁-L₂ (líquido do componente 1 e líquido do componente 2), L-S₁ (líquido formado e sólido do componente 1), L-S₂ (líquido formado e sólido do componente 2) e finalmente, S₁-S₂ (sólido do componente 1 e sólido do componente 2) (ABBOTT *et al.*, 2003).

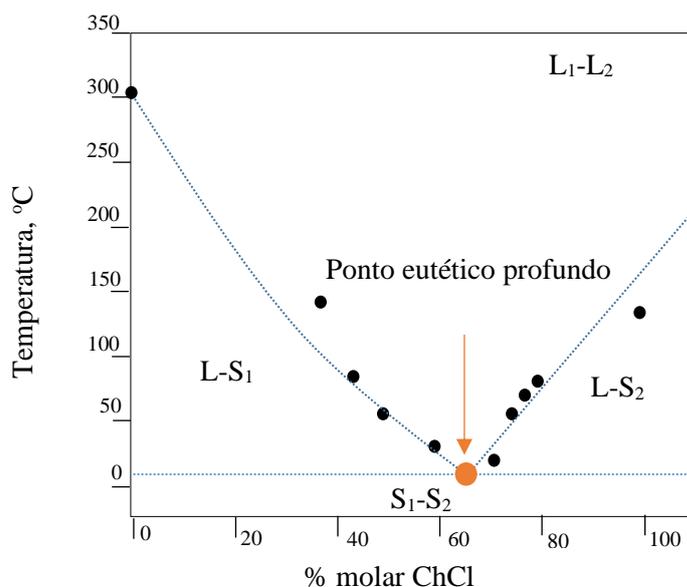


Figura 2.6 – Diagrama ESL da mistura de ChCl:Ureia

Fonte: Adaptado de ABBOT *et al.*, 2003.

A diminuição do ponto de fusão foi atribuída, primeiramente, à formação de ligações de hidrogênio da molécula da uréia como um doador de hidrogênio (*hydrogen bond donor* - HBD) e o íon cloreto como um receptor de hidrogênio (*hydrogen bond acceptor* - HBA). Porém, na atualidade existem questionamentos sobre a definição apropriada para descrever a natureza real do DESs (ALKHATIB *et al.*, 2020).

Martins *et al.* (2019), abordam a estrutura do DESs como uma mistura com uma temperatura eutética real menor que a temperatura ideal (Ver Figura 2.7). Além disso, os autores também esclarecem que um DESs pode se formar em uma faixa de proporção

molar, e não é só determinada por uma proporção molar fixa (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019).

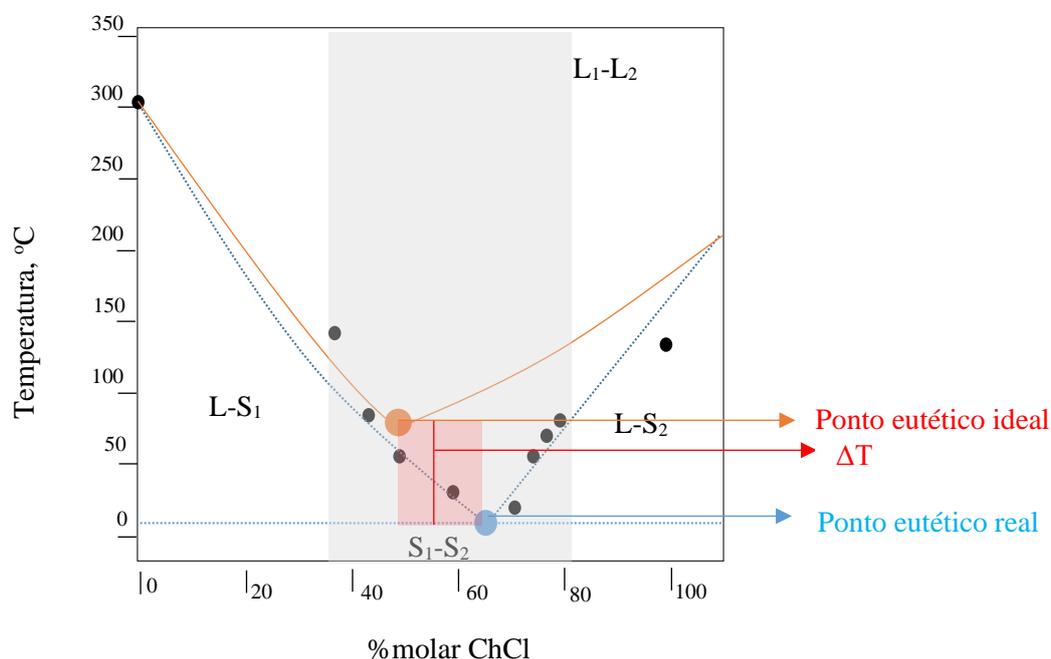


Figura 2.7 – Diagrama esquemático ESL da mistura real e ideal ChCl:Ureia
Fonte: Adaptado de MARTINS *et al.*, 2019.

A definição anterior consegue aproximar de um comportamento termodinâmico a natureza do DESs, porém ainda existem limitações em descrever a complexa natureza das ligações de hidrogênio que fornece o HBA, como o cloreto de colina (CRESPO *et al.*, 2019). Para superar essas limitações, novas metodologias baseadas na modelagem molecular com equações de estados foram desenvolvidas. Crespo *et al.* (2019), identificaram 5 sítios disponíveis do ChCl como HBA que promovem a formação das ligações de hidrogênios com os DH (Ver Figura 2.8).

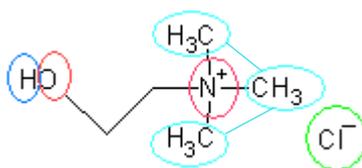


Figura 2.8 – Estrutura ChCl e os sítios ativos de ligações
Fonte: Adaptado de CRESPO *et al.*, 2019.

A simulação molecular baseada na química quântica é outra ferramenta fundamental para entender em uma microescala o comportamento molécula-molécula de sistema não ideais como são os DESs. Ainda, esses tipos de modelos assumem que o DES

é um complexo coordenado de ligações de hidrogênio. Outra vantagem é a compreensão do efeito da água dentro da estrutura dos DESs (ALKHATIB et al., 2020).

A simulação molecular mostra como a molécula de água realiza tanto uma desestruturação na matriz molecular do DES e também ligações de hidrogênio dependendo da quantidade de água adicionada (DAI et al., 2015; WENG; TONER, 2018).

A Figura 2.9 (a) mostra como as moléculas de água tem uma maior atração pelos íons do ChCl devido à alta eletronegatividade, causando a interrupção de ligações de hidrogênios nesse sítio ativo com os HBD e produzindo a transição de uma solução aquosa. Entretanto, na Figura 2.9 (b) as moléculas de água conseguem uma ligação entre o cátion do ChCl e os grupos hidroxila dos HBD, causando um aumento do número de ligações de hidrogênio entre os HBD e ChCl (WENG; TONER, 2018).

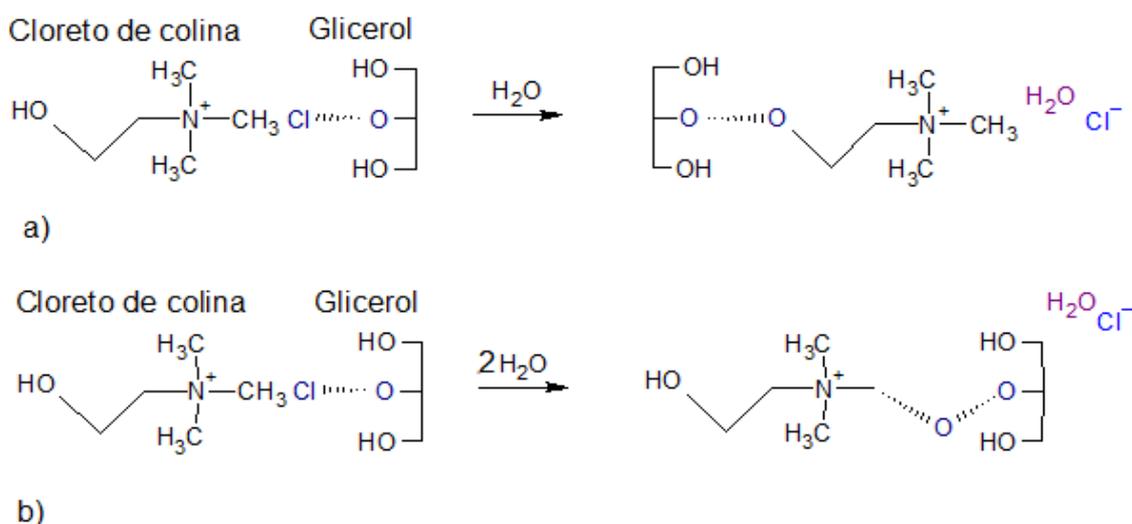


Figura 2.9 – Esquema das ligações de hidrogênio influenciadas pela adição de água; a) Ligação de hidrogênio entre a colina e o glicerol, e a isolamento do ânion cloreto, b) Ligação de hidrogênio direta entre o cátion colina e glicerol.

Fonte: Adaptado de WENG; TONER, 2018.

Definir os DESs, não tem sido uma tarefa fácil devido seu comportamento não ideal. Porém, as divergências dentro das diferentes perspectivas termodinâmicas e moleculares estão sendo diminuídas pelo contínuo desenvolvimento de modelos que possibilitam a representação da verdadeira natureza das ligações de hidrogênio que os formam. Por enquanto, ainda com uma definição em contínua revisão por parte dos cientistas, as aplicações dos DESs para extração de biomoléculas, segue aumentando e

com um interesse sustentável por serem solventes projetados com baixa toxicidade (SMITH; ABBOTT; RYDER, 2014).

2.2.1 – Aplicações do DESs para extração de antocianinas

Cvjetko Bubalo *et al.* (2016), extraíram compostos fenólicos da pele de uva (*Vitis vinífera cv*) onde encontraram um rendimento 5 a 2 vezes maior utilizando DESs comparado com solventes como a água e metanol, respectivamente. Para a extração de a cia-3-gli os autores encontraram que DES formado por cloreto de colina, prolina, ácido málico (1:1:1) com 50% (p/p) de água obtiveram uma quantidade de 0,85 mg cia-3-gli/g peso seco, a qual representou uma quantidade maior comparado com solventes convencionais como o metanol acidificado com uma quantidade de 0,3 mg cia-3-gli durante o processo de extração. O aumento da polaridade do solvente com a água aumenta o poder extração para antocianinas de natureza polar como é a cia-3-gli (CVJETKO BUBALO *et al.*, 2016).

Sang *et al.* (2019) avaliaram as condições ótimas de extração de antocianinas de *Nitraria tangutorun* um fruto de origem chinesa. Os autores reportaram que a extração com DES constituído de ChCl e 1,2-propanodiol (1:3,4) com 20% (p/p) de água foi mais eficiente comparada à extração feita com solventes polares como a água e soluções aquosas de etanol, metanol e acetona. As condições de extração ótimas foram fixadas a 68°C e tempo de 45 minutos obtendo uma quantidade em média de 1,413 mg AT/g peso seco. Enquanto as extrações convencionais não foram superiores de 1,2 mg AT/ g peso seco. Para os autores foi evidente que os rendimentos de extração foram maiores devido à diminuição da viscosidade dos DESs com adição de água e aumento da temperatura, ocasionando uma maior transferência de massa e melhor interação de ligações de hidrogênio com as antocianinas (SANG *et al.*, 2019) .

Por outro lado, Dai *et al.* (2016) observaram que os DES ácido láctico:glicose, ChCl:1,2-propanodiol e glicose:frutose:sucrose tiveram a mesma eficiência de extração de antocianinas da rosa *Catharantus* comparado ao metanol acidificado. Porém, durante os testes de estabilidade química, os autores encontraram que a cianidina foi mais estável em DES (ácido láctico:glicose) atribuindo essa estabilidade nas interações intermoleculares que ocorrem entre a cianidina e as moléculas do ácido láctico:glicose, o DES, e os grupos hidroxilos e carboxilos da cianidina (DAI *et al.*, 2016).

Os DESs têm demonstrado potencial para extração de pigmentos naturais, como as antocianinas, de diferentes materiais vegetais. Soma-se às extrações de biocompostos sua

habilidade na partição de moléculas em sistemas em ELL (FARIAS; PASSOS; et al., 2017; PASSOS et al., 2016; ZENG et al., 2014).

2.3 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) A BASE DE DES

A extração líquido-líquido (ExLL), é uma técnica de fracionamento utilizada em processos de partição de macromoléculas (ASENJO, J. A. et al., 2002; VENTURA et al., 2017; ZENG et al., 2014). As interações entre os componentes dos sistemas, são as principais responsáveis pela separação de fases e pelas propriedades físico-químicas de cada fase em equilíbrio. Os sistemas bifásicos podem ser preparados com componentes de baixa toxicidade e, desta forma, serem usados para melhorar os processos de extração em termos de segurança do processo, segurança ambiental e até mesmo de rendimentos de extração (ASENJO.; ANDREWS, 2011; FREIRE et al., 2012).

Na literatura tem-se encontrado sistemas bifásicos constituídos por DES como por exemplo os sistemas formados por K_2HPO_4 + DES (ChCl:açúcares) + água (FARIAS; SOSA; et al., 2017), PPG 400 + DES (ChCl:ácido carboxílico ou ureia) + água (PASSOS et al., 2016), PPG 400 + DES (ChCl:Glicose) + água (FARIAS; PASSOS; et al., 2017), DES (cloreto de metil trioctilamônio:1-hexanol) + 2-propanol + água e DES (cloreto de metil trioctilamônio:1-decanol) + 2-propanol + água (XU et al., 2020). A concentração do ChCl é o componente responsável pela separação das fases, atribuído ao efeito cosmotrópico (em inglês *salting-out*) principalmente do ChCl que separa outro componente da solução aquosa (FARIAS; PASSOS; et al., 2017).

2.3.1 – Partição de biomoléculas com ExLL a base de DES

A ExLL a base de DES tem potencial para partição de biomoléculas como compostos fenólicos, ácidos orgânicos, proteínas e corantes têxteis. Zeng *et al.* (2014), foram os primeiros pesquisadores a particionar proteínas em sistemas com DES (ChCl:Ureia) + K_2HPO_4 + água, conseguindo uma eficiência de extração entre 99,94% - 100,05% (ZENG et al., 2014). Passos *et al.* (2016), realizaram a partição de dois corantes têxteis de diferente polaridade Sudan III e Pigmento Azul-29 (PA29) em sistemas formados por DES (ChCl:ácido láctico, ácido glicólico, ácido acético, ácido cítrico tetra hidratado ou ureia) + PPG 400 + água, onde observaram a completa separação dos corantes (Ver Figura 2.10) (PASSOS et al., 2016).

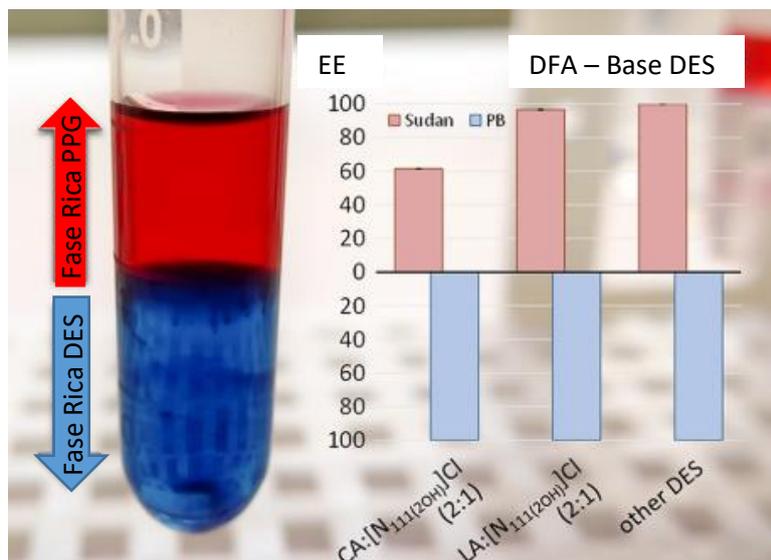


Figura 2.10 – Extração de corantes têxteis sudan III e PA29 utilizando sistemas bifásicos a base de DES.

Fonte: Adaptado de Passos *et al.* (2016).

Segundo Passos *et al.* (2016), o PA29 (corante azul) de natureza polar migrou para a fase inferior rica nos componentes individuais do DES com eficiência de extração de 100%. O Sudan III (corante vermelho), com uma natureza menos polar, migrou para a fase superior ricas em PPG 400 obtendo eficiência de extração entre 61,6%-100% (PASSOS *et al.*, 2016). Outros autores como Farias *et al.* (2017), particionou ácido gálico (AG) em sistemas DES (ChCl:sacarídeos) + K₂HPO₄ + água. Os autores identificaram que AG teve preferência pelo ChCl pela capacidade que a biomolécula tem de formar ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas –OH, também observaram uma competição com os HBD para a formação de ligações de hidrogênio. As maiores eficiências (prox. 90%) de extração foram encontradas para o sistema sem a presença do HBD (ChCl + K₂HPO₄ + água) (FARIAS; SOSA; *et al.*, 2017).

Farias *et al.* (2017) realizaram a partição de diversas moléculas (AG, ácido vanílico, cafeína, nicotina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina) em sistemas (ChCl:Glicose) + PPG 400 + água em diferentes razões molares do DES (2:1, 1:1, 1:2; HBA:HBD). Os autores observaram que a partição das moléculas mais polares como cafeína, nicotina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina tiveram preferência pela fase inferior rica em DES. O ácido gálico, o ácido vanílico e a nicotina, com carácter menos polar, migraram para a fase superior rica em PPG 400. A maior eficiência de extração foi

de aproximadamente 90% e os autores encontraram para moléculas polares como o L-triptofano nos sistemas formados com DESs na razão de 2:1 (HBA:HBD). A menor eficiência encontrada, para a mesma molécula, foi próxima de 80% em sistemas com DES na razão de 1:2. Os autores atribuíram que o aumento da razão molar de HBD baixa o carácter hidrofílico do sistema e simultaneamente a eficiência de extração de moléculas polares diminui (FARIAS; PASSOS; et al., 2017).

Para usar sistemas bifásicos a base de DESs na partição de biomoléculas faz-se necessário a determinação de dados de equilíbrio que permitam observar o comportamento desses sistemas relacionando-o seletividades dos componentes, também podem ser escolhidos o HBA e o HBD de forma a conseguir as propriedades físico-químicas que permitam uma maior seletividade da biomolécula alvo. Desse modo deve-se consultar sobre a teoria termodinâmica do ELL.

2.3.2 – Equilíbrio líquido-líquido (ELL)

Um sistema está no estado de equilíbrio termodinâmico se está, simultaneamente, em equilíbrio mecânico (sua pressão é constante), térmico (sua temperatura é constante) e químico (sua composição química é constante). Para manter essa condição o sistema deve cumprir com as seguintes características: a invariabilidade do sistema com o tempo, a uniformidade do sistema (ausência de gradientes de temperatura, pressão, velocidade ou concentração), todos os fluxos (calor, massa e trabalho) entre o sistema e a vizinhança devem ser iguais à zero e a taxa líquida de todas as reações químicas também devem ser iguais a zero (SANDLER, 2017; SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

O ELL ocorre quando o sistema em uma determinada faixa de composição atinge o equilíbrio termodinâmico. A uniformidade da temperatura (T), pressão (P) e fugacidade (f_i) de cada espécie química são critérios de ELL entre duas fases (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

Assim, para o ELL de um sistema com N espécies com T e P uniformes, identificando as fases pelos sobrescritos α e β , define-se a eq. (2.1) como critério de equilíbrio, além da igualdade de temperatura e pressão entre as fases:

$$f_{i_i}^{\alpha} = f_{i_i}^{\beta} \quad (i = 1,2,3 \dots N) \quad (2.1)$$

Para expressar a fugacidade no ELL, se introduz uma grandeza adimensional denominada como coeficiente de atividade, γ_i . A eq. (2.1) torna-se (2.2):

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha f_{i_i}^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta f_{i_i}^\beta \quad (i = 1, 2, 3 \dots N) \quad (2.2)$$

Se cada espécie pura se encontra em estado líquido na temperatura do sistema, têm-se então que $f_i^\alpha = f_{i_i}^\beta$, logo

$$x_i^\alpha \gamma_i^\alpha = x_i^\beta \gamma_i^\beta \quad (i = 1, 2, 3 \dots N) \quad (2.3)$$

, Os coeficientes de atividade, γ_i^α e γ_i^β , são calculados pela energia de Gibbs em excesso $\left(\frac{G^E}{RT}\right)$, eq. (2.4).

$$G^E = RT \sum x_i \ln \gamma_i \quad (2.4)$$

Dessa forma, são funcionalmente idênticos, descritos matematicamente somente pelas frações molares das quais eles são funções. Para um sistema em ELL contendo N espécies químicas:

$$\gamma_i^\alpha = \gamma_i(x_1^\alpha, x_2^\alpha, \dots, x_{N-1}^\alpha, T, P) \quad (2.5)$$

$$\gamma_i^\beta = \gamma_i(x_1^\beta, x_2^\beta, \dots, x_{N-1}^\beta, T, P) \quad (2.6)$$

Assim, diversos modelos termodinâmicos têm sido desenvolvidos para expressar G^E com a finalidade de correlacionar a composição e a temperatura da mistura afim de obter os coeficientes de atividade (PRAUSNITZ; LICHTENTHALER; DE AZEVEDO, 1998; SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

2.3.2.1 – Modelo NRTL (Non- Random two-liquid):

Entre os modelos termodinâmicos fundamentados no conceito de composição local proposta por Wilson em 1964, encontra-se o modelo NRTL (Non-Random Two-Liquid) desenvolvido por Renon e Prausnitz (1968) (PRAUSNITZ; LICHTENTHALER; DE AZEVEDO, 1998) e apresentado na eq. (2.7), para um sistema binário:

$$\frac{G^E}{RT} = x_1 x_2 \left(\frac{\tau_{21} G_{21}}{x_1 + x_2 G_{21}} + \frac{\tau_{12} G_{12}}{x_2 + x_1 G_{12}} \right) \quad (2.7)$$

Os parâmetros binários são definidos como:

$$\tau_{12} = \frac{g_{12} - g_{22}}{RT} \quad (2.8)$$

$$\tau_{21} = \frac{g_{21} - g_{11}}{RT} \quad (2.9)$$

$$G_{12} = \exp(-\alpha_{12} \tau_{12}) \quad (2.10)$$

$$G_{21} = \exp(-\alpha_{12} \tau_{21})$$

Onde, g_{12} , é um parâmetro de interação energética característico da interação entre as moléculas 1 e 2. Parâmetro α_{12} , se relaciona à não aleatoriedade na mistura; quando $\alpha_{12}=0$, a mistura é completamente aleatória e a equação NRTL se reduz a equação de Margules dois sufixos. A equação NRTL geralmente fornece uma boa representação de dados experimentais para misturas fortemente não ideais e parcialmente imiscíveis, enquanto Margules três sufixo ou van Laar representam melhor sistemas moderadamente não ideais (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

Para o modelo NRTL a eq. (2.11) e (2.12), determinam o coeficiente de atividade como segue:

$$\ln \gamma_1 = x_2^2 \left[\tau_{21} \left(\frac{G_{21}}{x_1 + x_2 G_{21}} \right)^2 + \frac{\tau_{12} G_{12}}{(x_2 + x_1 G_{12})^2} \right] \quad (2.11)$$

$$\ln \gamma_2 = x_1^2 \left[\tau_{12} \left(\frac{G_{12}}{x_2 + x_1 G_{12}} \right)^2 + \frac{\tau_{21} G_{21}}{(x_1 + x_2 G_{21})^2} \right] \quad (2.12)$$

2.3.2.2 – Diagramas de equilíbrio

Os diagramas de fases permitem visualizar os dados de equilíbrio ELL de sistemas binários, ternários ou quaternários. De forma geral a representação mais comum é em diagrama com coordenadas retangulares, como ilustra-se na Figura 2.11. A curva que passa pelos pontos A-Pc-B é chamada curva binodal ou curva de equilíbrio, sendo Pc o ponto crítico da curva (ASENJO, Juan A.; ANDREWS, 2011; IQBAL et al., 2016).

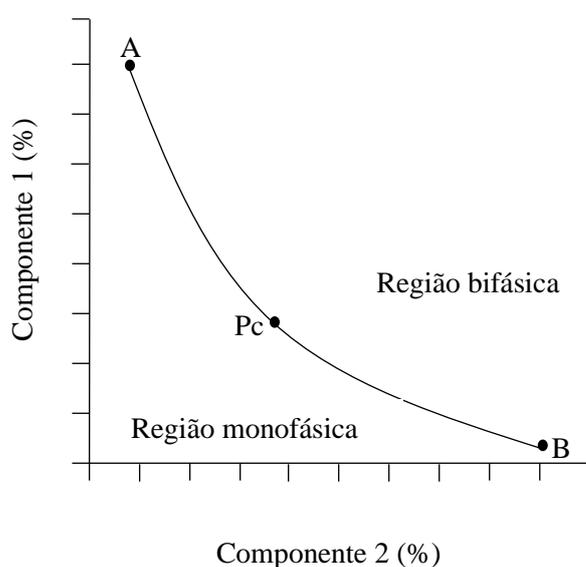


Figura 2.11 – Esquema de diagrama de fases em coordenadas retangulares.

Esta curva é formada pelas composições de equilíbrio onde há a mudança da região monofásica (miscibilidade total) para uma região bifásica (miscibilidade parcial). As linhas de amarração (LA) ou em inglês *tie lines*, permitem visualizar e relacionar as composições da fase superior e inferior do sistema bifásico (Figura 2.12) (IQBAL et al., 2016).

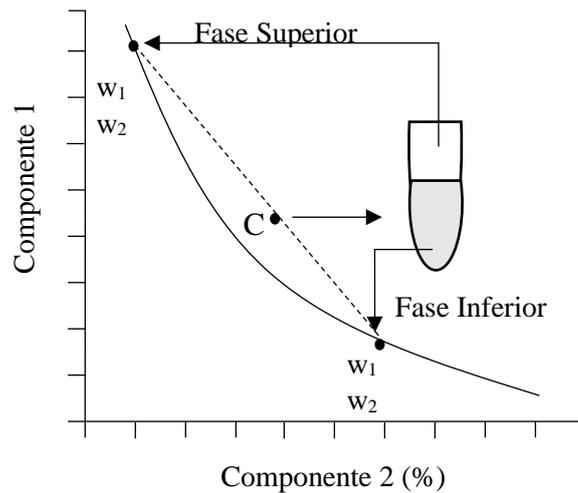


Figura 2.12 – Esquema das linhas de amarração no diagrama de fases.

Sendo w_1 e w_2 a composição do componente 1 e 2, respectivamente. O ponto C, são a composições globais. As linhas fornecem informações sobre as eficiências de extração do soluto ou a mudança de alguma propriedade, por meio de parâmetros como o comprimento da linha de amarração (CLA) e a inclinação da linha de amarração (ILA). O CLA é um parâmetro utilizado para determinar a eficiência de extração do soluto e é calculado com a eq. 2.13 (IQBAL et al., 2016):

$$CLA = \sqrt{(\Delta w_1)^2 + (\Delta w_2)^2} \quad (2.13)$$

A ILA demonstra como a composição das fases pode variar quando existe alguma mudança de uma condição como a temperatura e massa molar dos constituintes, para determina-la utiliza-se a eq. 2.14 (IQBAL et al., 2016).

$$ILA = \frac{\Delta w_1}{\Delta w_2} \quad (2.14)$$

CAPITULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados para a preparação dos DESs, para determinação dos dados de ESL, ELL e para partição das antocianinas e compostos fenólicos são apresentados na Tabela 3.1, juntamente com o número CAS, a massa molecular, o fornecedor e suas purezas. Nenhum dos materiais citados passaram por processo de purificação adicionais antes de sua utilização.

Tabela 3.1 – Propriedades dos reagentes utilizados: Massa Molecular (Mw).

Reagentes	Número CAS	M_w	Fornecedor	Pureza
Cloreto de colina (ChCl)	67-48-1	139,62	Sigma-Aldrich	>99,0%
Glicose Monohidratada	492-62-6	198,16	Dinâmica	>99,0%
Sacarose	57-50-01	342,30	Anidrol	>99,0%
2-propanol	67-63-0	60,10	Dinâmica	>99,5%

Esses reagentes foram escolhidos com o intuito de formar sistemas bifásicos de baixa toxicidade e alto poder de extração. O ChCl é considerado como um nutriente por ser parte do complexo de vitamina B (FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2012). A glicose e sacarose são sacarídeos utilizados como adoçantes nas comidas e tem um baixo custo (FLORINDO et al., 2017). O 2-propanol é um álcool secundário utilizado na extração de bioativos apolares como os carotenoides por ser um solvente de baixa polaridade e de menor toxicidade se comparado aos solventes de maior cadeia alquílica como hexano (ALVARENGA et al., 2020).

Na Figura 3.1, são mostrados os sistemas estudados e as estruturas de cada um dos componentes.

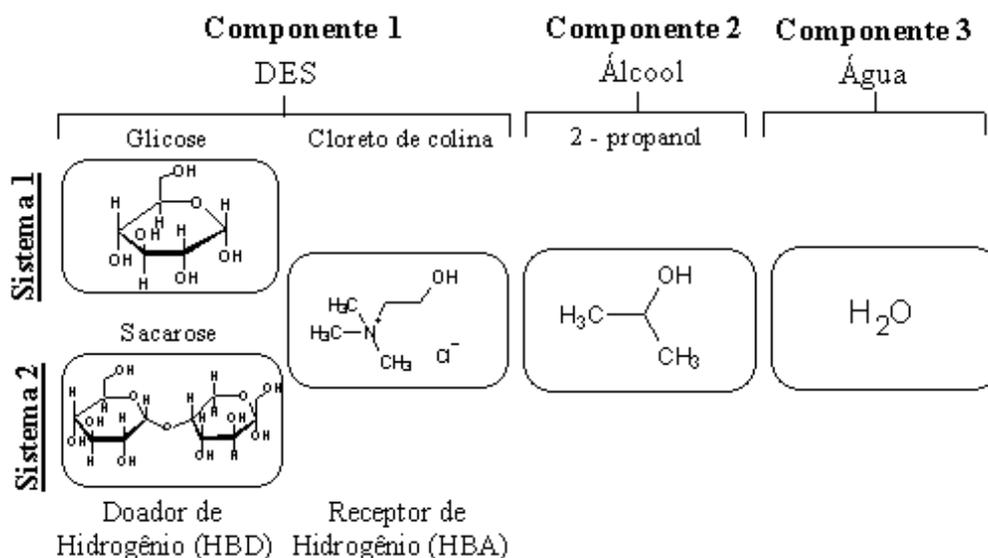


Figura 3.1 – Esquema dos sistemas multicomponentes estudados em equilíbrio líquido-líquido (ELL).

O açaí foi adquirido no mês de setembro de 2019, 10kg de bebida de açaí congelada classificada como açaí especial por apresentar porcentagem de sólidos entre 14% - 16%. O fornecedor da bebida foi a empresa Açaí Santa Helena, localizada em Castanhal-Pará. A bebida foi liofilizada com um liofilizador marca CHRIST Alpha 2-4 LD *plus*. As amostras foram armazenadas a -20°C até seu uso.

Na Figura 3.2 tem-se o fluxograma da metodologia implementada para o desenvolvimento desse trabalho. A pesquisa foi desenvolvida em 4 etapas, cada cor representa uma delas: etapa I ●, etapa II ●, etapa III ● e etapa IV ●.

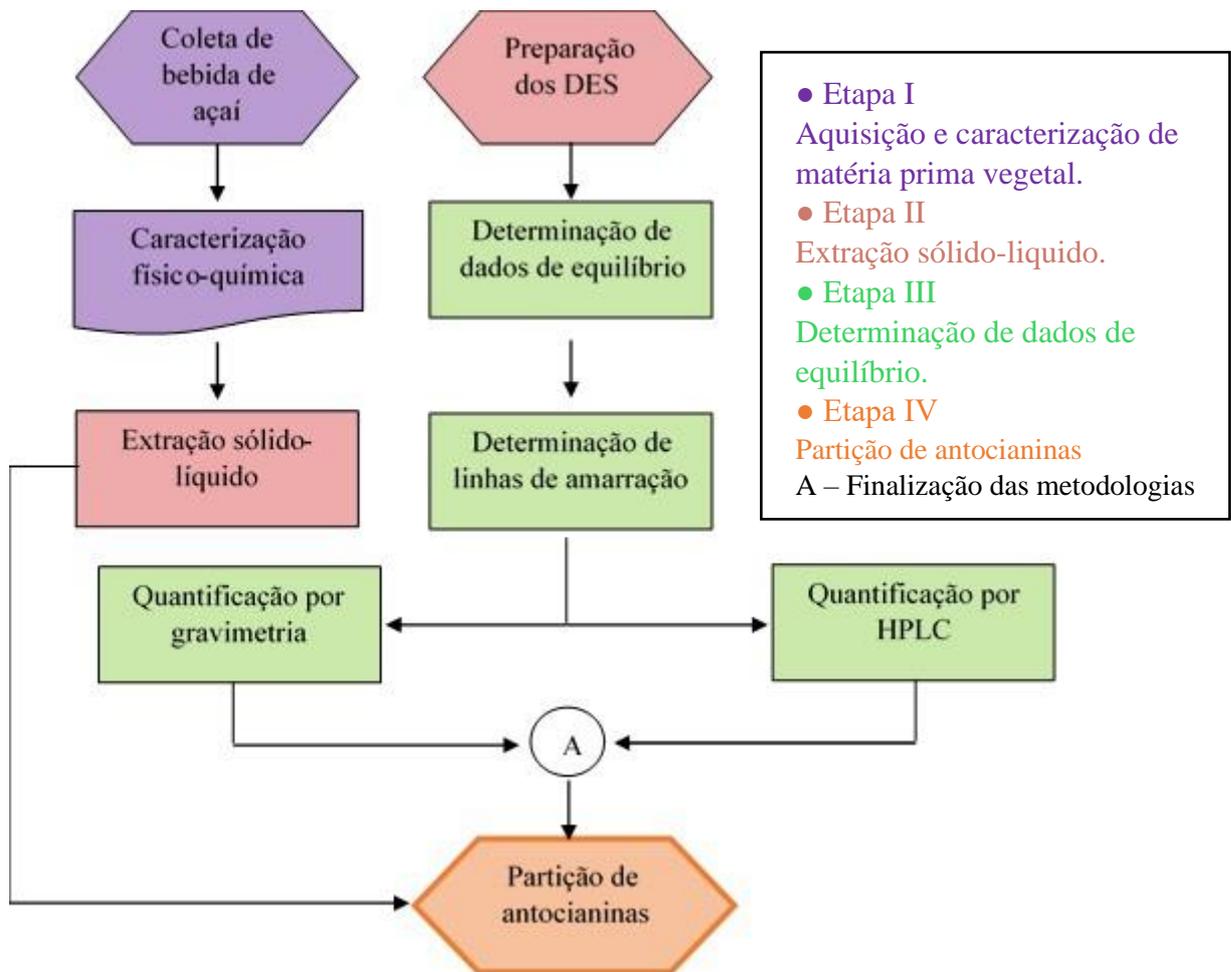


Figura 3.2 – Fluxograma da metodologia implementada

3.1. AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (ETAPA 1)

3.1.1 – Caracterização físico-química do açaí

A caracterização físico-química do açaí foi feita no laboratório de físico química da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UFPA.

- *Proteínas*: Foram quantificadas a partir do nitrogênio total contido no açaí liofilizado com o método Kjeldahl, método 920.87 (AOAC,1997).
- *Lipídeos*: Foram quantificados utilizando o método Soxhlet. O solvente extrator foi éter de petróleo, de acordo com o método 922.06 (AOAC, 1997).
- *Umidade*: Foi determinada por secagem da amostra em estufa a 105 °C, até peso constante, de acordo com o método 920.151 (AOAC,1997).
- *Resíduo mineral fixo (RMF)*: Foi determinado por calcinação da amostra a 550 °C, de acordo com o método 930.05 (AOAC, 1997).

3.2 – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ETAPA 2)

A segunda fase do estudo corresponde à extração sólido-líquido das antocianinas e compostos polifenólicos do açaí liofilizado utilizando uma solução extratora de 2-propanol e água, com o objetivo de estabelecer as melhores condições de obtenção de extrato. O 2-propanol é usado por ter habilidade na formação de duas fases com DES.

Na literatura, são encontrados vários estudos de otimização de processos de extração de antocianinas com solventes orgânicos como metanol, etanol, acetona e água. Porém, não existe estudo sobre a extração das antocianinas de açaí com 2-propanol. Por esse motivo, foi feito um planejamento de Box-Behnken tendo como variáveis de entrada: X₁: Razão água:2-propanol (v/v), X₂: Razão sólido-líquido (m/v), X₃: Temperatura. Os níveis de cada variável utilizados no Box-Behnken são observados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Variáveis operacionais e níveis aplicados no planejamento Box-Behnken

Nível	Razão água:2-propanol (X ₁)	Razão sólido:líquido (X ₂)	Temperatura (°C) (X ₃)
1	70:30	1:5	50
0	50:50	1:10	35
-1	30:70	1:15	20

Cada extração foi realizada em uma célula encamisada acoplada a um banho ultra termostático (Quimis, Q214M2) e ao abrigo da luz (Ver Figura 3.3). A quantidade da solução extratora de água:2-propanol utilizada foi de 20 mL, e portanto para uma razão de 1:5, 1:10 e 1:15 foi pesado 4,000 g, 2,000 g e 1,333 g de açaí liofilizado, respectivamente. O tempo de extração de cada experimento foi fixado em 45 min com agitador magnético a 150 rpm. Finalizado o tempo de extração, o extrato foi filtrado a vácuo e armazenado em vidro âmbar a -18°C.



Figura 3.3 – Processo de extração de antocianinas ao abrigo da luz

Na Tabela 3.3 consta as 15 corridas experimentais do planejamento Box-Behnken.

Tabela 3.3 – Planejamento Experimental por Box-Behnken, utilizando variáveis codificadas.

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

As variáveis de respostas são as antocianinas monoméricas (ATM) e os polifenóis totais (PT), as quais foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro UV-vis marca BEL MODELO UV-M51. A descrição de cada metodologia está a seguir:

- *Quantificação de antocianinas monoméricas:* As antocianinas foram quantificadas no extrato obtido pela metodologia de pH diferencial, proposta inicialmente por Fuleki e Francis (1968) e modificada por Giust e Wrolstad (2005). Uma alíquota do extrato com antocianinas se ajusta a pH 1,0 e pH 4,5. Utilizam-se dois sistemas tampão: ácido clorídrico/cloreto de potássio pH 1,0 (0,025M) e ácido acético/acetato de sódio pH 4,5 (0,4M). Adiciona-se uma alíquota da amostra na solução tampão correspondente e os comprimentos de onda foram lidos a 510nm e 700nm. Calcula-se a absorbância final a partir da eq. 3.1.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,0} \quad (3.1)$$

A concentração de pigmentos monoméricos no extrato expressa-se em mg cianidina-3-glicosídeo (cia-3-gli)/100 mL, como segue a eq. 3.2.

$$\left(\frac{\text{cia} - 3 - \text{gli mg}}{100\text{mL}}\right) = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1} \quad (3.2)$$

Sendo A absorvância; PM o peso molecular, FD o fator de diluição e, ϵ a absorvância molar. A massa final de antocianinas é calculada com base do volume e massa de extrato (PM: 449,2 e ϵ : 26900). Para colocar as unidades em mg cia-3-gli mg/g de açaí, é necessário dividir a razão sólido:líquido segundo à corrida experimental correspondente (GIUSTI; WROLSTAD, 2005).

- Quantificação de polifenóis totais: Os polifenóis totais (PT) foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (FC). O método ocorre pela reação de óxido-redução em uma solução alcalina, resultando a formação de um complexo de coloração azul. Foram realizadas as diluições respectivas do extrato bruto. Com 250 μ L da amostra diluída foi adicionado 250 μ L do reagente FC previamente diluído na proporção 1:10 com água destilada. Depois foi acrescentado 1250 μ L de solução de carbonato de sódio (7,5% w/w) e misturado por 5 minutos. As misturas foram aquecidas a 50°C em ambiente obscuro. Os brancos foram preparados com a solução extratora na razão água:2-propanol, correspondente. Os valores de PT foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE)/g de açaí liofilizado, o qual foi necessário dividir a razão sólido:líquido, segundo à corrida experimental correspondente.

3.2.1 – Análise estatística

Para determinar as diferenças significativas dentro do domínio experimental estudado foi realizada uma análise comparativa de cada um dos efeitos, as análises de variância (ANOVA), com 95% de confiança, e um análise de desejabilidade com auxílio do programa computacional Statistica, versão 13.1.

3.3 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO DES:

Os DESs foram preparados no laboratório de equilíbrio de fases LEF/UNICAMP, seguindo o método de aquecimento e agitação, proposto por Dai *et al.* (2013). Antes da homogeneização o cloreto de colina (ChCl) foi seco a 105°C em estufa (Medicate, MD 1.3) por 36 horas, com maceração a cada 16 horas aproximadamente. Finalizada a

secagem, foi medido o teor de água usando Karl Fischer (KF) coulométrico (Trinitro Plus 848, Metrohm).

O preparo do DES seguiu as seguintes etapas: pesagem dos reagentes na proporção molar em balança analítica (Shimadzu, AXT224, precisão de 0.001g), para cada caso como se mostra na Tabela 3.4, em seguida foram misturados a seco em um almofariz com pistilo e transferidos para um erlenmeyer com adição de água na mistura, ajustando-se a porcentagem de água para 10% aproximadamente, conforme a umidade do ChCl quantificado inicialmente, com a finalidade em melhorar o tempo de preparação.

Tabela 3.4 – Relação molar das misturas eutéicas profundas

Nomenclatura	RH	DH	Relação Molar
ChCl:GLI	Cloreto de colina	D-Glicose	2,5:1
ChCl:SAC	Cloreto de colina	Sacarose	2,5:1

A mistura foi levada a um banho termostático com agitação interna (Dubnoff Q226) a uma temperatura de 80°C para ambos os DES preparados, até obter um líquido viscoso transparente que foi armazenado em dessecador até seu uso. A umidade da mistura do DES foi determinada por Karl Fischer.

3.3.1 – Caracterização térmica do DES:

Os DES preparados foram caracterizados por meio da análise térmica, calorimetria exploratória diferencial (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC) utilizando equipamento da marca Mettler Toledo DSC1 pertencente ao Laboratório de caracterização de biomassa, recursos analíticos e calibração – LRAC/UNICAMP. Uma amostra de 8 ± 1 mg da mistura foi coletada e pesada em cadinho de alumínio utilizando balança microanalítica marca Mettler Toledo MX5. Em seguida o cadinho foi fechado com tampa furada e levado ao equipamento para análise. A determinação dos eventos térmicos, foi feita em três etapas: (1) resfriamento: temperatura inicial de 25°C até -120°C, com uma taxa de -5°C/min com vazão de nitrogênio de 40mL/min; (2) isoterma: temperatura constante de -120°C durante 10 minutos, e (3) aquecimento: aumento de temperatura de -120°C até 120°C, com uma taxa de 10°C/min com vazão de nitrogênio de 40mL/min.

3.3.2 – Caracterização estrutural do DES:

Para a caracterização estrutural dos DES e dos componentes puros foi utilizado o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy* (FTIR) marca Cary 630 FTIR, localizado no Laboratório de Ciência Tecnologia e Engenharia de alimentos/UFPA, na região espectral de 4000-650 cm^{-1} .

3.4 – DETERMINAÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETAPA 3)

A terceira fase deste trabalho consistiu no estudo do comportamento das fases em ELL dos componentes (diluentes = água e 2-propanol, e o solvente = DES) que foram utilizados na quarta e última fase de estudo, que correspondeu a extração equilíbrio líquido-líquido (ExLL) de compostos fenólicos e antocianinas

As curvas binodais e dos diagramas de fase dos sistemas de ELL a base de DES, foram construídas como segue:

- 1) Para verificar a qualidade dos experimentos estudados foram reproduzidos dados da literatura (DA SILVA R., 2019), do sistema ChCl:GLI + 2-propanol + água a temperatura 25°C (Sistema 1).
- 2) Três sistemas inéditos foram estudados neste trabalho, ChCl:GLI + 2-propanol + água a 35°C (Sistemas 2), ChCl:SAC + 2-propanol + água a temperatura 25°C (Sistema 3) e o mesmo sistema a 35°C (Sistema 4).

3.4.1 Curva Binodal

Para encontrar as regiões de miscibilidade parcial dos componentes, região bifásica, e a de miscibilidade total dos componentes, região monofásica, foi utilizado o método de titulação turbidimétrica (*Cloud point*) usado com sucesso em sistemas de ELL compostos por DES (FARIAS; SOSA; et al., 2017; PASSOS et al., 2016). Uma quantidade inicial de 2-propanol (fase superior) ou de DES (fase inferior) foi pesada e colocada em célula de vidro encamisada com agitação constante a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $35 \pm 1^\circ\text{C}$, para ser titulada com a solução de DES ou de 2-propanol até encontrar o turvamento da mistura, ou seja, o *cloud point*. Quando a mistura se torna turva tem-se o começo da região de separação de fases no sistema. O terceiro componente (água) foi adicionado gota a gota até obter novamente um líquido transparente homogêneo (região monofásica). Este

procedimento foi repetido até obtenção de um conjunto de dados para construção da curva binodal.

A curva binodal foi ajustada às equações empíricas 3.3 e 3.4, que seguem:

$$[\text{Álcool}]_{FS} = A \times \exp\left(-\frac{[\text{DES}]_{FS}}{B}\right) + C \quad (3.3)$$

$$[\text{Álcool}]_{FI} = A \times \exp\left(-\frac{[\text{DES}]_{FI}}{B}\right) + C \quad (3.4)$$

Onde $[\text{DES}]$ e $[\text{Álcool}]$, correspondem à composição de DES e álcool. Os subscritos “FS” e “FI” designam, fase superior (fase rica em 2-propanol) e fase inferior (fase rica em DES), respectivamente. Finalmente A, B e C são constantes obtidas pela regressão dos dados da curva binodal determinada experimentalmente.

3.4.2. Determinação das linhas de amarração

O DES tem uma estrutura versátil em qualquer tipo de sistema bifásico devido à fraqueza das ligações de hidrogênio e em especial na presença de água. Os sistemas bifásicos a bases de DES podem ser considerados sistemas pseudo-ternários ou quaternários dependendo se o DES conserva a proporção molar inicial durante a formação das fases em equilíbrio. Por esse motivo, este estudo comparou duas metodologias encontradas na literatura para determinar as linhas de amarração.

Gravimetria:

Para quantificação das linhas de amarração por gravimetria foram escolhidos 6 pontos centrais dentro da curva binodal. Com frações iniciais conhecidas, foram pesados em triplicata os componentes do sistema com uma incerteza de 0,001g em um tubo de ensaio, agitadas até a completa dissolução. Os tubos foram colocados em um banho termostático (Tecnal-184) a temperatura de 25 ± 1 °C e 35 ± 1 °C, onde permaneceram durante 16 horas. Após atingir o tempo de equilíbrio, foram coletadas cuidadosamente amostras de cada uma das fases e pesadas.

As linhas de amarração considerando um sistema pseudoternário, foram construídas por meio do método gravimétrico descrito por Méréchuck, Andrews e Ansejo (1998). A eq. 3.5 e 3.6 foram resolvidas junto com as que. 3.3 e 3.4 para um sistema de 4 equações e 4 incógnitas.

$$[\text{Álcool}]_{FS} = \frac{[\text{Álcool}]_M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} \times [\text{Álcool}]_{FI} \quad (3.5)$$

$$[\text{Álcool}]_{FS} = \frac{[\text{Álcool}]_M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} \times [\text{Álcool}]_{FI} \quad (3.6)$$

Sendo M a composição global da mistura e, α a razão entre as massas da fase superior e da mistura (MERCHUK; ANDREWS; ASENJO, 1998).

Métodos analíticos: Para construção das linhas de amarração, considerando os sistemas quaternários, foram utilizadas as análises, *High performance Liquid Chromatography* (HPLC) e *Karl-Fischer* (KF). A água foi quantificada por KF. Os açúcares e 2-propanol foram quantificados por HPLC utilizando a metodologia de quantificação de açúcares e álcoois adaptada da metodologia de determinação estrutural de carboidratos e lignina em biomassa. As análises foram feitas com auxílio do equipamento ThermoScientific, modelo Diomex Ultimate 3000 com módulo de bomba: LPG-3400SD; módulo de Injetor WPD-3000 TSL com detector de índice de refração RI-101 (Shodex), coluna cromatográfica Marca Bio-Rad, modelo: Aminex HPX-87H. A fase móvel foi preparada com H₂SO₄ 5mM e água Milli-Q degaseificada em banho ultrassônico (Ecos-sonic Q13/40kHz). As condições de operação foram: vazão de 0,5 ml/min e temperatura de coluna de 20 °C. Cada fase foi coletada e filtrada com membrana PVDF 0,45µm DI13mm em vial âmbar de 2mL. As medições foram feitas em duplicata. No apêndice E são encontrados os cromatogramas.

3.4.3. Modelagem Termodinâmica:

Os dados de ELL foram correlacionados com o modelo NRTL (Non Random Twou Liquids), proposto por Renon e Prausnitz (1968). A estimativa dos parâmetros da interação energética entre as moléculas é considerada na forma de interação binária, os quais são obtidos a partir do ajuste de dados experimentais.

Para a modelagem termodinâmica e obtenção dos parâmetros de interação binária do modelo NRTL foi utilizado o programa TM-LLE 2.0 desenvolvido em linguagem Fortran por Stragvitch e D'Ávila (1997). Este procedimento é baseado no método

simplex modificado (Nelder e Mead, 1965) e consiste na minimização de uma função objetivo S baseada na concentração, conforme a Eq. 3.7.

$$S = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left[\left(x_{ijk}^{I exp} - x_{ijk}^{I calc} \right)^2 + \left(x_{ijk}^{II exp} - x_{ijk}^{II calc} \right)^2 \right] \quad (3.7)$$

Onde D corresponde ao número de conjunto de dados, N e M, o número de componentes e de linhas de amarração em cada conjunto de dados, respectivamente; I e II representam as duas fases líquidas em equilíbrio e “exp” e “calc” referenciam os valores experimentais e calculados das frações molares fases.

Uma vez obtidos os parâmetros pelo procedimento descrito anteriormente, a qualidade dos mesmos e sua representatividade foram comprovadas através de comparações entre as composições experimentais e calculadas pelos modelos que utilizam esses parâmetros por meio do desvio médio quadrático (RMSD), dado pela Eq. 3.8.

$$RMSD = 100 \sqrt{\frac{\sum_j^M \sum_i^{N-1} \left[\left(x_{ij}^{I exp} - x_{ij}^{I calc} \right)^2 + \left(x_{ij}^{II exp} - x_{ij}^{II calc} \right)^2 \right]}{2MN}} \quad (3.8)$$

3.4.4. Caracterização físico-química dos sistemas:

- *Medição de pH*: Em cada uma das fases foram feitas medições de pH em triplicata utilizando um medidor de pH (Hanna, HI 2221), previamente calibrado com três soluções tampão (Valores de pH de 4,00; 7,00 e 10,00).
- *Densidade*: Em cada fase foi determinada a densidade utilizando o densímetro Anton Paar, DMA 5000 M do laboratório VALPET/FEQ/UNICAMP. Foram injetadas no densímetro aproximadamente 5 ml de cada amostra. Cada medida foi repetida 3 vezes. As medidas foram feitas entre as temperaturas de 25°C e 35°C, respectivamente.

3.5 - EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) PARTIÇÃO DE ANTOCIANINAS E POLIFENÓIS TOTAIS (ETAPA 4)

Para realizar a ExLL, foram escolhidas 3 linhas de amarração. Uma alíquota do extrato de antocianinas obtido no item 3.2.2 com uma composição inicial de água e 2-propanol foi acrescentado ao DES em um tubo de ensaio e medidas as massas com uma balança analítica (Shimadzu, AXT224, precisão de 0,001g) até conseguir a concentração localizada no ponto geométrico central da linha de amarração previamente escolhida. Os ajustes das composições foram realizados com o auxílio dos sistemas bifásicos caracterizados no item 3.2.4.

Uma vez feita a mistura de cada uma das composições, as soluções foram misturadas durante 1 min em um vortex marca Fisatom e colocadas em um banho termostático (Quimis, Q214M2) à temperatura correspondente do sistema (25°C ou 35°C). O sistema foi mantido à temperatura constante durante 16h, o final desse período foram coletadas amostras de cada uma das fases e pesadas. Também foram quantificadas as densidades conforme no item 3.4.3. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Após coleta das fases foram quantificadas as antocianinas e os polifenóis totais conforme descrito no item 3.2.3, com a diferença de que o branco para cada amostra foi preparado com a fase do sistema puro (item 3.2.4). Com a finalidade de analisar a ExLL, foram calculados os coeficientes de partição (K) e eficiência de extração (%EE) como segue:

- **Coefficientes de partição:**

Foram quantificados os coeficientes de partição das antocianinas (K^{ANT}) e dos polifenóis totais (K^{PT}). O coeficiente de partição das antocianinas foi determinado como a relação entre a concentração da antocianina na fase rica em DES e na fase rica em álcool (FARIAS; PASSOS; et al., 2017), como segue a eq. 3.9.

$$K^{ANT} = \frac{[Anto]_{DES}}{[Anto]_{Alcool}} \quad (3.9)$$

O K^{PT} , coeficiente de partição dos polifenóis totais, foi determinado como segue a eq. 3.10.

$$K^{PT} = \frac{[PT]_{DES}}{[PT]_{Alcool}} \quad (3.10)$$

- **Eficiência de extração:**

Para determinar a eficiência de extração (%EE) de antocianinas e polifenóis totais foram utilizadas a eq. (3.11) e (3.12), respectivamente.

$$\%EE^{ANT} = \frac{w_{FI}^{ANT}}{w_{FI}^{ANT} + w_{FS}^{ANT}} \quad (3.11)$$

$$\%EE^{PT} = \frac{w_{FI}^{PT}}{w_{FI}^{PT} + w_{FS}^{PT}} \quad (3.12)$$

CAPITULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – AQUISIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL (ETAPA 1):

Foi realizado um estudo da composição centesimal da bebida de açaí liofilizada (proteína, lipídeos, umidade e resíduo mineral fixo – RMF). Os resultados são reportados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição centesimal do açaí liofilizado

Composição	Quantidade (g/100g)
Proteína	9.73±0.05
Lipídeos	44.20±0.96
RMF	2.97±0.23
Umidade	4.08±0.14

Com base nos resultados reportados na Tabela 4.1 pode-se observar que o principal componente do açaí é a fração lipídica, fazendo dele um alimento altamente calórico. Os lipídeos, presentes em grande quantidade no açaí, têm alta solubilidade em compostos orgânicos, como álcoois, e também poderiam ser investigados. No entanto, a proposta deste estudo consistiu em estudar sistemas bifásicos que, com polaridades diferentes como é o caso dos sistemas formados por DES + 2-propanol + água, podem permitir o avanço na recuperação das biomoléculas, apolares e polares, do açaí em um processo de separação líquido-líquido.

4.2 – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ETAPA 2)

Os resultados do planejamento Box-Behnken utilizados para determinar as condições de obtenção do extrato de antocianinas do açaí utilizando uma solução extratora de 2-propanol e água são apresentados na seção 4.2.1, e o extrato obtido sob as melhores condições foram utilizados na etapa de partição (seção 4.5).

4.2.1 – Planejamento Box-Behnken:

Para realizar a etapa de partição foi necessário obter um extrato líquido de antocianinas de açaí com uma solução extratora de 2-propanol e água (componentes para a formação de sistemas bifásicos). Na Tabela 4.2, estão as variáveis de entrada e respectivos níveis, nas formas original e codificada, e os resultados obtidos a partir do planejamento Box-Behnken para as respostas: antocianinas monoméricas (ATM) em mg

cia-3-gli/g açaí liofilizado e polifenóis totais (PT) mg AGE/g açaí liofilizado, de acordo com os níveis adotados para as variáveis de entrada, razão água:isopropanol (RAI), razão sólido:líquido (RSL) e Temperatura (T), para uma confiança de 95%.

Tabela 4.2 – Matriz de experimento do planejamento Box-Behnken

Corridas Experimentais	Variáveis de entrada						Variáveis de Resposta	
	Codificadas			Naturais				
	X ₁	X ₂	X ₃	RAI	RSL	T	ATM	PT
1	-1	-1	0	30:70	1:15	35	3,44	7,08
2	1	-1	0	70:30	1:15	35	4,05	14,33
3	-1	1	0	30:70	1:5	35	3,18	5,73
4	1	1	0	70:30	1:5	35	3,88	12,18
5	-1	0	-1	30:70	1:10	20	2,48	3,27
6	1	0	-1	70:30	1:10	20	3,84	10,82
7	-1	0	1	30:70	1:10	50	3,39	9,66
8	1	0	1	70:30	1:10	50	3,74	12,29
9	0	-1	-1	50:50	1:15	20	4,47	16,53
10	0	1	-1	50:50	1:5	20	4,01	14,45
11	0	-1	1	50:50	1:15	50	4,48	19,86
12	0	1	1	50:50	1:5	50	5,53	18,22
13	0	0	0	50:50	1:10	35	4,39	15,14
14	0	0	0	50:50	1:10	35	4,42	15,94
15	0	0	0	50:50	1:10	35	4,28	16,63

Observa-se na Tabela 4.2 que os valores de ATM variam de 2,48 a 5,53 mg cia-3-gli/g açaí liofilizado. As condições de extração que propiciam maior teor de ATM são as da corrida experimental 12 (RAI = 50:50, RSL = 1:5, T = 50°C) com um valor de 5,53 mg cia-3-gli/g açaí liofilizado, e as condições de entrada em que se obtém menor teor de ATM constam na corrida experimental 5 (RAI-30:70, RSL-1:10, T=20°C) com um valor de 2,48 mg cia-3-gli/g açaí liofilizado.

A amplitude observada nas respostas ATM e PT, na análise preliminar da matriz de experimentos apresentada na Tabela 4.2, demonstra que o domínio experimental

adotado para as variáveis de entrada influência, em menor ou maior escala, as respostas obtidas.

A partir dos resultados obtidos neste estudo e os dados encontrados na literatura, se estima que o conteúdo de antocianinas no extrato de açaí obtido apresenta valores similares aos da literatura, em algumas condições de extração até maiores. Schauss *et al.* (2006) obtiveram um valor de antocianinas totais de 3,19 mg/g peso seco ao executar a extração com metanol. Rodrigues Batista *et al.* (2015) reportam um valor de 1,37 mg AT/g da polpa residual após usarem CO₂ supercrítico para extrair óleo do açaí. O estudo de Garzón *et al.* (2017), apresenta um valor de 4,58 mg cia-3-gli/g peso seco de açaí liofilizado da *Euterpe oleracea* ao extrair com metanol localizada na Colômbia e Lucas *et al.* (2018), encontraram um valor de 5,87 mg cia-3-gli/g açaí liofilizado utilizando também metanol.

Destaca-se na literatura que as extrações geralmente utilizam solventes altamente polares como metanol, etanol, acetona e água, obtendo-se uma alta seletividade das antocianinas (BORGES *et al.*, 2011). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.2 foi possível obter um extrato de antocianinas comparado ao reportado na literatura apesar do 2-propanol ser menos polar que o etanol ou metanol. Esse resultado se justifica devido à modulação da polaridade da água com o álcool secundário, essa combinação demonstra ter afinidade com as antocianinas e também por isso é usada no particionamento das antocianinas nos sistemas bifásicos estudados neste trabalho.

Na Tabela 4.2 pode ser observado também que, para os PT foram encontrados valores entre 3,27 e 19,86 mg AGE/g de açaí liofilizado. As condições de extração que geraram maior teor de PT foi a da corrida 11 (RAI = 50:50, RSL = 1:15, T = 50°C) com um valor de 19,86 mg AGE/g de açaí liofilizado, e as que proporcionaram menor teor de PT foi na corrida 5 (RAI = 30:70, RSL = 1:10, T = 20°C) com um valor de 3,27 mg AGE/g de açaí liofilizado.

De forma similar, os PT obtidos neste estudo foram maiores na razão de 2-propanol e água, 50:50, implicando na maior contribuição polar por parte da água e na contribuição do poder alto de extração por parte do álcool. Os valores de PT para a espécie *Euterpe oleracea* encontrados na literatura são superiores. Gordon *et al.* (2012) reportam uma quantidade de PT com amostras obtidas nos períodos de safra e de entressafra de 34,37 a 32,68 mg AGE/g peso seco. Rodrigues Batista *et al.* (2015) utilizando fluidos supercríticos com CO₂ obtiveram 75,65 mg AGE/g açaí liofilizado, e Garzón *et al.* (2017) reportam valores de 47,86 mg AGE/g peso seco. O momento polar da solução extratora

de 2-propanol e água, é menos seletivo para os diferentes compostos fenólicos encontrados no açaí (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009).

4.2.2 – Análise estatística dos resultados:

Para determinar as diferenças significativas dentro do domínio experimental estudado foi feita uma análise comparativa de cada um dos efeitos (Tabela 4.3) e as análises de variância (ANOVA) (Tabela 4.4 e Tabela 4.5), com 95% de confiança e auxílio do programa computacional *Statistica*, versão 13.1.

Tabela 4.3 – Estimativa dos efeitos e probabilidade de significância (p) para as respostas ATM e PT

Fatores	ATM		PT	
	Efeito	<i>p</i>	Efeito	<i>P</i>
Intercepto	3,87	0,000*	12,04	0,000*
X ₁	0,75	0,004*	5,97	0,007*
X ₁ ²	0,99	0,001*	7,16	0,002*
X ₂	0,04	0,050	-1,8	0,076
X ₂ ²	-0,27	0,017*	-1,09	0,107
X ₃	0,58	0,007*	3,73	0,019*
X ₃ ²	0,00	0,878	-0,27	0,557
X ₁ X ₂	0,04	0,592	-0,40	0,641
X ₁ X ₃	-0,51	0,018*	-2,46	0,081
X ₂ X ₃	0,75	0,008*	0,22	0,794

*Efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Tabela 4.4 – Análise de variância (ANOVA) para ATM

Fator	SQ	GL	QM	F	<i>P</i>
X ₁	1,139	1	1,139	234,200	0,004*
X ₁ ²	3,654	1	3,655	751,781	0,001*
X ₂	0,003	1	0,003	0,661	0,501
X ₂ ²	0,267	1	0,267	54,999	0,017*
X ₃	0,684	1	0,684	140,702	0,007*
X ₃ ²	0,000	1	0,000	0,033	0,872
X ₁ X ₂	0,002	1	0,002	0,398	0,593
X ₁ X ₃	0,257	1	0,257	52,874	0,018*
X ₂ X ₃	0,571	1	0,571	117,435	0,008*
Falta de Ajuste	0,218	3	0,073	15,006	0,063
Erro Puro	0,009	2	0,004		
Total	6,990	14			

*Efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Tabela 4.5 – Análise de variância (ANOVA) para PT

Fator	SQ	GL	QM	F	P
X ₁	71,298	1	71,298	127,569	0,007*
X ₁ ²	189,414	1	189,414	338,906	0,003*
X ₂	6,513	1	6,513	11,654	0,076
X ₂ ²	4,379	1	4,379	7,836	0,107
X ₃	27,927	1	27,927	49,969	0,019*
X ₃ ²	0,272	1	0,272	0,486	0,558
X ₁ X ₂	0,165	1	0,164	0,294	0,642
X ₁ X ₃	6,054	1	6,054	10,832	0,081
X ₂ X ₃	0,049	1	0,049	0,088	0,794
Falta de ajuste	1,633	3	0,544	0,974	0,543
Erro Puro	1,118	2	0,559		
Total	316,019	14			

*Efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Verifica-se na Tabela 4.3 que as variáveis X₁ (razão água:isopropanol) e X₃ (temperatura) apresentam um efeito significativo sobre a quantidade de antocianinas, o qual permite distinguir que um aumento da variável X₁ aumenta em média 0,75 mg cia-3-gli/g de açaí liofilizado. Simultaneamente observa-se que um aumento da variável X₃ aumenta em média 0,58 mg cia-3-gli/g de açaí liofilizado. Pode-se supor então que um aumento da polaridade da solução extratora composta por água:2-propanol melhora a extração das antocianinas, que também são polares. Também a temperatura é uma condição de operação que ajuda aumentar a transferência de massa para a extração de antocianinas.

A variável X₂ (razão sólido:líquido) não teve efeito significativo na variável de resposta de ATM, porém o termo quadrático teve efeito significativo onde ao aumentar a razão sólido:líquido diminui a quantidade de antocianinas. Na interação binária X₂X₃ teve um efeito significativo. Isso demonstra que existe uma forte relação entre as variáveis temperatura e a razão sólido-líquido, pois o aumento da quantidade de sólido no volume da solução extratora, em conjunto com aumento da temperatura, resulta num aumento de 0,75 mg cia-3-gli/g de açaí liofilizado, em média.

Os polifenóis totais também apresentam variáveis significativas em X₁ (razão água:2-propanol) e X₃ (temperatura). De forma similar às ATM, um aumento da variável X₁ aumenta 5,97 mg AGE/g de açaí liofilizado, do mesmo modo um aumento da variável X₃ o valor dos PT aumenta 3,73 mg AGE/g de açaí liofilizado, em média. Confirmando assim, que aumento da polaridade da solução extratora ajuda no aumento da quantidade de ATM e PT e simultaneamente o aumento da temperatura permite maior transferência

de massa para aumentar a quantidade de polifenóis totais. Verificou-se que a variável X_2 (razão sólido:líquido) não teve influência nas respostas ATM e PT, somente a interação binária com a variável X_3 na resposta ATM foi significativa.

4.2.3 – Superfície de resposta:

A partir da análise anterior, com base na Tabela 4.3, concluiu-se que as variáveis de entrada X_1 (razão água:2-propanol) e X_3 (temperatura) influenciam positivamente as respostas e o aumento delas acarreta um acréscimo tanto da quantidade de ATM, como de PT. Esses efeitos positivos são apreciados nos gráficos de superfície de resposta e curvas de nível (ou contornos), ilustradas nas Figuras 4.1 e 4.2, respetivamente. Nessas Figuras a variável X_3 está na ordenada e X_1 na abscissa e a variável X_2 foi fixada no nível mais alto ($X_2 = 1$), uma vez que a mesma tem individualmente ou combinada com X_3 um efeito positivo e desejável na resposta ATM (Figura 4.1).

Para a resposta PT, a variável X_2 foi mantida fixa no ponto central ($X_2 = 0$) pois para essa variável e suas combinações binárias não foi observada influência estatística na resposta em questão (Figura 4.2).

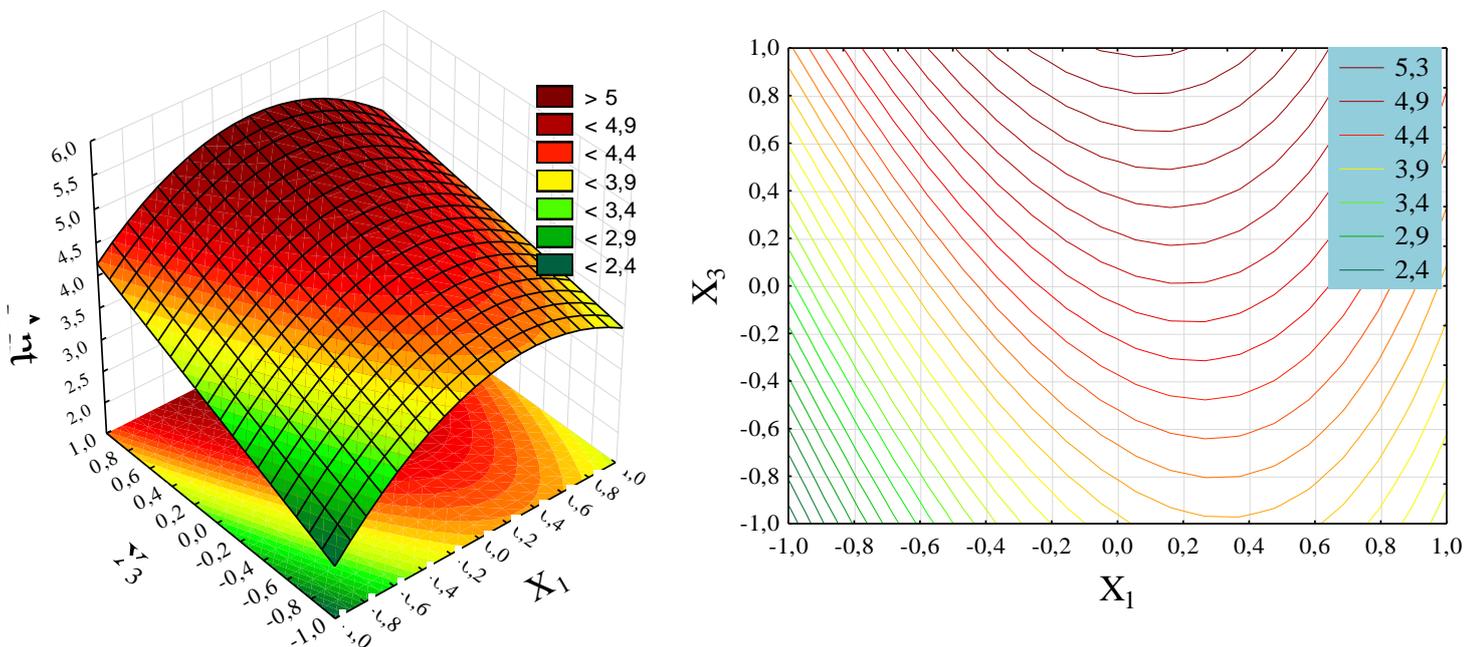


Figura 4.1 – Superfície de resposta e curvas de contorno ATM

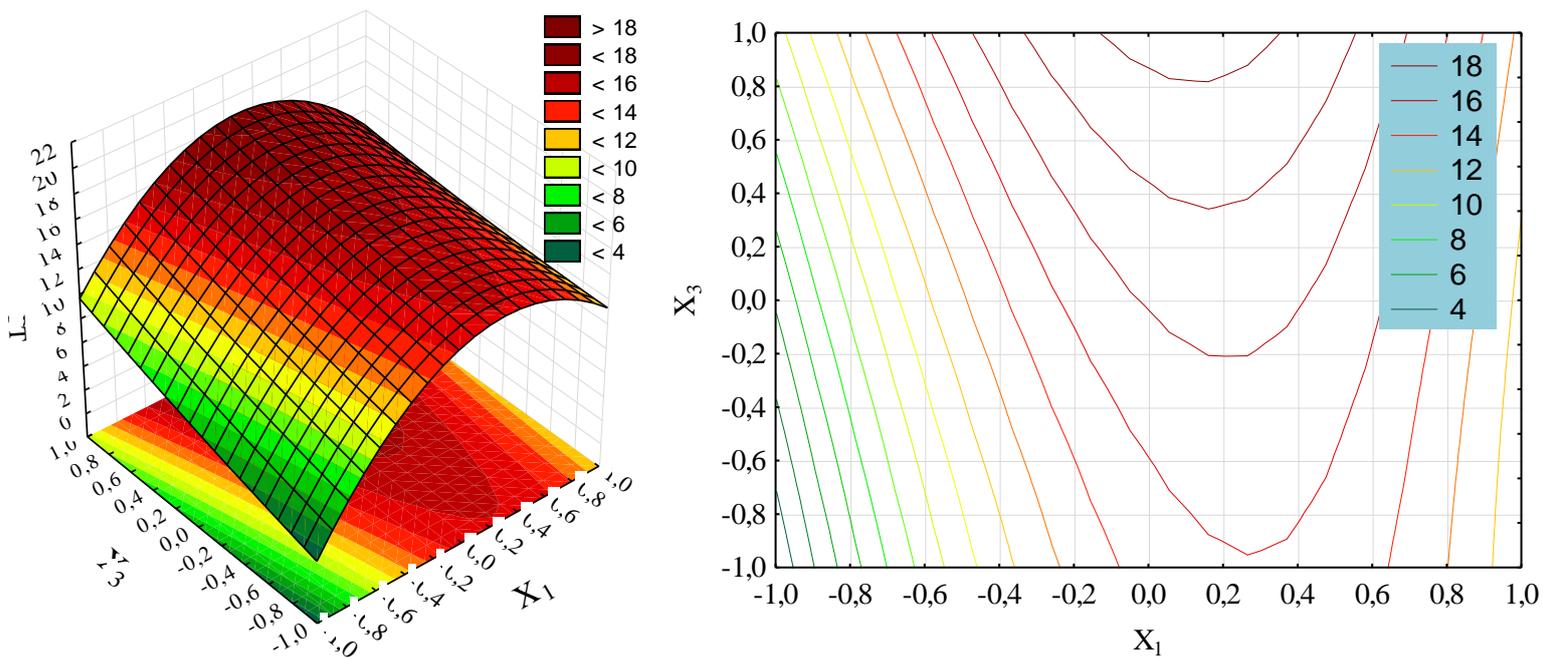


Figura 4.2 – Superfície de resposta e curvas de contorno PT.

Assim, a representação gráfica da superfície de resposta e das curvas de nível evidenciam que para obtenção dos maiores valores de ATM e PT, a variável de entrada X_1 (razão água:2-propanol) deve estar próxima no ponto central (50:50, água:isoporpanol) e a variável de entrada X_3 (temperatura) localizada no nível codificado +1 (50°C), mantendo-se a variável X_2 fixada em um valor conveniente para se obter a resposta desejada. Assim, confirma-se o efeito positivo de cada uma das variáveis X_1 e X_3 no teor de ATM e PT.

4.2.4 – Modelos polinomiais de segundo grau:

Os modelos completos, propostos para as respostas de ATM e PT por análise de regressão, utilizando-se o software *Statistica*, são observados nas Eq. 4.1 e 4.2, respectivamente.

$$ANT = 3,87 + 0,38x_1 + 0,50x_1^2 - 0,14x_2^2 + 0,30x_3 - 0,25x_1x_3 + 0,38x_2x_3 \quad (4.1)$$

$$PT = 12,035 + 2,99x_1 + 3,58x_1^2 + 1,86x_3 \quad (4.2)$$

4.2.5 – Qualidade dos modelos:

A qualidade dos modelos propostos foi analisada com base nas premissas ou pressupostos da estatística paramétrica, os quais devem ser obedecidos para que as tomadas de decisão sejam confiáveis, a partir da aplicação de modelos preditivos, dentro do domínio experimental e da confiança estabelecida.

Coefficiente de determinação: Verifica-se na Tabela 4.7 que os valores dos coeficientes de determinação obtidos na análise estatística foram superiores a 0,967 indicando que os modelos ajustados obtidos para as respostas (Equações 4.1 e 4.2) por meio da análise de regressão, explicam mais de 96% das variabilidades dos dados experimentais.

Análise de resíduos: A confirmação do bom ajuste de cada modelo proposto, pode ser obtida pela análise das Figuras 4.3 e 4.4, nas quais se observa uma distribuição aleatória dos resíduos em função dos valores preditos pelos modelos para as respostas ATM e PT, respectivamente, obedecendo a premissa estatística de independência.

Verifica-se também que as amplitudes dos resíduos são baixas, com valores entre 0,3 e -0,3 para ATM e valores entre 0,8 e -0,8 para a resposta PT.

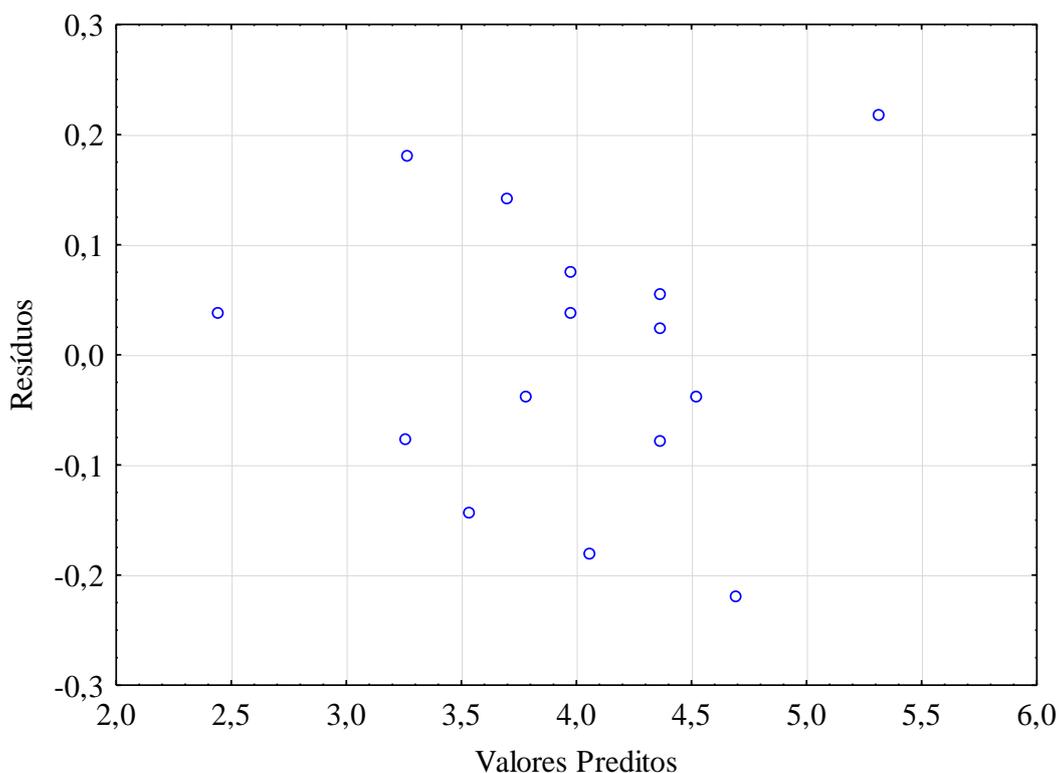


Figura 4.3 – Gráfico da distribuição dos resíduos para o modelo de ATM

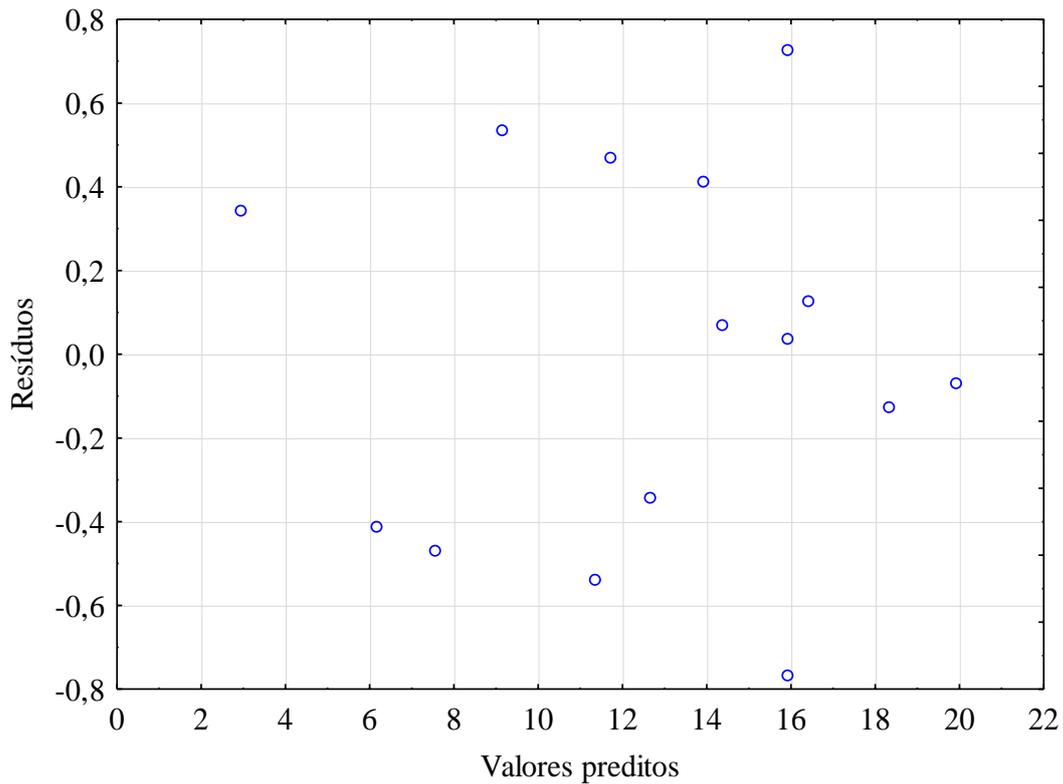


Figura 4.4 – Gráfico da distribuição dos resíduos para PT

Teste de normalidade: A partir da análise das Figuras 4.5 e 4.6 conclui-se que não há evidência plausível de que os resíduos não seguem uma distribuição de probabilidade normal, tanto para a resposta ATM quanto para PT.

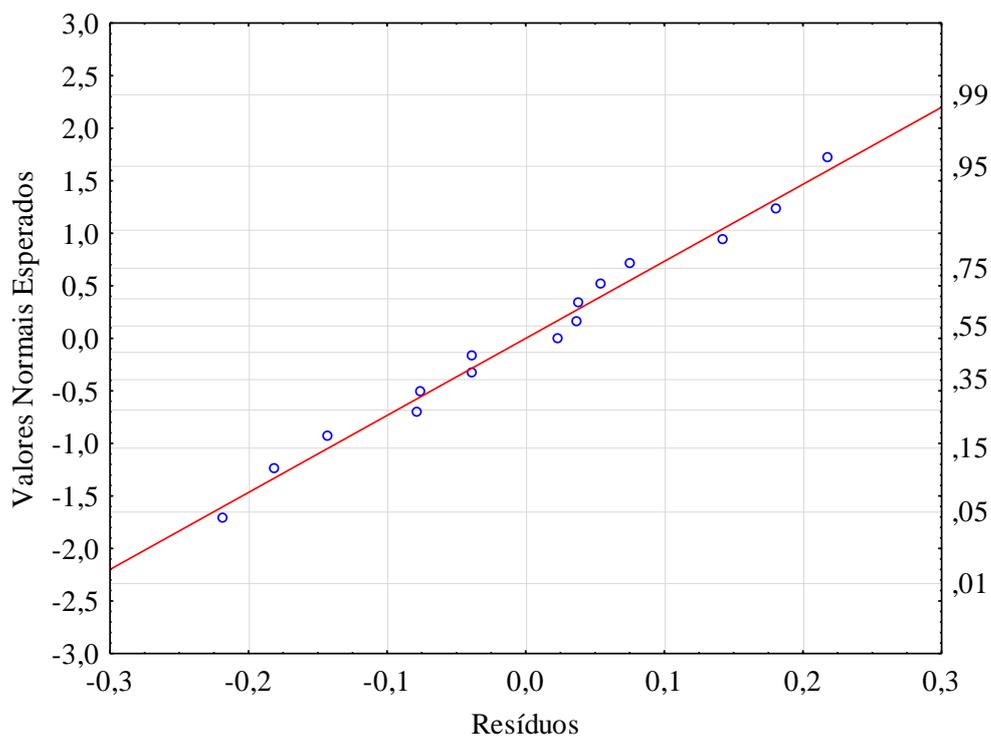


Figura 4.5 – Distribuição normal para ATM.

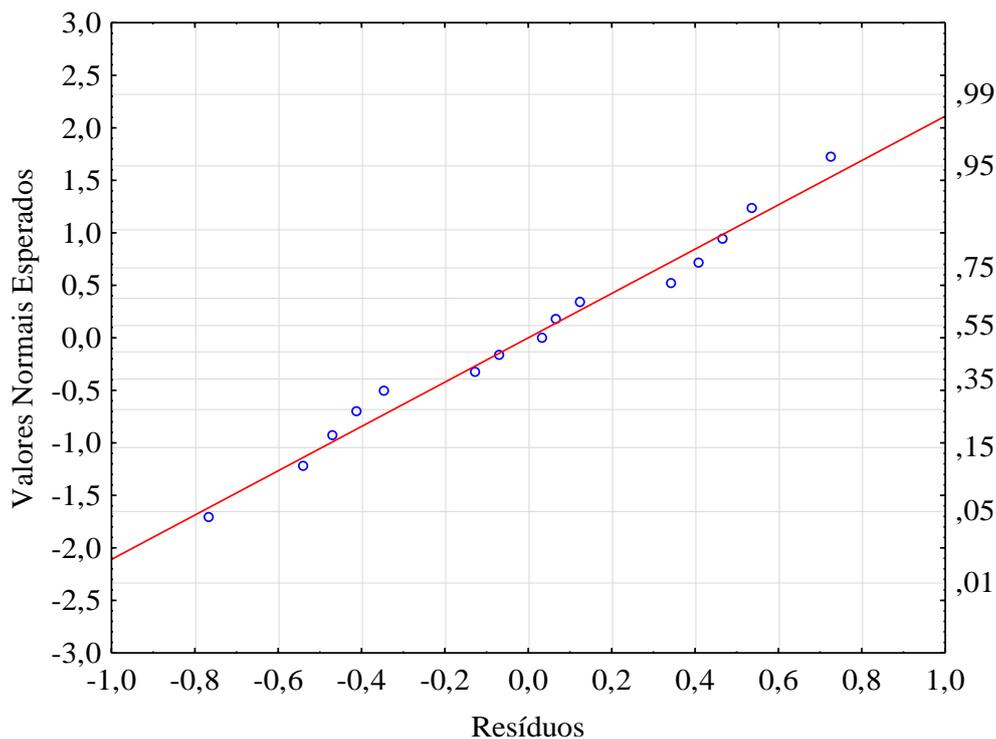


Figura 4.6 – Distribuição normal para PT

Concluiu-se que cada um dos preceitos da estatística foram cumpridos satisfatoriamente confirmando uma boa qualidade dos modelos propostos. A Tabela 4.6 resume os resultados estatísticas para que seja feito um diagnóstico da qualidade dos ajustes para cada um dos modelos propostos, com base nos valores de R^2 e na análise de resíduos.

Tabela 4.6 – Análise de resíduos dos modelos propostos para as respostas ATM e PT

Resp	Resíduos			Ajuste		
	R^2	Independência	Normalidade	Variância	Falta de ajuste	Diagnóstico
ATM	0,9673	Sim	Sim	Homogênea	Não	Preditivo
PT	0,9913	Sim	Sim	Homogênea	Não	Preditivo

4.2.6 – Função de desejabilidade:

A função desejabilidade é uma análise multivariada que permite obter valores ótimos de quantidades simultâneas. Para esse estudo foi aplicada uma análise de desejabilidade com a finalidade de otimizar simultaneamente as respostas ATM e PT e assim obter um extrato com a maior quantidade de biocompostos com a solução extratora 2-propanol:água, dentro do domínio experimental adotado neste estudo.

Os parâmetros para encontrar um coeficiente de desabilidade D próximo a 1, foram estabelecidos com uma desejabilidade nos valores 1 da resposta ótimas de ATM e PT, um fator de grade de 60 pontos para as três variáveis (X_1 , X_2 , X_3) e os valores dos expoentes “s” e “t” que definem a taxa de variação da desejabilidade do modelo global, que foram 1 e 3, respectivamente. Assim, a Figura 4.7 ilustra o perfil obtido da função desabilidade com D igual 0,996 (excelente). Então, as condições ótimas para as respostas ATM e PT foram, em termos das variáveis codificadas, $X_1 = 0,1$; $X_2 = +1$ e $X_3 = +1$. O que em variáveis naturais correspondem a uma razão água:2-propanol igual a 52:48, razão sólido:líquido de 1:5 e temperatura 50°C.

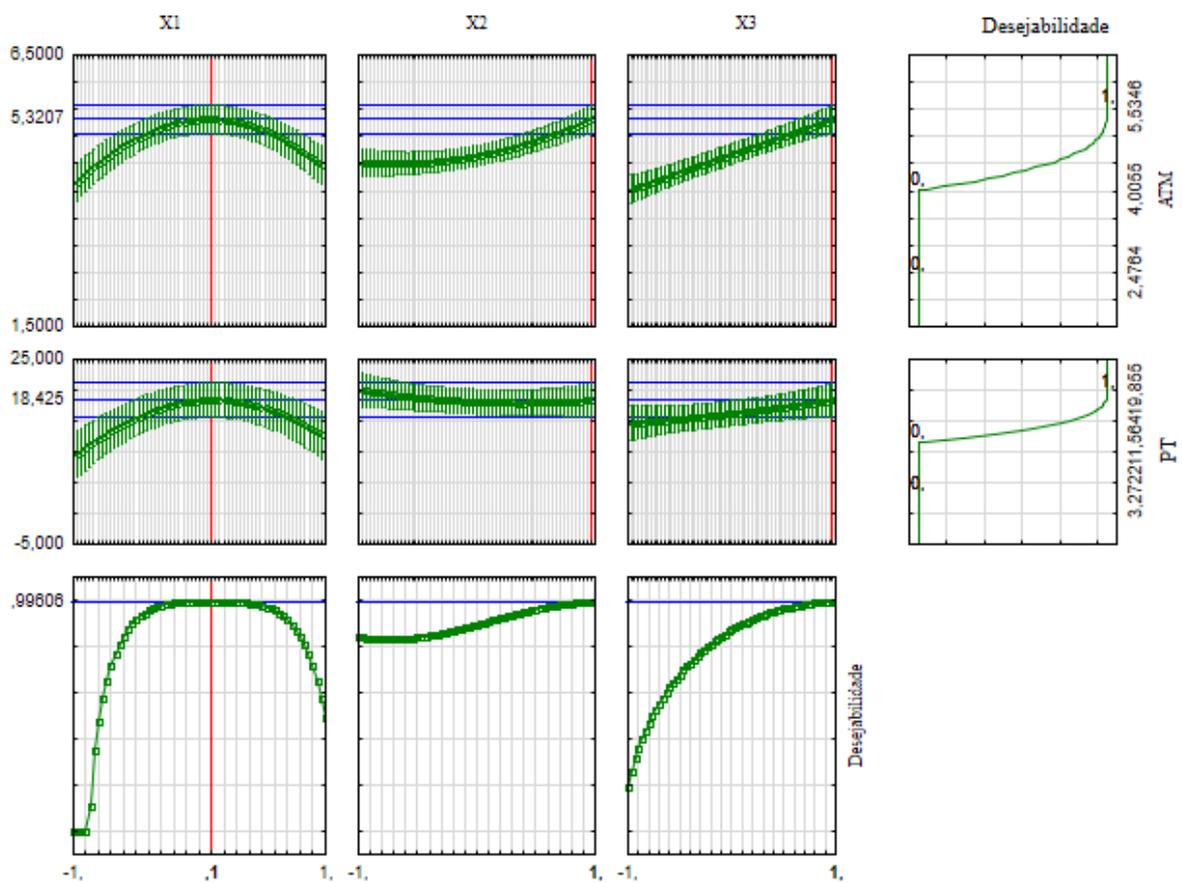


Figura 4.7 – Função de desejabilidade para ATM e PT.

4.3 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DESs (ETAPA 2)

Uma vez obtido o extrato de antocianinas com a 2-propanol e água, os DES constituídos por ChCl:GLI e ChCl:SAC foram preparados (Ver Figura 4.8).

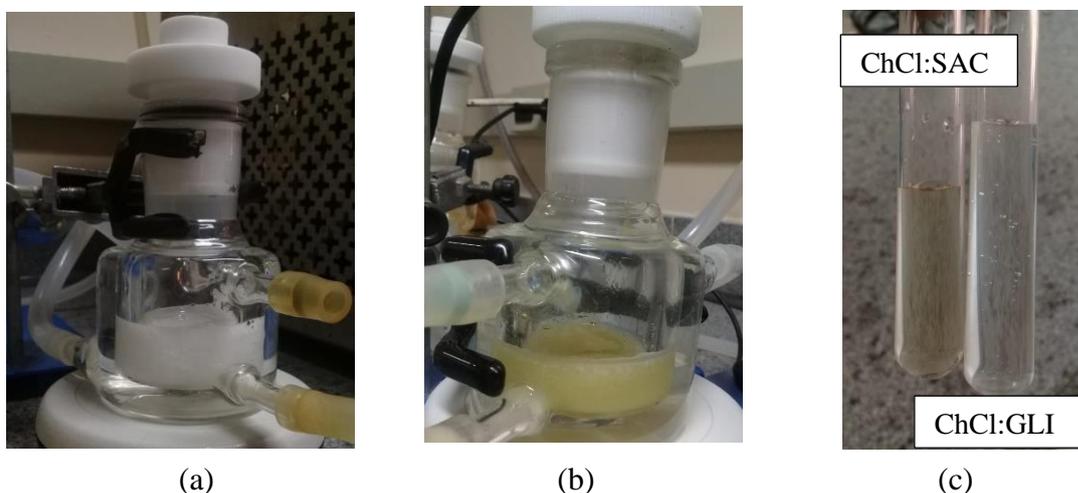


Figura 4.8 – Preparação do DES; a) DES ChCl:GLI transição de sólido a líquido, b) DES ChCl:SAC transição de sólido a líquido e c) Obtenção DES em estado líquido.

4.3.1 – Caracterização térmica dos DES

Os termogramas dos DES com 10% (p/p) de água, apresentadas na Figura 4.9 e 4.10, representa o comportamento térmico dos solventes constituídos por ChCl:GLI e ChCl:SAC, respectivamente.

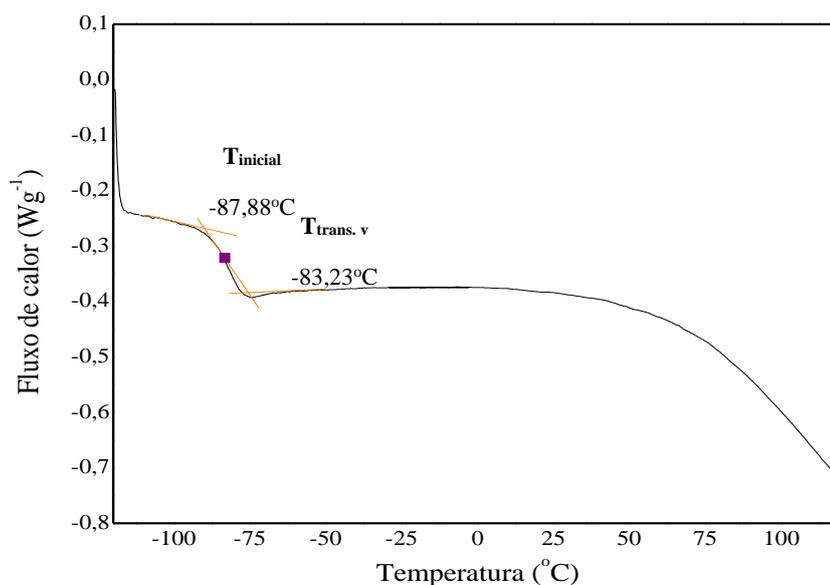


Figura 4.9 – Termograma DSC do ChCl:GLI com 10% (p/p) de água.

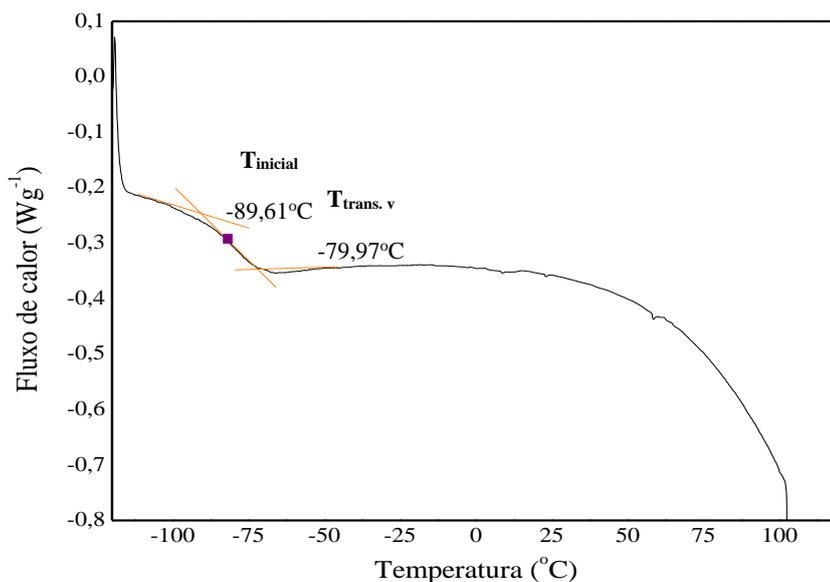


Figura 4.10 – Termograma DSC do ChCl:SAC com 10% (p/p) de água.

Observou-se que os DES tiveram um deslocamento da linha base caracterizado por uma transição de segunda ordem. Esse comportamento térmico é conhecido como transição vítrea (T_g), uma transição de fase de um estado sólido-vítreo para um estado líquido-gelatinoso que ocorre com o aumento da temperatura (LEITE; MURR; PARK, 2005). As T_g 's encontradas foram de $-83,23^\circ\text{C}$ e $-79,97^\circ\text{C}$ para o ChCl:GLI e ChCl:SAC, respectivamente; ou seja, ambos os DESs são líquidos estáveis em temperaturas extremamente baixas. Esses resultados estão em concordância com a literatura que descreve os DES, em especial os que contém água, como complexos supramoleculares que não apresentam um ponto de fusão em temperaturas acima de -120°C , considerados também como misturas de baixa temperatura de transição (MBTT) (DAI et al., 2013; FRANCISCO; VAN DEN BRUINHORST; KROON, 2012).

4.3.2 – Caracterização estrutural dos DESs por FTIR-

Os espectros de cada um dos DES e de seus componentes individuais são encontrados na Figura 4.11 e 4.12.

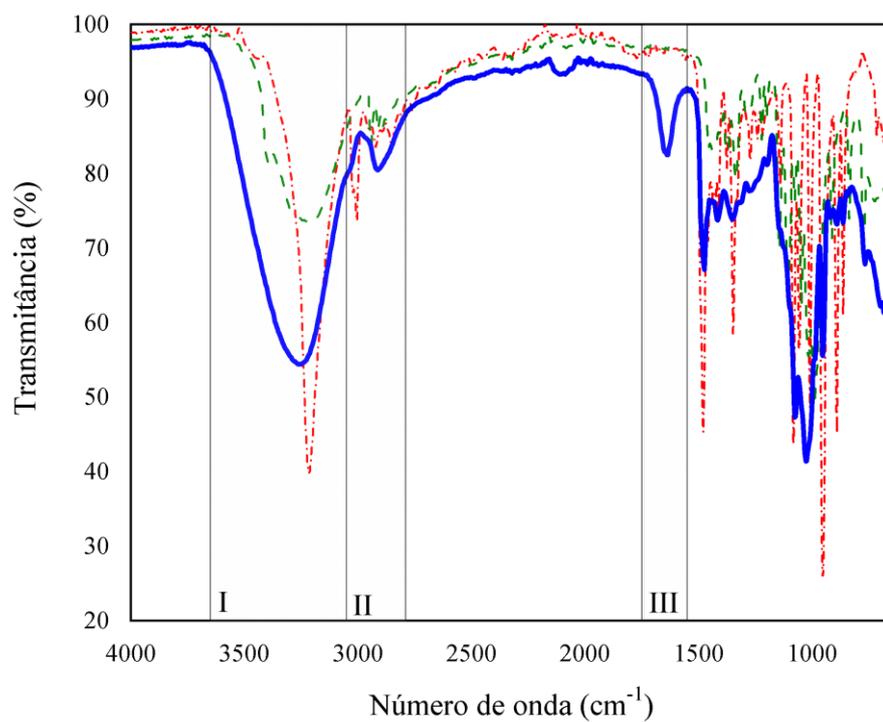


Figura 4.11 – Espectro FTIR do cloreto de colina puro (-.-), glicose pura (---) e ChCl:GLI (—).

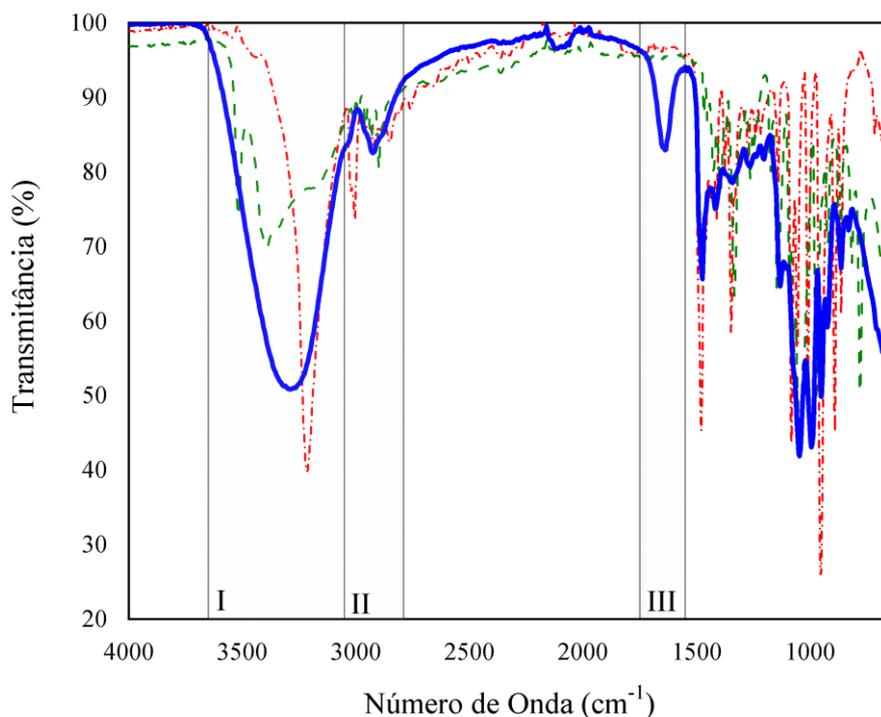


Figura 4.12 – Espectro FTIR do cloreto de colina de colina puro (-.-), sacarose pura (---) e ChCl:SAC (—).

Observou-se que os espectrogramas tiveram três regiões específicas que correspondem a uma modificação estrutural dos componentes individuais comparados com os DES formados. Na faixa entre $3650 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ (I), evidenciou-se estiramentos característicos dos grupos funcionais OH dos componentes puros ChCl, glicose e sacarose, tendo a linha de base do sal maior estiramento (FLORINDO et al., 2017; WIERCIGROCH et al., 2017). O DES apresenta uma amplificação da região de comprimento de onda, característica de uma interação intermolecular de ligações de hidrogênio O-H (PAVIA et al., 2008), e deslocando as bandas de estiramentos dos grupos funcionais principais de OH presentes nas estruturas dos componentes puros, porém também existe a interferência da quantidade de água.

Na faixa espectral de $3050 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ (II), são localizados estiramentos de frequências C-H característicos de grupos CH/CH₂ para os sacarídeos (WIERCIGROCH et al., 2017). Para o sal também são observados estiramentos de grupos CH/CH₂, porém com um estiramento de maior intensidade em 3000 cm^{-1} característicos de grupos CH₃ (PAVIA et al., 2008). Adicionalmente, observou-se na formação do DES um estiramento

de banda na mesma frequência dos enlaces C-H de grupos CH/CH₂ e deslocando a banda característica dos grupos CH₃ do sal. Na literatura, existe evidencia de que os grupos CH₃ do ChCl são um sítio ativo para a formação de ligações de hidrogênio com os DH (CRESPO et al., 2019; WENG; TONER, 2018), assim evidenciou-se que o deslocamento da banda para as metilas evidencia uma interação com o DH.

Na faixa espectral de 1725-1550 cm⁻¹ (III) há um estiramento na linha base do DES que é ausente nos compostos puros. De forma geral, nessa faixa são encontrados estiramentos de grupos carbonilas (PAVIA et al., 2008), intuindo assim a formação de um grupo funcional do tipo carbonila na estrutura do DES, os quais podem ser proporcionados pelas interações entre o ChCl e os sacarídeos.

A partir das análises com FTIR foram identificadas mudanças estruturais específicas dos componentes individuais do DES dos grupos funcionais OH e os grupos metilas do cloreto de colina, os quais são os possíveis sítios de ligações de hidrogênio que formam o DES.

4.4 – DETERMINAÇÃO DE DADOS DE EQUILÍBRIO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETAPA III)

A determinação de dados de ELL com os componentes puros, antes da partição é importante para entender o comportamento do sistema. Por isso neste estudo foram determinados os diagramas de fases dos componentes puros.

A Figura 4.13a mostra as curvas binodais representadas como sistemas pseudo-ternários a base de ChCl:GLI comparados com os dados encontrados na literatura (SILVA, 2019). Observa-se a reprodução adequada dos dados experimentais com um desvio de 0,9%. Todos os sistemas estudados estão apresentados na Figura 4.13b. Pode-se observar que embora a temperatura tenha aumentado de 25 para 35 °C as curvas binodais não apresentam uma mudança significativa, ou seja, embora haja o aumento da temperatura a região de miscibilidade não muda.

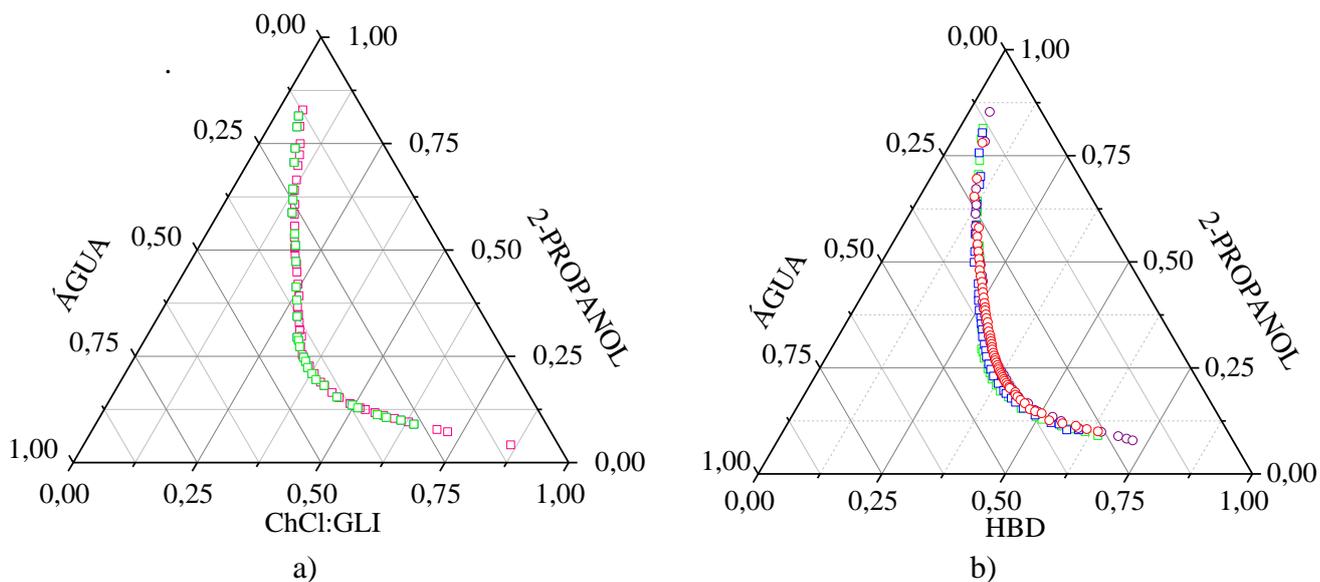


Figura 4.13 - Figura 4.13 – Curvas binodais dos sistemas pseudo-ternários: a) ChCl:GLI + 2-propanol + água a 25°C este estudo (□) e literatura (SILVA, 2019) (□), b) ChCl:GLI + 2-propanol + água a 25°C (□) e 35°C (□), ChCl:SAC + 2-propanol + água a 25°C (○) e 35°C (○).

Na literatura foram encontrados sistemas bifásicos com 2-propanol formados pelos componentes individuais do DES. Na Figura 4.14 estão representadas as curvas binodais dos sistemas glicose + 2-propanol + água, sacarose + 2-propanol + água do estudo de Ebragami e Sadeghi (2018), ChCl + 2-propanol + água do estudo de Zafarani-Moattar, *et al.* (2019), e os dados experimentais deste estudo a uma temperatura de 25°C dos sistemas ChC:GLI + 2-propanol + água, ChCl:SAC + 2-propanol + água.

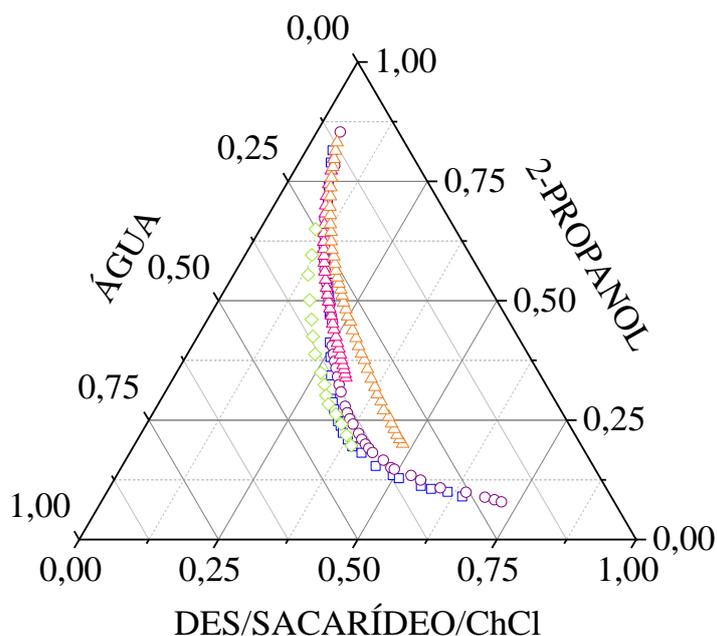


Figura 4.14 – Curvas binodais dos sistemas a 25°C ChCl:GLI + 2-propanol + água (□), ChCl:SAC + 2-propanol + água (○); sacarose + 2-propanol + água (△); glicose + 2-propanol + água (△) e ChCl + 2-propanol + água (◇).

Observa-se que os sistemas formados por DES apresentam um comportamento intermediário entre as curvas binodais dos sistemas formados por ChCl e os sacarídeos, com uma região bifásica maior comparada aos sacarídeos e menor comparada ao ChCl. Todas as curvas têm a mesma origem e adicionalmente os sistemas com DESs podem formar duas fases com propriedades intensivas distintas se comparadas aos sistemas com açúcares. Uma vez que a região de miscibilidade parcial é maior o que pode, por sua vez, favorecer a partição das antocianinas.

O sistema sacarose + 2-propanol + água encontrado na literatura também apresenta uma redução da região bifásica comparada à glicose, o qual coincide com o observado nesse estudo.

4.4.1 – DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO

4.4.1.1 – Por gravimetria

Considerando que o DES conserva a estrutura inicial dentro do sistema bifásico, as linhas de amarração foram calculadas por um balanço de massa em um sistema de equações (3.1-3.4). Os diagramas são apresentados na Figura 4.15.

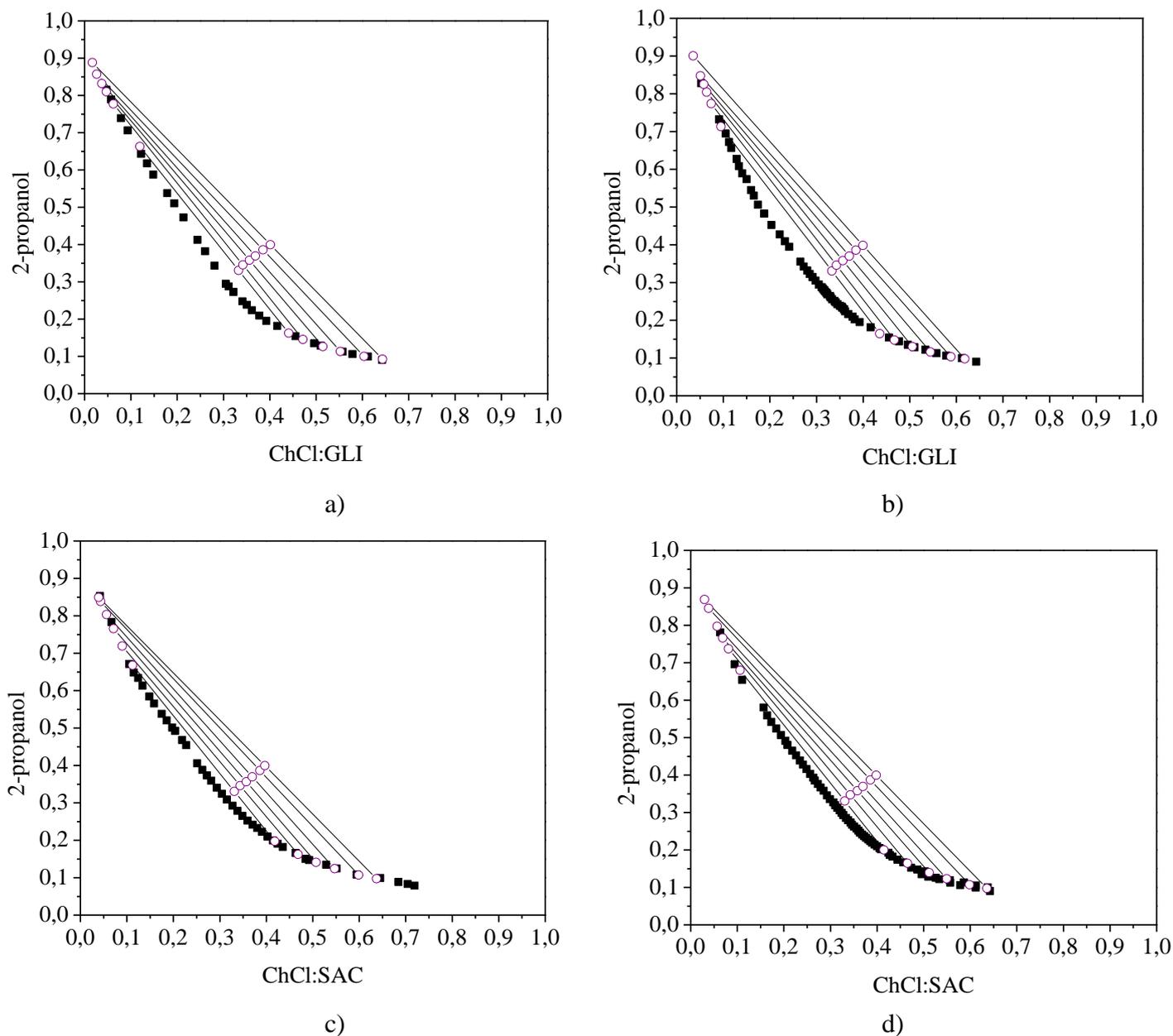


Figura 4.15 – Linhas de amarração calculadas por Merchuck (—○—) de cada um dos sistemas: ChCl:GLI + 2-propanol + água a temperatura de a) 25°C e b) 35°C e ChCl:SAC + 2-propanol + água a temperatura de a) 25°C e b) 35°C.

Nas Tabelas 4.7 e 4.8, são reportados os resultados dos dados experimentais das linhas de amarração. Os valores de ILA em todos os sistemas estão entre -1,54 e -1,38, observando uma tendência crescente nos valores entre as linhas número 1 e 6. A linha 6 do sistema ChCl:GLI + 2-propanol + água a 35°C teve o maior valor de ILA que é -1,38 e é possível também observar que na temperatura de 35°C o valor de ILA nesse sistema aumentou para -1,27. Os valores de CLA em todos os sistemas oscilam entre 0,57 e 1,08 e apresentam uma tendência crescente entre as linhas número 1 e 6. A linha 6 do sistema ChCl:SAC + 2-propanol + água a 25°C tem o maior valor de CLA com 1,08.

Tabela 4.7 – Dados experimentais das linhas de amarração por Merchuck dos sistemas bifásicos a base de ChCl:GLI.

LA	Composição global %(p/p)			ILA	CLA	K ₃	S ₃₁	S ₃₂
	w ₁	w ₂	w ₃					
ChCl:GLI (1) + 2-propanol (2) + água (3), 25°C								
1	33,3	33,1	33,6	-1,56	0,59	1,82	2,03	0,13
2	34,2	34,5	31,3	-1,54	0,75	2,38	3,20	0,08
3	35,6	35,8	28,6	-1,46	0,83	2,51	4,34	0,06
4	36,9	36,9	26,2	-1,39	0,88	2,55	5,78	0,05
5	38,5	38,6	22,9	-1,31	0,95	2,53	9,01	0,05
6	40,1	40,0	19,9	-1,27	1,01	2,79	13,62	0,04
ChCl:GLI (1) + 2-propanol (2) + água (3), 35°C								
1	33,3	33,1	33,6	-1,61	0,65	2,08	2,20	0,11
2	34,3	34,6	31,1	-1,59	0,74	2,54	2,48	0,08
3	35,6	35,8	28,6	-1,53	0,81	2,78	2,82	0,06
4	37,0	37,0	26,0	-1,46	0,86	2,90	3,23	0,05
5	38,5	38,6	23,0	-1,38	0,92	3,03	3,79	0,04
6	40,0	39,8	20,2	-1,38	0,99	4,45	3,91	0,02

Tabela 4.8 – Dados experimentais das linhas de amarração por Merchuck dos sistemas bifásicos a base de ChCl:SAC.

LA	Composição global %(p/p)			ILA	CLA	K ₃	S ₁₃	S ₂₃
	w ₁	w ₂	w ₃					
ChCl:SAC (1) + 2-propanol (2) + água (3), 25°C								
1	33,1	33,1	33,9	-1,54	0,73	1,75	2,13	0,14
2	34,3	34,6	31,1	-1,47	0,83	1,94	2,68	0,08
3	35,7	35,6	28,7	-1,43	0,91	2,15	3,30	0,06
4	37,0	37,0	26,1	-1,38	0,98	2,34	4,12	0,04
5	38,6	38,6	22,7	-1,32	1,04	2,49	5,55	0,02
6	39,7	39,9	20,4	-1,26	1,08	2,38	6,79	0,02
ChCl:SAC (1) + 2-propanol (2) + água (3), 35°C								
1	33,1	33,1	33,9	-1,55	0,57	1,80	2,18	0,16
2	34,3	34,7	31,0	-1,49	0,69	2,04	2,81	0,11
3	35,8	35,8	28,4	-1,41	0,77	2,11	3,54	0,09
4	37,0	36,9	26,1	-1,37	0,84	2,24	4,30	0,07
5	38,6	38,7	22,7	-1,32	0,93	2,54	6,14	0,05
6	39,8	40,0	20,2	-1,27	0,98	2,63	8,13	0,04

Os valores de K_3 indicam a capacidade que o DES tem para extrair moléculas de água de soluções aquosas de 2-propanol, a qual foi maior em todas as linhas no sistema ChCl:GLI+ 2-propanol + água a 35°C com um valor de 4,45. Também, observou-se que os valores de seletividade da água com o DES (S_{31}) são maiores que 1, enquanto a seletividade da água com o 2-propanol (S_{32}) são menores que 1, indicando assim que moléculas polares como a água tem afinidade química maior com os DES e menor com as moléculas de 2-propanol.

É interessante observar esse comportamento para desenvolver sistemas a base de DESs com seletividade alta para moléculas polares como a água, as quais compartilham a mesma natureza química das antocianinas, e uma capacidade alta em excluir componentes menos polares como 2-propanol, sendo eles mais seletivos com os lipídeos.

A metodologia gravimétrica permite realizar o cálculo de vários parâmetros durante a ExLL sem precisar utilizar métodos analíticos para quantificar as frações dos componentes em cada fase. Porém, na literatura existe evidências que o DESs não consegue conservar a razão molar inicial nos sistemas de ELL compostos com água deve-se, portanto, quantificar cada um dos componentes como segue no item 4.4.1.2.

4.4.1.2 – Métodos analíticos:

Para quantificar a glicose, sacarose e 2-propanol em cada uma das fases foram feitas análises HPLC, a água foi quantificada por KF e o ChCl por balanço de massa utilizando 2 linhas de amarração.

A partir da Tabela 4.9 foram calculados a razão molar final do DES após a separação de fases, os quais são reportados na Tabela 4.10 e o coeficiente de distribuição da água (K_4), a seletividade ChCl (1) – água (4) (S_{14}) e a seletividade 2-propanol (3) – água (4) (S_{34}).

Tabela 4.9 – Dados ELL experimentais por método analítico.

LA	Fração Mássica Global			Fração Mássica Fase Superior			Fração Mássica Fase Inferior		
	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃
ChCl (1) + GLI (2) + 2-PROPANOL (3) + ÁGUA (4), T 25°C									
1	0,193	0,099	0,393	0,018	0,023	0,767	0,224	0,182	0,201
2	0,200	0,103	0,406	0,006	0,019	0,817	0,307	0,184	0,139
ChCl (1) + GLI (2) + 2-PROPANOL (3) + ÁGUA (4), T 35°C									
1	0,218	0,112	0,333	0,038	0,025	0,763	0,293	0,151	0,172
2	0,225	0,116	0,346	0,037	0,021	0,788	0,308	0,167	0,150
ChCl (1) + SAC (1) + 2-PROPANOL (3) + ÁGUA (4), T 25°C									
1	0,189	0,186	0,292	0,018	0,031	0,762	0,210	0,236	0,193
2	0,195	0,192	0,304	0,008	0,024	0,802	0,247	0,248	0,160
ChCl (1) + SAC (1) + 2-PROPANOL (3) + ÁGUA (4), T 35°C									
1	0,174	0,178	0,301	0,024	0,043	0,707	0,184	0,223	0,222
2	0,182	0,179	0,312	0,026	0,033	0,755	0,239	0,234	0,168

Tabela 4.10 – Dados da razão molar do DES.

LA	Proporção Molar Inicial		Proporção Molar FS		Desvio ^a	Proporção Molar FI		Desvio ^a	K ₄	S ₁₄	S ₃₄	
	RH	DH	RH	DH		RH	DH					
ChCl (RH) (1) + Glicose (DH) (2) + 2-propanol (3) + água (4), 25°C												
1	2,5	1,0	1,0	1,0	0,11	1,6	1,0	0,12	2,06	5,93	0,13	
2	2,5	1,0	0,4	1,0	0,11	2,2	1,0	0,06	2,35	21,18	0,07	
ChCl (RH) (1) + Glicose (DH) (2) + 2-propanol (3) + água (4), 35°C												
1	2,5	1,0	2,0	1,0	0,73	2,5	1,0	0,04	2,21	3,48	0,10	
2	2,5	1,0	2,3	1,0	0,41	2,4	1,0	0,01	1,08	7,60	0,44	
ChCl (RH) (1) + Sacarose (DH) (2) + 2-propanol (3) + água (4), 25°C												
1	2,5	1,0	1,4	1,0	0,05	2,2	1,0	0,2	1,91	6,25	0,13	
2	2,5	1,0	0,8	1,0	0,2	2,4	1,0	0,1	2,07	15,16	0,10	
ChCl (RH) (1) + Sacarose (DH) (2) + 2-propanol (3) + água (4), 35°C												
1	2,5	1,0	1,4	1,0	0,02	2,3	1,0	0,2	1,63	4,71	0,19	
2	2,5	1,0	0,8	1,0	0,2	2,4	1,0	0,1	1,94	4,74	0,12	

$${}^aD_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M_A)^2}{n}}$$

sendo x_i valor na posição i no conjunto de dados, M_A a média aritmética dos dados e n a quantidade de dados.

Na Figura 4.16 são apresentados os dados do sistema quaternário ELL.

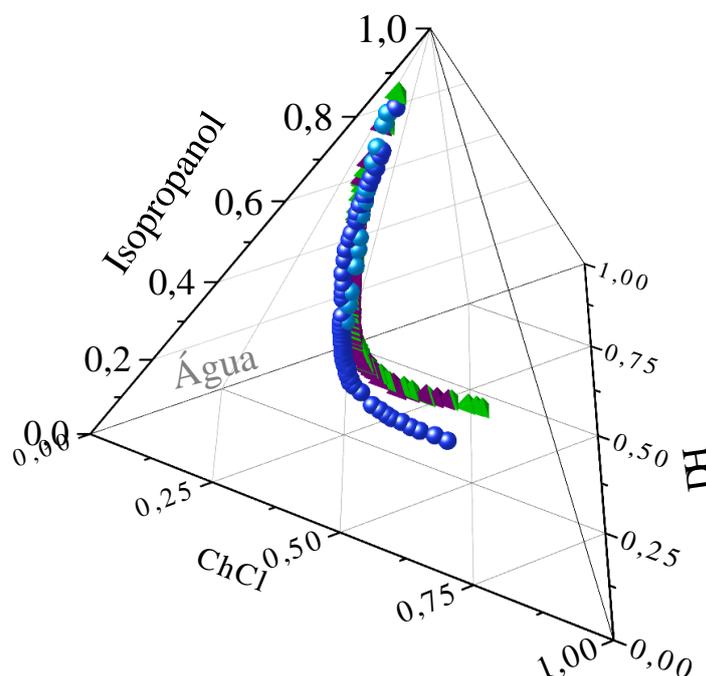


Figura 4.16 – Curvas binodais dos sistemas quaternários: ChCl + GLI + 2-propanol + água a 25°C (●) e 35°C (●), ChCl + SAC + 2-propanol + água a 25°C (◆) e 35°C (◆).

O ChCl é o principal promotor do *salting out* do sistema, como foi discutido anteriormente, por sua habilidade natural em formar compostos hidratados com as moléculas de água pela alta eletronegatividade do anión cloreto com a molécula polar (WENG; TONER, 2018), o que faz com que essas moléculas de água tenham uma maior preferência pela fase inferior. Também é evidente que os HBD (glicose e sacarose) têm a capacidade de realizar o *salting-out* competindo pelas moléculas de água, o qual essa competição entre os compostos na formação de moléculas hidratadas faz com que dentro do sistema a estrutura dos DESs não seja estável. Assim, a partição de cada componente dentro do ELL dependerá unicamente da afinidade química que tenham com os outros componentes do sistema.

A total dissociação da estrutura do DESs a base de açúcares em sistemas de ELL também foi observado no estudo de Farias et al. (2017) com sistemas formados por K_2HPO_4 + DES (Ch:Cl + sacarídeos) + água a 25°C. Nesses sistemas, a fase superior é rica em K_2HPO_4 e a fase inferior é rica em ChCl. Os autores observaram a migração do HBD para fase rica em K_2HPO_4 , a fase de topo. Segundo os autores os sacarídeos (HBD)

por particionar de forma individual dentro do sistema, designaram o papel do HBD como um aditivo dentro do sistema (FARIAS; SOSA; et al., 2017).

Do mesmo modo, em sistemas formados com DES a base de glicose + PPG 400 + água a 25°C estudados por Farias, Passos et al. (2017), os autores evidenciaram a dissociação total da estrutura do DES, em especial quando a razão molar do HBA:HBD (ChCl) era maior, por exemplo, a dissociação era maior na razão de 2:1 de HBA:HBD do que na razão de 1:1 de HBA:HBD. As fase superior, rica em PPG 400, e a fase inferior, rica nos componentes individuais do DES (ChCl + Glicose), mostram, segundo os autores, que o HBD tem maior afinidade com o sal (FARIAS; PASSOS; et al., 2017).

Conclui-se que o sistema DESs (ChCl:glicose ou sacarose) + 2-propanol + água a temperaturas de 25°C e 35°C, são sistemas quaternários com uma fase superior rica em 2-propanol e uma fase rica nos componentes individuais do DES. Contudo, todos os sistemas apresentam alta capacidade de extração de água de soluções aquosas de 2-propanol com valores de $K_4 > 1$, e alta seletividade da molécula de água em relação ao ChCl com valores de $S_{24} > 1$. Independentemente da não conservação da razão molar do DES nos sistemas, tem-se o potencial para a extração de moléculas altamente polares como a água, que é o caso das antocianinas.

4.4.1.3 – Modelagem termodinâmica:

O modelo NRTL foi utilizado para correlacionar os dados experimentais do ELL, na Figura 4.17 e 4.18 são ilustradas as linhas de amarração obtidas experimentalmente com os métodos analíticos (item 3.4.2), juntamente com as linhas calculadas pelo modelo NRTL para os sistemas ChCl + Gli + 2-propanol + água e ChCl + Sac + 2-propanol + água, respectivamente.

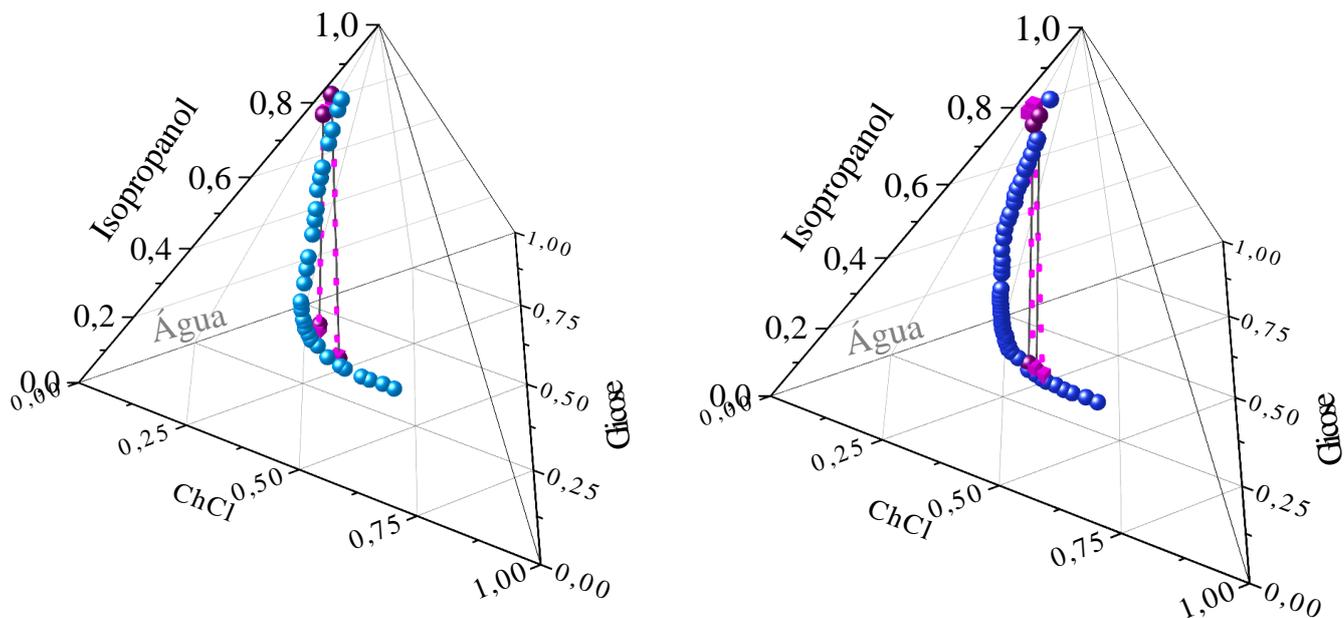


Figura 4.17 – Linhas de amarração do sistema ChCl:Gli + 2-propanol + água a) 25°C e b) 35°C; Exp. (-●-) e NRTL (-■-).

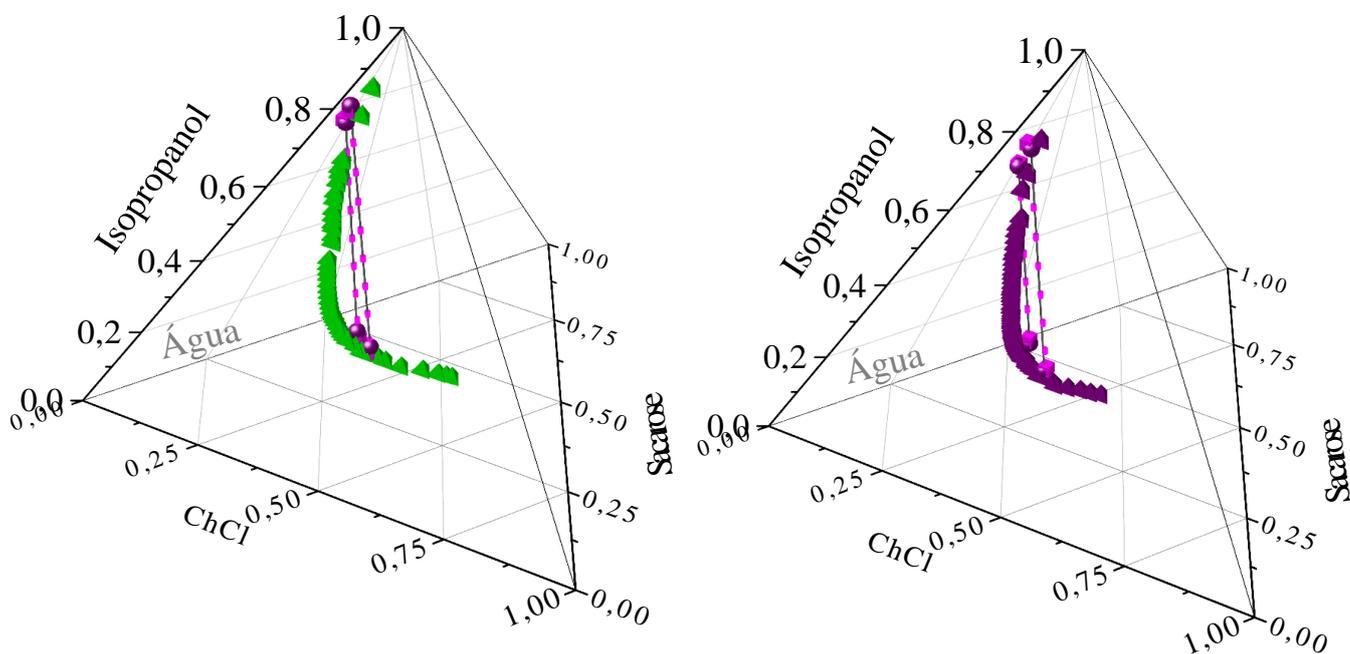


Figura 4.18 – Linhas de amarração do sistema ChCl + Sacarose + 2-propanol + água: a) 25°C e b) 35°C; Exp. (-●-) e NRTL (-■-).

Observou-se que o modelo NRTL tem a capacidade de descrever o comportamento dos sistemas quaternários deste estudo e com um valor de desvio global de 0,438%. Na Tabela 4.11 são reportados os parâmetros do modelo *NRTL*.

Tabela 4.11 – Parâmetros de interação binária dos modelos NRTL para os sistemas estudados.

Componente i	Componente j	A_{ij}	A_{ji}	α_{ij}
Glicose	Isopropanol	2555,1	2068,3	0,24107
Glicose	Água	-621,59	-2134,8	0,25444
Glicose	Cloreto de colina	-287,07	-1536,7	0,20000
Sacarose	Isopropanol	2515,2	3105,1	0,24107
Sacarose	Água	-628,44	187,75	0,25444
Sacarose	Cloreto de colina	214,83	5999,9	0,20000
Isopropanol	Água	-22,55	575,10	0,20000
Isopropanol	Cloreto de colina	939,89	2550,2	0,20871
Água	Cloreto de colina	639,91	-979,9	0,20090

Na Tabela 4.12, são reportados o desvio médio quadrático de cada sistema e o desvio global.

Tabela 4.12 – Desvio médio quadrático de cada sistema

Sistemas	Temperatura (°C)	RMSD (%)
ChCl + Glicose + 2-propanol + água	25	0,219
	35	0,581
ChCl + Sacarose + 2-propanol + água	25	0,498
	35	0,397
Desvio global		0,438

4.4.2 – Caracterização físico-química dos sistemas

A medição de propriedades como pH e densidade das fases dos sistemas estudados é fundamental para analisar a viabilidade do uso de tais sistemas para a partição do extrato das antocianinas. Na Tabela 4.13 consta os valores de pH e densidade medidos em cada fase dos sistemas estudados.

4.13 – Dados de pH e densidade de cada uma das fases dos sistemas a estudados.

Linha	pH		Densidade	
	Fase Superior	Fase inferior	Fase Superior	Fase Inferior
ChCl + Glicose + 2-propanol + água, T 25°C				
1	7,06±0,1	7,14±0,0	0,876±0,01	1,040±0,01
2	7,14±0,1	6,98±0,0	0,873±0,00	1,092±0,00
3	7,12±0,1	7,04±0,0	0,868±0,00	1,109±0,01
4	7,04±0,1	7,03±0,0	0,865±0,00	1,138±0,02
5	7,06±0,0	7,03±0,0	0,841±0,01	1,136±0,01
6	7,14±0,0	7,05±0,0	0,836±0,01	1,142±0,02
ChCl + Glicose + 2-propanol + água, T 35°C				
1	7,09±0,1	7,01±0,0	0,904±0,01	1,078±0,03
2	7,09±0,0	7,07±0,0	0,890±0,01	1,090±0,01
3	7,07±0,1	7,09±0,0	0,868±0,02	1,099±0,02
4	7,00±0,0	7,08±0,0	0,863±0,02	1,142±0,01
5	7,06±0,0	7,10±0,0	0,851±0,02	1,151±0,03
6	7,03±0,1	7,09±0,1	0,836±0,01	1,173±0,01
ChCl + Sacarose + 2-propanol + água, T 25°C				
1	7,15±0,1	6,88±0,0	0,918±0,01	1,087±0,00
2	7,13±0,0	6,98±0,0	0,905±0,00	1,101±0,01
3	7,08±0,0	7,02±0,0	0,883±0,00	1,116±0,00
4	7,07±0,1	7,08±0,0	0,873±0,00	1,123±0,00
5	7,05±0,0	6,97±0,0	0,866±0,00	1,139±0,01
6	7,19±0,0	6,98±0,0	0,861±0,01	1,143±0,00
ChCl + Sacarose + 2-propanol + água, T 35°C				
1	6,92±0,2	7,04±0,1	0,883±0,01	1,089±0,00
2	7,00±0,1	7,03±0,0	0,887±0,01	1,103±0,00
3	7,18±0,0	7,01±0,1	0,877±0,00	1,118±0,01
4	7,04±0,1	6,95±0,1	0,868±0,01	1,132±0,01
5	7,02±0,0	7,10±0,0	0,866±0,00	1,138±0,00
6	7,04±0,0	7,17±0,1	0,868±0,02	1,132±0,02

As fases de todos os sistemas deste estudo têm um pH neutro tanto para a fase superior como a fase inferior, o que significa que as antocianinas podem permanecer em sua forma quinodal aniônica. Geralmente, quando os sistemas são formados por sais amônio quaternário como ChCl apresentam valores altos de pH, como sistemas: ChCl + água + K₂HPO₄ e ChCl + sacarídeos + água + K₂HPO₄ onde reportaram valores de pH entre 10,3 a 11 (FARIAS; SOSA; et al., 2017). A neutralidade do pH do sistema de ELL encontrados neste estudo foi devido à afinidade química que apresentaram os sacarídeos com o sal amônio quaternário para formar a fase inferior do sistema. De forma contrária à literatura com o sistema ChCl + sacarídeo + água + K₂HPO₄ devido que os sacarídeos tiveram uma migração maior afinidade à fase topo com o sal inorgânico. Isso pode indicar

interações entre o ChCl e os sacarídeos como a formação de ligações de hidrogênio, independente à formação estrutural de um DES.

A fase superior apresentou valores de densidade entre 0,904 e 0,836 g/mL. Foi observada a diminuição da densidade nas linhas de amarração com maior conteúdo de 2-propanol na fase superior. Enquanto na fase inferior os valores de densidade determinados estão na faixa entre 1,040 e 1,173 g/mL e foi observado um aumento da densidade nas linhas de amarração com aumento dos valores de CLA, evidenciando a maior composição nos componentes individuais do DESs.

4.5 – EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ExLL) -PARTIÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANTOCIANINAS

Os sistemas bifásicos formado por DES (ChCl:sacarídeos) + 2-propanol + água são adequados para a partição de antocianinas seguindo os critérios descritos na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Avaliação dos critérios de seleção dos sistemas bifásicos para este estudo.

Tipo de molécula objetivo		Antocianina	Carácter polar
Critério	Valor	Observações	Avaliação
Extração de antocianinas de açaí sólido-líquido	Soluções aquosas 2-propanol	Seletivo para extratos de antocianinas e lipídeos	Adequado
pH	Neutro	Estrutura quinodal aniônica das antocianinas	Aceitável
Componente majoritário da fase pobre em DES	2-propanol	Seletivo para outras biomoléculas de carácter hidrofóbico (lipídeos do açaí)	Adequado
Razão molar (RH:DH) do DES	2,5:1 (ChCl:DH)	Aumento da polaridade do sistema pela maior presença de ChCl	Adequado

Uma vez observado o potencial destes sistemas para a partição das antocianinas do extrato hidroalcoólico (água + 2-propanol) nas condições de extração a uma razão água:2-propanol igual a 52:48, razão sólido:líquido de 1:5 e temperatura 50°C, este extrato foi particionado em três linhas de amarração e foram avaliados os coeficientes de

partição de antocianinas totais monoméricas (ATM) e polifenóis totais (PT) conforme demonstrado na Figura 4.19.

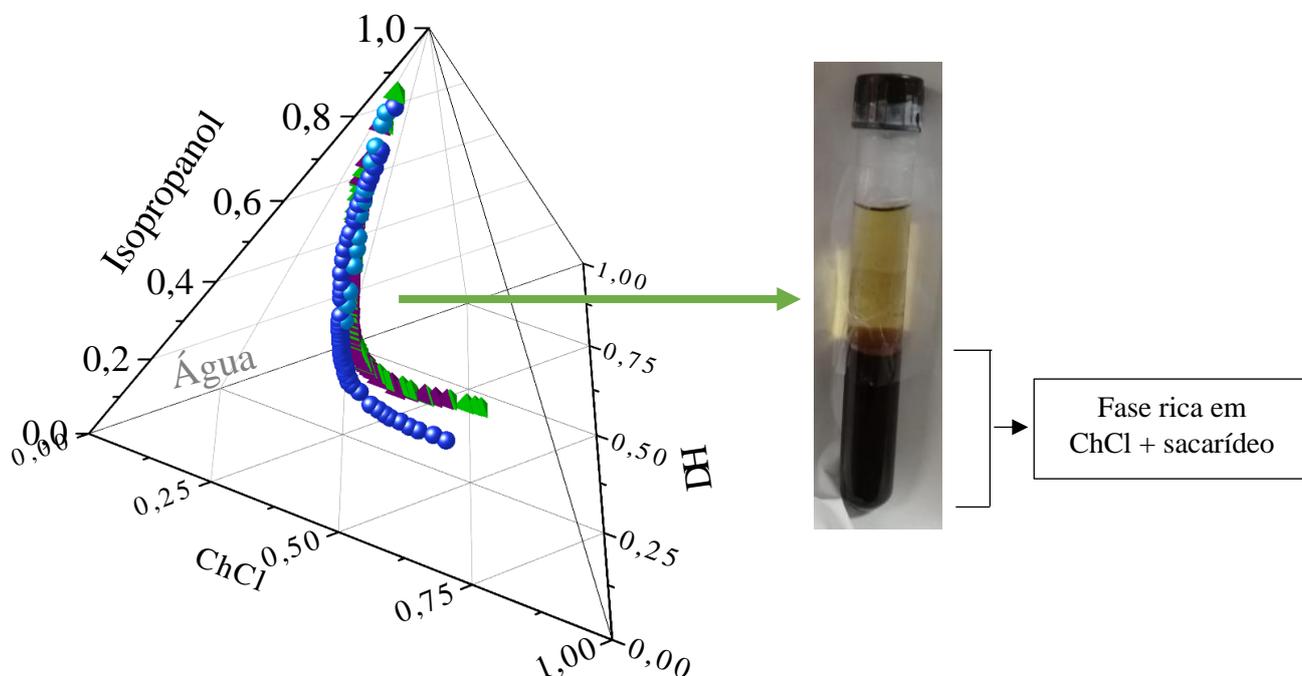


Figura 4.19 – Partição de ATM e PT em sistemas bifásicos.

Na Figura 4.20, observa-se que todos os sistemas têm uma completa separação das ATM na fase inferior rica dos componentes ChCl + GLI e ChCl + SAC com eficiência de extração (EE) de 100%. Nesta avaliação só foi possível quantificar as antocianinas na fase inferior, na fase superior não foram detectadas antocianinas, provavelmente devido aos limites de detecção do espectrofotômetro usado. Em todos os sistemas bifásicos estudados, as antocianinas tiveram maior preferência pela fase inferior confirmando a afinidade dessas moléculas hidrofílicas com os componentes individuais dos DESs. As quantidades de antocianinas determinadas estão no apêndice C Tabela C1.



b)



c)

Figura 4.20 - a) Partição de antocianinas em sistema ChCl + GLI + 2-propanol + água a 25°C. b) Partição de antocianinas em sistemas ChCl + SAC + 2-propanol + água a 25°C.

Nas Figuras 4.21 e 4.22, respectivamente, são apresentados os coeficientes de partição (K^{PT}) e eficiência de extração (EE) dos polifenóis totais de todos os sistemas estudados. Todas informações mais detalhadas são encontradas no apêndice D.

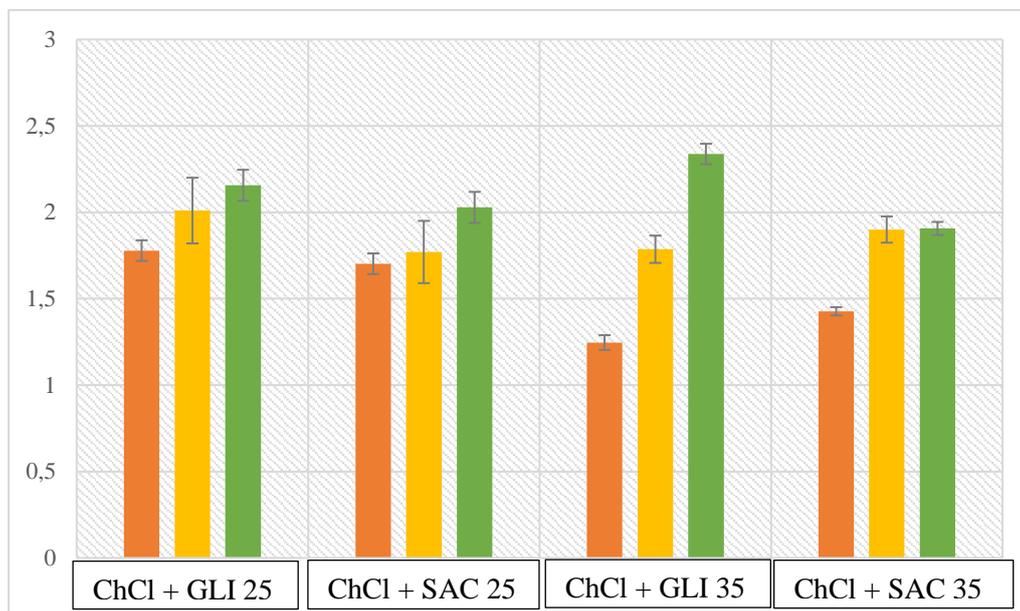


Figura 4.21 – Coeficiente de partição de PT: Linha de amarração 2 (■), Linha de amarração 4 (■), Linha de amarração 6 (■).

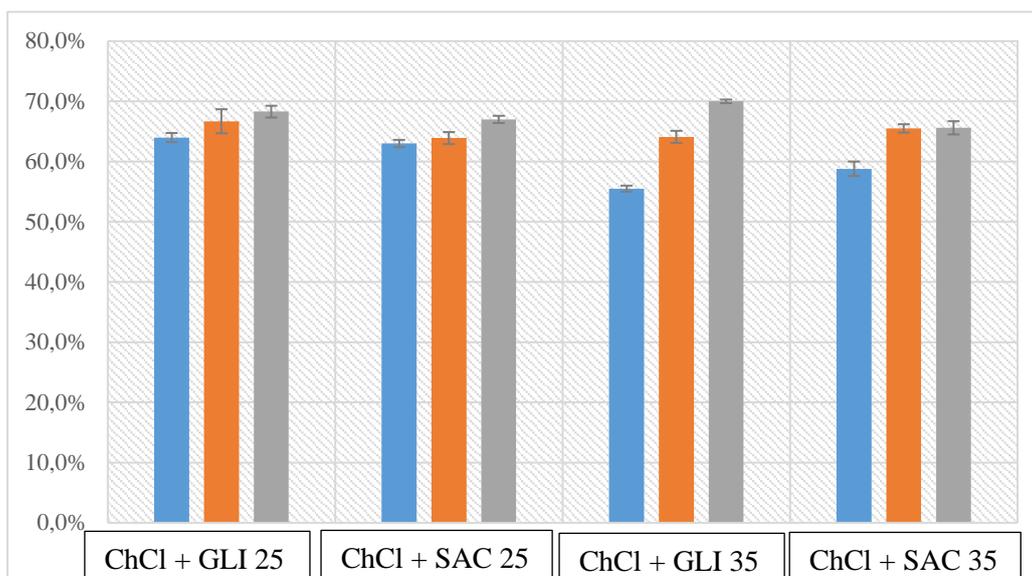


Figura 4.22 – EE de PT: Linha de amarração 2 (■), Linha de amarração 4 (■), Linha de amarração 6 (■).

Na Figura 4.22 foram calculados os valores de K^{PT} , os quais apresentaram valores maiores que 1, indicando a preferência dos PT com os componentes individuais do DES (fase inferior). Os PT são um grupo imenso com diferentes biomoléculas de natureza polar e apolar, o que significa que a maioria dos PT do açaí, como as antocianinas, tem maior afinidade com os componentes da fase inferior. Os valores K^{PT} e EE apresentam tendência de aumentar com os valores de CLA mais altos.

Adicionalmente observou-se que na temperatura de 35°C no sistema de ChCl + GLI + 2-propanol + água foram obtidos valores mais altos de K^{PT} e EE de 2,34 e 70%, respectivamente. O aumento da temperatura para esse sistema melhora a transferência de massa o que permite a migração de uma quantidade maior de PT para a fase inferior. Todavia para o sistema ChCl + SAC + 2-propanol + água às duas temperaturas de estudo apresentaram valores mais baixos de K^{PT} e EE. A sacarose como foi discutido anteriormente tem uma maior capacidade em formar ligações de hidrogênio comparado à glicose, fazendo o dissacarídeo uma molécula que impede a migração dos PT para fase *bottom* do sistema. Essa competição que tem os HBD com as biomoléculas alvo nos sistemas de ELL também foi evidenciado no estudo de Farias; Sosa *et al.* 2017, onde o ácido gálico teve valores de K maiores com sistemas de ELL a base de DES em ausência

do HBD, ou seja, em sistemas utilizando só o sal amônio quaternário, $\text{ChCl} + \text{K}_2\text{HPO}_4 +$ água.

A partir da referência anterior, o uso de HBD dentro do sistema resulta ser inviável pelos baixos rendimentos de extração encontrados no estudo de Farias; Sosa *et al.* 2017. Porém, ainda não existe na literatura estudos de partição com biomoléculas naturais como as antocianinas, as quais não só dependem da afinidade química e as fortes ligações de hidrogênio com o sal, também dependem de uma estabilidade química que é fornecida pelo HBD.

CAPITULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 – CONCLUSÕES

A partição de sistemas bifásicos a base de DES de sacarídeos, glicose e sacarose, 2-propanol e água foram estudados. Observou-se que um dos componentes majoritários do açaí liofilizado são os lipídeos, macromoléculas que tem o potencial de ser particionados também nesses sistemas desenvolvidos. Para obter um extrato rico em uma solução aquosa de 2-propanol foram encontradas as melhores condições dentro do domínio experimental escolhido de razão água:2-propanol (52:48), razão sólido-líquido (1:5) e temperatura 50°C. Foram determinados os dados de equilíbrio dos sistemas quaternários formados por ChCl + GLI + 2-propanol + água e ChCl + SAC + 2-propanol + água às duas temperaturas de estudo (25°C e 35°C). Os dados experimentais foram correlacionados pelo modelo NRTL o qual mostraram que o modelo consegue descrever o comportamento de ambos sistemas ELL com um valor de RMSD global de 0,438%. Tanto como as ANT e PT mostraram uma seletividade alta com os componentes individuais do DES na fase inferior. Os valores maiores de K^{PT} e EE foram obtidos pelo sistema de ChCl + GLI + 2-propanol + água a 35°C. A sacarose como forte HBD interfere na eficiência de extração de ANT e PT.

5.2 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O potencial uso de sistemas bifásicos a base de DES com bioativos de frutos amazônicos é alta. Os sistemas bifásicos permitem projetar a extração de biocompostos alvo como as antocianinas modulando as condições como aumento da hidrofobicidade do sistema com razões de HBA maiores que HBD com sais quaternárias, obtenção de pH com a adição de HBD e baixa afinidade com os componentes contraparte do sistema. Também este estudo permite sugerir avaliar o comportamento dos sistemas com a modulação de pH usando ácidos que permitam obter meios ácidos para melhorar a estabilidade química das antocianinas durante a partição.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A. P. et al. Novel solvent properties of choline chloride / urea mixtures †. n. November 2002, p. 70–71, 2003.

ALCÁZAR-ALAY, S. C. et al. Obtaining anthocyanin-rich extracts from frozen açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp using pressurized liquid extraction. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 48–54, 2017.

ALKHATIB, I. I. I. et al. Perspectives and guidelines on thermodynamic modelling of deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 298, p. 112183, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112183>>.

ALVARENGA, G. L. et al. Extraction of carotenoid-rich palm pressed fiber oil using mixtures of hydrocarbons and short chain alcohols. **Food Research International**, v. 128, n. November 2019, p. 108810, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108810>>.

ASENJO, J. A. et al. Phase separation rates of aqueous two-phase systems: Correlation with system properties. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 217–223, 2002.

ASENJO, Juan A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.051>>.

BORGES, G. D. S. C. et al. Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 708–715, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.025>>.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>>.

CESAR, L. T. et al. Effects of clarification on physicochemical characteristics, antioxidant capacity and quality attributes of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 3293–3300, 2014.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects—A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1580–1604, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>>.

CRESPO, E. A. et al. A methodology to parameterize SAFT-type equations of state for solid precursors of deep eutectic solvents: The example of cholinium chloride. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 21, n. 27, p. 15046–15061, 2019.

CVJETKO BUBALO, M. et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159–166, 2016.

DA SILVA R., I. **Estudo da partição do 2-propanol de solução aquosa utilizando misturas de baixa temperatura de transição a base de cloreto de colina a 25oC**. 2019. 1–60 f. Universidade Federal do Pará, 2019.

DAI, Y. et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50–56, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.037>>.

_____. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>>.

_____. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. **Food Chemistry**, v. 187, p. 14–19, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>>.

EIRO, M. J.; HEINONEN, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7461–7466, 2002.

FALCÃO, L. D. et al. Copigmentação Intra E Intermolecular De Antocianinas: Uma Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 351–366, 2003.

FARIAS, F. O.; PASSOS, H.; et al. Is It Possible to Create Ternary-like Aqueous Biphasic Systems with Deep Eutectic Solvents? **ACS Sustainable Chemistry and**

Engineering, v. 5, n. 10, p. 9402–9411, 2017.

FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; et al. Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars) + K₂HPO₄ + water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 448, p. 143–151, 2017.

FLORINDO, C. et al. Carbohydrates-based deep eutectic solvents: Thermophysical properties and rice straw dissolution. **Journal of Molecular Liquids**, v. 247, p. 441–447, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.09.026>>.

FRANCISCO, M.; VAN DEN BRUINHORST, A.; KROON, M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): Screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. **Green Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 2153–2157, 2012.

FREIRE, M. G. et al. Aqueous biphasic systems: A boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4966–4995, 2012.

GARZÓN, G. A. et al. Polyphenolic composition and antioxidant activity of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) from Colombia. **Food Chemistry**, v. 217, p. 364–372, 2017.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. **Handbook of Food Analytical Chemistry**, v. 2–2, p. 19–31, 2005.

GORDON, A. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, n. 2, p. 256–263, 2012.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>>.

LEITE, J. T. C.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Transições De Fases Em Alimentos: Influência No Processamento E Na Armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 1, p. 83–96, 2005.

LUCAS, B. F.; ZAMBIAZI, R. C.; COSTA, J. A. V. Biocompounds and physical properties of açai pulp dried by different methods. **Lwt**, v. 98, n. August, p. 335–340, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.058>>.

- MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 962–982, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>>.
- MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 285–293, 1998.
- PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199–1205, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.034>>.
- PALA, D. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 618–623, 2018.
- PASSOS, H. et al. Are Aqueous Biphasic Systems Composed of Deep Eutectic Solvents Ternary or Quaternary Systems? **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 5, p. 2881–2886, 2016.
- PAVIA, D. L. et al. Introdução a Espectroscopia. **Introduction to spectroscopy**, p. 708, 2008.
- POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 6076–6082, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.083>>.
- PRAUSNITZ, J. M. .; LICHTENTHALER, R. N. .; DE AZEVEDO, E. G. **Molecular thermodynamics of fluid-phase equilibria**. [S.l.: s.n.], 1998.
- RODRIGUES BATISTA, C. D. C. et al. 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. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 364–369, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.10.006>>.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, n. May 2018, p. 200–205, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>>.

ROGEZ, H. **Açaí: Preparo, Composição e Melhoramento da Conservação**. [S.l: s.n.], 2000.

ROGEZ, H. et al. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 6, p. 796–800, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.03.015>>.

SANDLER, S. **Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics**. [S.l: s.n.], 2017.

SANG, J. et al. Combination of a deep eutectic solvent and macroporous resin for green recovery of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. fruit. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 54, n. 18, p. 3082–3090, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1559190>>.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 2006.

SILVA, H. R. da et al. Obtaining and characterization of anthocyanins from *Euterpe oleracea* (açai) dry extract for nutraceutical and food preparations. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.03.004>>.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014.

SMITH, J. M. .; VAN NESS, H. C. .; ABBOTT, M. M. **Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química**. v. 200, 7ª ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2007.

TROUILLAS, P. et al. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 9, p. 4937–4982, 2016.

VENTURA, S. P. M. et al. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, v. 117,

n. 10, p. 6984–7052, 2017.

WENG, L.; TONER, M. Janus-faced role of water in defining nanostructure of choline chloride/glycerol deep eutectic solvent. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 35, p. 22455–22462, 2018.

WIERCIGROCH, E. et al. Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 185, p. 317–335, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>>.

XU, D. et al. Separation of isopropanol from its aqueous solution with deep eutectic solvents: liquid–liquid equilibrium measurement and thermodynamic modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 3, p. 569–576, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s43153-020-00041-x>>.

YAMAGUCHI, K. K. D. L. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food Chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.055>>.

ZENG, Q. et al. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2565–2573, 2014.

APÉNDICE A

Tabela A1-Dados experimentais da curva binodal em fração mássica (w_i) para sistemas ChCl (1) + Glicose (2) + 2-propanol (3) + água (4), a 25°C e 35°C.

Composição	w1	w2	w3	w4	w1	w2	w3	w4
Temperatura	25°C				35°C			
1	0.0313	0.0162	0.8148	0.1377	0.0313	0.0162	0.8148	0.1377
2	0.0377	0.0194	0.7893	0.1535	0.0377	0.0194	0.7893	0.1535
3	0.0519	0.0268	0.7390	0.1823	0.0519	0.0268	0.7390	0.1823
4	0.0616	0.0318	0.7058	0.2007	0.0616	0.0318	0.7058	0.2007
5	0.0805	0.0415	0.6431	0.2349	0.0805	0.0415	0.6431	0.2349
6	0.0889	0.0459	0.6176	0.2476	0.0889	0.0459	0.6176	0.2476
7	0.0978	0.0505	0.5874	0.2643	0.0978	0.0505	0.5874	0.2643
8	0.1176	0.0607	0.5376	0.2841	0.1176	0.0607	0.5376	0.2841
9	0.1276	0.0659	0.5104	0.2961	0.1276	0.0659	0.5104	0.2961
10	0.1408	0.0727	0.4725	0.3140	0.1408	0.0727	0.4725	0.3140
11	0.1609	0.0830	0.4127	0.3434	0.1609	0.0830	0.4127	0.3434
12	0.1717	0.0886	0.3819	0.3578	0.1717	0.0886	0.3819	0.3578
13	0.1851	0.0955	0.3434	0.3760	0.1851	0.0955	0.3434	0.3760
14	0.2012	0.1038	0.2945	0.4005	0.2012	0.1038	0.2945	0.4005
15	0.2054	0.1060	0.2874	0.4013	0.2054	0.1060	0.2874	0.4013
16	0.2120	0.1094	0.2725	0.4061	0.2120	0.1094	0.2725	0.4061
17	0.2250	0.1161	0.2476	0.4113	0.2250	0.1161	0.2476	0.4113
18	0.2311	0.1193	0.2380	0.4116	0.2311	0.1193	0.2380	0.4116
19	0.2385	0.1231	0.2234	0.4151	0.2385	0.1231	0.2234	0.4151
20	0.2491	0.1286	0.2092	0.4131	0.2491	0.1286	0.2092	0.4131
21	0.2590	0.1337	0.1949	0.4124	0.2590	0.1337	0.1949	0.4124
22	0.2745	0.1417	0.1814	0.4025	0.2745	0.1417	0.1814	0.4025
23	0.3004	0.1551	0.1539	0.3907	0.3004	0.1551	0.1539	0.3907
24	0.3270	0.1688	0.1348	0.3694	0.3270	0.1688	0.1348	0.3694
25	0.3364	0.1736	0.1283	0.3617	0.3364	0.1736	0.1283	0.3617
26	0.3677	0.1898	0.1123	0.3302	0.3677	0.1898	0.1123	0.3302
27	0.3817	0.1970	0.1061	0.3151	0.3817	0.1970	0.1061	0.3151
28	0.4035	0.2083	0.0997	0.2886	0.4035	0.2083	0.0997	0.2886
29	0.4239	0.2188	0.0901	0.2672	0.4239	0.2188	0.0901	0.2672

^aAs incertezas padrões u são $u(w)=0,0001\text{g}$, $u(T)=0,1^\circ\text{C}$

Tabela A2-Dados experimentais da curva binodal em fração mássica (w_i) para sistemas ChCl (1) + Sacarose (2) + 2-propanol (3) + água (4), a 25°C e 35°C.

Composição	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄	w ₁	w ₂	w ₃	w ₄
Temperatura	25°C				35°C			
1	0.0212	0.0208	0.8532	0.1048	0.0320	0.0314	0.7807	0.1559
2	0.0339	0.0333	0.7832	0.1496	0.0478	0.0469	0.6956	0.2098
3	0.0532	0.0522	0.6713	0.2232	0.0558	0.0548	0.6540	0.2355
4	0.0580	0.0569	0.6481	0.2371	0.0791	0.0775	0.5803	0.2631
5	0.0628	0.0616	0.6339	0.2417	0.0829	0.0813	0.5593	0.2766
6	0.0675	0.0662	0.6129	0.2535	0.0875	0.0859	0.5415	0.2851
7	0.0750	0.0735	0.5839	0.2676	0.0929	0.0911	0.5239	0.2922
8	0.0800	0.0785	0.5657	0.2759	0.0979	0.0961	0.5067	0.2994
9	0.0884	0.0867	0.5375	0.2875	0.1027	0.1007	0.4914	0.3052
10	0.0938	0.0920	0.5204	0.2938	0.1050	0.1030	0.4805	0.3115
11	0.0997	0.0978	0.5013	0.3012	0.1100	0.1079	0.4653	0.3169
12	0.1029	0.1010	0.4926	0.3035	0.1143	0.1121	0.4523	0.3212
13	0.1104	0.1083	0.4679	0.3133	0.1183	0.1160	0.4389	0.3268
14	0.1150	0.1127	0.4543	0.3180	0.1216	0.1193	0.4278	0.3312
15	0.1269	0.1245	0.4055	0.3431	0.1255	0.1231	0.4159	0.3355
16	0.1324	0.1299	0.3883	0.3495	0.1295	0.1270	0.4026	0.3409
17	0.1374	0.1348	0.3731	0.3547	0.1329	0.1303	0.3926	0.3441
18	0.1422	0.1395	0.3589	0.3595	0.1346	0.1320	0.3854	0.3480
19	0.1481	0.1453	0.3407	0.3659	0.1379	0.1353	0.3760	0.3508
20	0.1538	0.1508	0.3242	0.3712	0.1407	0.1380	0.3669	0.3544
21	0.1592	0.1562	0.3090	0.3756	0.1442	0.1414	0.3578	0.3566
22	0.1652	0.1620	0.2926	0.3803	0.1477	0.1449	0.3453	0.3621
23	0.1707	0.1673	0.2788	0.3832	0.1508	0.1479	0.3357	0.3656
24	0.1761	0.1727	0.2652	0.3860	0.1547	0.1517	0.3266	0.3671
25	0.1816	0.1781	0.2527	0.3877	0.1567	0.1537	0.3194	0.3702
26	0.1872	0.1836	0.2417	0.3876	0.1590	0.1559	0.3128	0.3723
27	0.1920	0.1883	0.2328	0.3869	0.1613	0.1582	0.3062	0.3743
28	0.1973	0.1935	0.2222	0.3871	0.1636	0.1605	0.2989	0.3770
29	0.2033	0.1993	0.2098	0.3876	0.1653	0.1621	0.2931	0.3794
30	0.2091	0.2051	0.1995	0.3863	0.1683	0.1651	0.2853	0.3813
31	0.2143	0.2101	0.1910	0.3846	0.1707	0.1674	0.2791	0.3828
32	0.2200	0.2157	0.1820	0.3823	0.1733	0.1699	0.2732	0.3836
33	0.2338	0.2292	0.1662	0.3709	0.1749	0.1715	0.2674	0.3862
34	0.2447	0.2399	0.1505	0.3649	0.1771	0.1737	0.2621	0.3871
35	0.2486	0.2438	0.1471	0.3605	0.1797	0.1762	0.2566	0.3875
36	0.2669	0.2618	0.1342	0.3371	0.1819	0.1784	0.2513	0.3884
37	0.2782	0.2728	0.1244	0.3246	0.1837	0.1801	0.2461	0.3901
38	0.3001	0.2943	0.1080	0.2976	0.1859	0.1823	0.2412	0.3906
39	0.3257	0.3194	0.0989	0.2560	0.1881	0.1845	0.2366	0.3907
40	0.3454	0.3388	0.0886	0.2272	0.1900	0.1864	0.2324	0.3912

41	0.3555	0.3486	0.0831	0.2128	0.1925	0.1887	0.2278	0.3910
42	0.3629	0.3559	0.0789	0.2024	0.1946	0.1909	0.2233	0.3912
					0.1966	0.1928	0.2189	0.3917
					0.1994	0.1955	0.2142	0.3909
					0.2019	0.1980	0.2097	0.3903
					0.2047	0.2007	0.2051	0.3895
					0.2063	0.2023	0.2017	0.3898
					0.2143	0.2102	0.1924	0.3831
					0.2158	0.2117	0.1863	0.3862
					0.2189	0.2146	0.1820	0.3845
					0.2241	0.2198	0.1740	0.3821
					0.2304	0.2259	0.1666	0.3771
					0.2391	0.2344	0.1525	0.3740
					0.2457	0.2409	0.1475	0.3659
					0.2537	0.2488	0.1425	0.3549
					0.2656	0.2605	0.1259	0.3480
					0.2808	0.2754	0.1192	0.3246
					0.2961	0.2904	0.1130	0.3006
					0.3092	0.3033	0.1052	0.2823
					0.3220	0.3158	0.1001	0.2621

^aAs incertezas padrões u são $u(w)=0,0001\text{g}$, $u(T)=0,1^\circ\text{C}$

APENDICE B

Tabela B1 – Dados experimentais das linhas de amarração por gravimetria (sistema pseudo-ternário)

LA	Fração Mássica Global			Fração Mássica Fase Superior			Fração Mássica Fase Inferior		
	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃
DES (ChCl:GLI) (1) + 2-PROPANOL (2) + ÁGUA (3), T 25									
1	0.333	0.331	0.336	0.119	0.663	0.218	0.441	0.162	0.396
2	0.342	0.345	0.313	0.062	0.777	0.161	0.471	0.146	0.383
3	0.356	0.358	0.286	0.047	0.810	0.143	0.515	0.126	0.359
4	0.369	0.369	0.262	0.037	0.832	0.131	0.552	0.113	0.334
5	0.385	0.386	0.229	0.026	0.857	0.117	0.604	0.100	0.296
6	0.401	0.400	0.199	0.017	0.888	0.095	0.643	0.092	0.264
DES (ChCl:GLI) (1) + 2-PROPANOL (2) + ÁGUA (3), T 35									
1	0.333	0.331	0.336	0.095	0.713	0.192	0.436	0.165	0.400
2	0.343	0.346	0.311	0.074	0.774	0.152	0.467	0.148	0.385
3	0.356	0.358	0.286	0.065	0.804	0.131	0.506	0.130	0.364
4	0.370	0.370	0.260	0.058	0.825	0.117	0.544	0.116	0.340
5	0.385	0.386	0.230	0.051	0.847	0.101	0.589	0.104	0.308
6	0.400	0.398	0.202	0.036	0.901	0.064	0.618	0.098	0.284
DES (ChCl:SAC) (1) + 2-PROPANOL (2) + ÁGUA (3), T 25									
1	0.331	0.331	0.338	0.112	0.668	0.220	0.418	0.197	0.385
2	0.343	0.346	0.311	0.090	0.719	0.191	0.468	0.162	0.370
3	0.357	0.356	0.287	0.071	0.765	0.163	0.507	0.141	0.352
4	0.370	0.370	0.261	0.057	0.803	0.140	0.547	0.124	0.329
5	0.386	0.386	0.227	0.043	0.838	0.118	0.599	0.107	0.294
6	0.397	0.399	0.204	0.039	0.849	0.111	0.637	0.097	0.266
DES (ChCl:SAC) (1) + 2-PROPANOL (2) + ÁGUA (3), T 35									
1	0.331	0.331	0.339	0.106	0.680	0.214	0.415	0.200	0.385
2	0.343	0.347	0.310	0.081	0.737	0.182	0.465	0.164	0.370
3	0.358	0.358	0.284	0.069	0.766	0.165	0.512	0.139	0.349
4	0.370	0.369	0.261	0.057	0.797	0.146	0.550	0.123	0.327
5	0.386	0.387	0.227	0.038	0.845	0.116	0.598	0.107	0.295
6	0.398	0.400	0.202	0.030	0.869	0.101	0.636	0.097	0.267

APENDICE C

Tabela C1 – Dados experimentais de %w^{ANT} em cada fase

LA	Temperatura	%w ^{ATM}	
		Fase Superior	Fase Inferior
ChCl + GLI + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	0.0000	0.0443
2		0.0000	0.0225
3		0.0000	0.0262
1	35°C	0.0000	0.0489
2		0.0000	0.0273
3		0.0000	0.0520
ChCl + SAC + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	0.0000	0.0471
2		0.0000	0.0211
3		0.0000	0.0417
1	35°C	0.0000	0.0603
2		0.0000	0.0253
3		0.0000	0.0524

Tabela C2 – Dados experimentais de %w^{PT} em cada fase

LA	Temperatura	%w ^{PT}	
		Fase Superior	Fase Inferior
ChCl + GLI + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	0.0398	0.0707
2		0.0352	0.0703
3		0.0336	0.0723
1	35°C	0.0512	0.0638
2		0.0416	0.0743
3		0.0332	0.0776
ChCl + SAC + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	0.0494	0.0840
2		0.0397	0.0702
3		0.0392	0.0794
1	35°C	0.0603	0.0860
2		0.0447	0.0849
3		0.0438	0.0835

APENDICE D

Tabela D1 – Valores de K^{PT} dos sistemas estudados

LA	Temperatura	K^{PT}	Desvio*
ChCl + GLI + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	1.78	0.06
2		2.01	0.19
3		2.16	0.09
1	35°C	1.25	0.04
2		1.79	0.08
3		2.34	0.06
ChCl + SAC + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	1.70	0.06
2		1.77	0.18
3		2.03	0.09
1	35°C	1.43	0.02
2		1.90	0.08
3		1.91	0.04

$$*D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M_A)^2}{n}}$$

Tabela D2 – Valores de %EE^{PT} dos sistemas estudados

LA	Temperatura	%EE	Desvio*
ChCl + GLI + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	64.0%	0.01
2		66.7%	0.02
3		68.3%	0.01
1	35°C	55.5%	0.01
2		64.1%	0.01
3		70.0%	0.00
ChCl + SAC + 2-PROPANOL + ÁGUA			
1	25°C	63.0%	0.01
2		63.9%	0.01
3		67.0%	0.01
1	35°C	58.8%	0.01
2		65.5%	0.01
3		65.6%	0.01

$$*D_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M_A)^2}{n}}$$

APENDICE E

FIGURA E1 – Cromatogramas para a análise de HPLC

