



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

ELAINE KARINA ARAUJO DE SOUZA

PARTIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG 1500 E SAL

BELÉM-PARÁ

2017

ELAINE KARINA ARAUJO DE SOUZA

PARTIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG 1500 E SAL

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

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

Coorientadora: Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto

BELÉM - PA

2017

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

SOUZA, ELAINE KARINA ARAUJO DE
PARTIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)
UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COMPOSTOS POR PEG 1500 E SAL / ELAINE
KARINA ARAUJO DE SOUZA. — 2017
66 f. : il. Color

Dissertação (Mestrado) - , , Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
Orientação: Profa. Dra. GEORMENNY ROCHA DOS SANTOS
Coorientação: Profa. Dra. RAFAELLA DE ANDRADE MATTIETTO.

1. Camu-camu. 2. antocianinas. 4. partição por sistemas aquosos bifásicos. I. SANTOS, GEORMENNY
ROCHA DOS , *orient.* II. Título

CDD 664.022

ELAINE KARINA ARAUJO DE SOUZA

**ESTUDO DA PARTIÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE CAMU-CAMU
(*Myrciaria dubia*) UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTOS POR PEG 1500 E SAL**

Data da Avaliação: ____/____/____

Nota/ Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Geormenny Rocha dos Santos
(PPGCTA/ITEC/UFPA - Orientadora)

Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto
(Embrapa Amazônia Oriental - Coorientadora)

Profa. Dra Nadia Cristina Fernandes Correa (PPGCTA/ITEC/UFPA)

Membro Interno

Dra. Julieta Silveira Netta (Embrapa Amazônia Oriental)

Membro externo

Prof. Dr Raul Nunes de carvalho Junior (PPGCTA/ITEC/UFPA)

Membro Interno (suplente)

Prof. Dr. Luiz Ferreira de França (PPGCTA/ITEC/UFPA)

Membro externo (Suplente)

Aos meus amados pais, José Augusto e Maria de
Fátima, pelo carinho, apoio, incentivo e amor
incondicional em todos os momentos da minha
vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concedido forças nos momentos de fraqueza e sabedoria para superar as dificuldades enfrentadas.

Aos meus amados pais, José e Maria de Fátima, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Fábio e Thiago pelo companheirismo e apoio e aos meus sobrinhos amados Robson e Raíssa, um presente de Deus em minha vida, titia ama vocês. Ao meu amor e amigo Iago, pela compreensão, incentivo e amor. A todos meus tios (“in memória” Antônio e Raimundo) tias (Tereza, M^a José e Terezinha), a todos os meus primos e primas.

À Prof.^a Dr.^a Geormenny Santos Rocha, pela orientação, pelo apoio e por ter confiado a mim este trabalho. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria, incentivo em diversos momentos. Muito obrigada por todo o aprendizado que eu obtive.

À Dr.^a Rafaella de Andrade Mattietto, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental e coordenadora deste trabalho, pela orientação, pela atenção e por todos os momentos de aprendizados que obtive. Muito obrigada mesmo Dra.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Nadia Correa, Dra. Julieta da Silveira Neta e Prof. Dr. Luiz França, pelas importantes contribuições apresentadas.

À Dr.^a Walnice Maria Oliveira do Nascimento, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, pela concessão do camu-camu utilizado nesta pesquisa.

À todos os professores e amigos dos Laboratórios de Alimentos que de alguma forma contribuíram para este trabalho LAOS, LAPOA, LABEX, BIOQUÍMICA, LAMEF, LACTEA e LABIOTEC. Aos amigos do LEF Paulinho, Alessandra, Welyson, João Paulo, Ramon pela companhia, apoio e companheirismo. Aos amigos do PPGCTA Talita, July, Adriano, Rebeca, Gilson, Marcos, Mayara, Jacque, Helber, Arley, Clésia, Renan, Adriano Trícia, Priscila, Lorena, José, Saulo, Rômulo e Thaíse pelos valiosos momentos de estudo e descontração.

Aos amigos de sempre e para sempre Carla, Jacque, Gy, Drica e Carol. Muito obrigada por tudo, amo vocês! Aos amigos Sérgio e Bianca, pela verdadeira amizade vocês são muito importante pra mim, obrigada por tudo amo vocês.

Aos meus amigos amados Norma, Cássia, Sumaya, Carlos, Bruno, Alciléa e Paulo César.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A região Amazônica é rica em espécies vegetais, dentre estas espécies inclui-se o camu-camu (*Myrciaria dubia*), cujos frutos apresentam grande potencial de exploração. É de grande interesse industrial e acadêmico que a extração de compostos antioxidantes, tais como as antocianinas, compostos fenólicos totais, vitamina C da casca do camu-camu, seja realizada uma vez que estes frutos apresentam teores significativos destes compostos. Um dos métodos de extração compatível com a partição de biomoléculas denominado extração utilizando sistemas aquosos bifásicos está inserido entre os métodos de extração e partição destes compostos. O objetivo deste trabalho foi realizar extração e partição de antocianinas presentes na casca do camu-camu via sistema aquoso bifásico, a partir de sistemas compostos por polietileno glicol PEG 1500+Na₂SO₄+água, nas temperaturas de 25 e 45 °C. As curvas binodais dos sistemas, não sofreram influencia da temperatura no tamanho da região de miscibilidade parcial. A partição das antocianinas ocorreu em todas as linhas de amarração utilizadas, e estas se concentraram nas partes superiores dos sistemas, região rica PEG 1500. Com a diminuição do comprimento das linhas de amarração e o aumento da inclinação das mesmas ocorreu um aumento da concentração de antocianinas em todas as fases superiores nas linhas de amarração utilizadas. Foi observado também que entre os ensaios houve uma maior concentração de antocianinas na fase superior, no ensaio correspondente ao pH 4,5, temperatura de 25 °C e tempo de partição de 240 minutos, sendo a concentração de antocianinas 57,25 mg/100g a mais elevada. Após a determinação do ponto de maior concentração de antocianinas na fase superior, foi observado que a vitamina C particiona para fase inferior o que enfatiza o grau de purificação das antocianinas presentes na fase superior, proposta neste trabalho.

Palavras-chave: Camu-camu, antocianinas, sistemas aquosos bifásicos.

ABSTRACT

The Amazon region is rich in plant species among them is included the Camu-camu (*Myrciaria dubia*), whose fruits have great potential for exploitation. Camu-camu has a great industrial and academic potential for the extraction of antioxidant compounds such as: anthocyanins, total phenolic compounds and vitamin C, these substances can be extracted from the peel once this fruit presents viable extraction levels of these biocomposites. One of the extractive methods which are compatible with the partition of biomolecules is defined as extraction using aqueous biphasic systems, which is inserted between the methods of extraction and partition of compounds. In this work were performed the extraction and partitioning of anthocyanins present in camu-camu peel via aqueous biphasic system, from systems composed by polyethylene glycol PEG 1500 + Na₂SO₄ + water, at temperatures of 25 and 45 °C. It was observed from the construction of the binodal curves of these systems that it is practically not influenced by the temperature in the partial miscibility region. The partition of the anthocyanins occurred in all tie-lines and these were concentrated in the upper parts of the systems, rich region PEG 1500. With a reduction in the length and increase in the inclination of the tie-lines, was observed an increase in the concentration of anthocyanins in all the upper phases of the tie-lines used. It was also observed between the tests that there was a higher concentration of anthocyanins in the upper phase. During the test corresponding to the pH of 4.5, temperature of 25 ° C and partition time of 240 minutes the concentration of anthocyanins was the highest observed of 57.25 mg/100 g. After defining the point of highest concentration of anthocyanins in the upper phase, this study observed that the concentration of vitamin C in the lower phase indicates the degree of purification of the anthocyanins presents in the upper phase, as proposed in this study.

Keywords: Camu-camu, anthocyanins, two-phase aqueous systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Frutos do camu-camu	17
Figura 02. Estrutura básica do pigmento antocianidina, das principais antocianidinas encontradas em vegetais.....	19
Figura 03. Gama de cores visíveis de antocianidinas.....	20
Figura 04. Mudança de coloração de antocianinas em diferentes pH.....	21
Figura 05. Estrutura do pigmento antocianina (cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo) majoritárias no camu-camu.....	22
Figura 06. Estrutura química da vitamina C	22
Figura 07. Esquema do SAB, composto por duas fases parcialmente imiscíveis.....	23
Figura 08. Esquema representativo de um diagrama de fases retangulares, para um sab	24
Figura 09. Curvas binodais do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 °C (●) e 45 °C (●).....	40
Figura 10. Curva de calibração do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 °C (a) e a 45°C (b).....	42
Figura 11. <i>Tie-lines</i> do diagrama de fases do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45°C.....	46
Figura 12. Gráficos de Othmer & Tobias e Hand para os sistemas compostos por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.....	47
Figura 13. Efeito das linhas de amarração na partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu.....	49
Figura 14. Efeito do comportamento das antocianinas da casca do camu-camu nas diferentes linhas de amarração.....	50
Figura 15. Efeito do tempo na linha de amarração 1 (LE 1) na concentração de antocianinas na fase superior e na partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu.....	50
Figura 16. Influência de temperatura, pH e tempo na concentração de antocianinas na fase superior extraídas da casca do camu-camu via SAB.....	53
Figura 17. Influência de temperatura, pH e tempo no coeficiente de partição (K) das antocianinas da casca do camu-camu via SAB.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Composição físico-química de cascas de camu-camu, segundo diferentes autores.....	17
Tabela 02. Exemplos de empregos e componentes utilizados na formação do SAB em distintas aplicações.....	27
Tabela 03. Ensaio das partições das antocianinas da casca do camu-camu via SAB.....	35
Tabela 04. Composição centesimal da casca do camu-camu.....	34
Tabela 05. Parâmetros A, B, C e D e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos para as equações das curvas binodais dos sistemas PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C	41
Tabela 06. Dados das curvas de calibração dos sistemas compostos por PEG 1500 (1) + sulfato de sódio (2) + água (3) a 25 e 45 °C	43
Tabela 07. Dados de equilíbrio líquido-líquido do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água e condutividade ($\mu\text{c}/\text{cm}$) das Tie-lines, nas temperaturas de a 25 e 45 °C	45
Tabela 08. Parâmetros e coeficientes de determinação das equações de Othmer & Tobias e Hand para os sistemas composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.....	46
Tabela 09. Inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.....	48
Tabela 10. Comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.....	48
Tabela 11. Quantificação das antocianinas na FS e coeficiente de partição K dos ensaios das partições das antocianinas da casca do camu-camu via SAB.....	51
Tabela 12. Quantificação de vitamina C na FS, FI e coeficiente de partição LE 2, da casca do camu-camu via SAB.....	55
Tabela 13. Quantificação de Compostos fenólicos totais na LE 2, na partição casca do camu-camu via SAB.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVEATURAS

SAB	Sistemas Aquosos Bifásicos
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
SAB's	Sistemas Aquosos Bifásicos
PEG	Polietileno Glicol
FS	Fase Superior
FI	Fase Inferior
CLA	Comprimento da Linha de Amarração
Cps	Concentração do Polímero na fase superior
Cpi	Concentração do Polímero na fase inferior
ILA	Inclinação da Linha de amarração
Cs	Concentração Superior
Ci	Concentração Inferior
K	Coefficiente de Partição
FDA	Food and Drug Administration
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LE 1	Linha de Estudo 1
LE 2	Linha de Estudo 2

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
1.1OBJETIVOS.....	15
1.1.2 Objetivo geral	15
1.1.3 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 CAMU-CAMU (<i>Myrciaria dubia</i>).....	16
2.1.1 Compostos bioativos	18
2.2 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)	23
2.2.1 Constituintes das fases - Polietilenoglicol (PEG) e sal (Na₂SO₄)	25
3.3 PARTIÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAL.....	29
4.2.1 Matéria-prima	29
4.1.2 Composição centesimal	29
4.1.3 Reagentes e equipamentos	30
4.2 MÉTODOS.....	30
4.2.1 Determinação de dados de equilíbrio (sistemas em branco)	31
4.2.1.1 Preparo das soluções estoque.....	31
4.2.1.2 Curva Binodal.....	31
4.2.1.3 Curva de Calibração	32
4.2.1.4 Linhas de amarração- Tie lines.....	32
4.2.2 Estudo da partição do extrato aquoso de camu-camu	33
4.2.2.1 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu nos sistemas, em relação ao tempo.....	34
4.2.2.2 Avaliação dos efeitos tempo, pH e temperatura sobre a partição das antocianinas presentes na casca de camu-camu.....	35
4.2.3 Partição	36
4.2.3.1 Antocianinas totais.....	36
4.2.3.2 Quantificação de Vitamina C.....	37
4.2.3.3 Compostos fenólicos totais.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS CASCAS DO CAMU-CAMU	39
5.1 CURVA BINODAL.....	39
5.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	41
5.3 LINHAS DE AMARRAÇÃO (<i>TIE-LINES</i>)	44
5.4 ESTUDO DA PARTIÇÃO DAS ANTOCIANINAS DA CASCA DE CAMU-CAMU.....	48
5.4.1 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu em relação às linhas de amarração	49

5.4.2 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu nos sistemas em relação ao tempo.....	50
5.4.3 Avaliação dos efeitos tempo, pH e temperatura sobre a partição das antocianinas presentes na casca de camu-camu.....	51
5.4.3.1 Quantificação de Vitamina C	55
5.4.3.2 Compostos fenólicos totais	55
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A região Amazônica apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, proporcionando uma grande multiplicidade frutífera, algumas destas variedades, oferecem em sua composição pigmentos naturais, e estes, por sua vez um potencial de industrialização. Dentre as diversidades vegetais nativas da região, inclui-se o camu-camu (*Myrciaria dubia*) (YUYAMA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004).

Os frutos de camu-camu, quando imaturos, apresentam coloração verde e durante o processo de amadurecimento ocorre a modificação de coloração, do verde variando do vermelho ao roxo, colorações estas, devido à presença de antocianinas. Por ser um fruto decíduo, as antocianinas estão concentradas no pericarpo, podendo gerar produtos com tonalidades muito atraentes, sendo este um dos fatores de incentivo para o desenvolvimento agroindustrial do camu-camu (ZANATTA et al., 2005; PINEDO, 2007; MYODA et al., 2010).

De acordo com Neves et al. (2015), foram observadas maiores concentrações de antocianinas nas cascas de camu-camu quando os frutos estavam completamente maduros, logo os autores relatam que esse tecido apresenta potencial para ser usado para a extração de tal composto.

Os corantes alimentares artificiais são utilizados na indústria alimentícia, para alterar ou conferir colorações aos alimentos, a fim de aumentar sua atratividade nos consumidores, mas não sem controvérsias e discordâncias quanto aos seus efeitos de utilização. Existem algumas alternativas, com bons resultados, que são lentamente aprovadas, tanto nos Estados Unidos, quanto na União Europeia com utilização de corantes naturais, como carotenoides e antocianinas, que podem substituir os seus homólogos sintéticos, entretanto alguns obstáculos para utilização dos corantes naturais como aumento do custo de fabricação e a estabilidade dos mesmos (CAROCHO et al., 2014).

Atualmente, ocorrem influências sobre as indústrias tradicionais de alimentos e as indústrias têxteis, para a progressiva substituição de corantes químicos por corantes naturais para utilização em produtos (SELVAM et al., 2015). Diante do exposto, estudos sobre a extração de compostos antioxidantes, tais como antocianinas, para utilização como corantes, são de fundamental importância.

Dentre os métodos de extração, podem ser citados os métodos convencionais de extração, utilizando solventes orgânicos (como etanol e metanol) e os métodos não convencionais como a extração em fluido supercrítico, extração com líquido pressurizado, extração por micro-ondas, extração por ultrassom e, como forma de purificação da

biomolécula, a utilização de técnicas cromatográficas. Tais técnicas consomem quantidades elevadas de solventes ou são procedimentos de alto custo, sendo assim faz-se necessário a utilização de uma técnica que permita um considerável grau de purificação e separação associada a um baixo custo de operação com processamento simples, evitando sucessivas etapas no processo (REIS et al., 2015).

Nos últimos anos, pesquisas com a extração de compostos como biomoléculas, são realizadas por uma ramificação da extração líquido-líquido, que utiliza os sistemas aquosos bifásicos (SAB) esse processo é compatível com os processos de biosseparações, a qual vem sendo utilizada com sucesso no isolamento de proteínas e mais recentemente de compostos antioxidantes (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

O surgimento de estudos que mostram possibilidade de se extrair pigmentos, sem que ocorram mudanças estruturais, é de extrema utilidade para o comércio de aditivos, uma vez que existe um interesse e uma tendência já demonstrada pelo mercado. A busca pela utilização de corantes naturais em alimentos têm levado a indústria e os pesquisadores ao interesse por pesquisa e desenvolvimento de processos utilizando materiais naturais, como os antioxidantes, que são biomoléculas fotossensíveis e termossensíveis, e a técnica de sistemas aquosos se mostra compatível para este tipo de extração (BARBOSA, 2013).

O estudo sobre a extração e partição de pigmentos em sistemas aquosos bifásicos vem sendo observados atualmente na literatura, na extração e purificação de biomoléculas, pois dependendo do polietileno glicol (PEG) e sal utilizados para composição dos sistemas, estes podem se mostrar como uma alternativa, de baixo custo e dentro dos princípios da química verde, pela não utilização de solventes tóxicos (WU et al, 2014; PATRICIO, 2012).

A extração de compostos bioativos da casca dos frutos de camu-camu por SAB se mostra como uma alternativa atraente, uma vez que este método apresentado neste trabalho propõe um procedimento sustentável e não agressivo, utilizando SAB para a extração e purificação de antocianinas em matrizes vegetais. Vale ressaltar que os sistemas são compostos em maior parte por água. Além disso, apresentam bons resultados para partição de biomoléculas, tais como compostos antioxidantes, e um baixo custo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo geral

Avaliar a partição das antocianinas da casca dos frutos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) utilizando sistemas aquosos bifásicos constituídos de Polietileno glicol PEG 1500+ Na₂SO₄+ água.

1.1.3 Objetivos específicos

- Determinar a curva de solubilidade e dados de equilíbrio dos sistemas compostos por PEG 1500 e (Na₂SO₄) nas temperaturas de 25 e 45 °C;
- Determinar a concentração de antocianinas na casca, do camu-camu após a extração e partição via SAB.
- Estudar os efeitos: temperatura, tempo e pH, no comportamento dos sistemas de duas fases aquosas constituídos por PEG e sal, nos sistemas propostos, durante a partição de antocianinas na casca do camu-camu;
- Estudar o coeficiente de partição das biomoléculas abordadas tais como (Vitamina C, compostos fenólicos totais) no estudo a partir dos sistemas aquosos bifásicos estudados;

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

O presente capítulo visa apresentar revisão bibliográfica sobre, a partição de biomoléculas via SAB, especificamente os sistemas formados por PEG e sal. Também, são apresentadas uma revisão das propriedades da casca do camu-camu. Tais trabalhos aqui abordados foram a base para a composição desta dissertação.

2.1 CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia*)

O camucamuzeiro é uma espécie nativa da Região Amazônica, vegetam espontaneamente as margens de praias, rios e lagos, lugares estes, onde a planta pode demorar até três anos para frutificar. Os frutos podem ser também cultivados em solos de terra firme, com o controle de nutrientes e água, onde a planta pode produzir até mais de duas safras anuais. O camu-camu tem ocorrência em toda a bacia Amazônica em diferentes ecossistemas que pode estar relacionados à existência de variação genética nas plantas originárias de diferentes regiões e comprovados pelo campo experimental do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), compondo uma coleção de germoplasma de camu-camu, por meio da verificação da arquitetura da planta, análises físico-químicas dos frutos, morfologia foliar e outros (YUYAMA, 2011).

Na década de 90, na Embrapa Amazônia Oriental, foi implantado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Camucamuzeiro, localizada no município de Belém, estado do Pará, com coordenadas geográficas de 48°26'45"W e 1°26'31"S. Os acessos foram provenientes de coletas realizadas as margens dos rios Javari e Jandiatuba, afluentes do rio Solimões, estado do Amazonas, e dos rios Trombetas e Tapajós, estado do Pará (NASCIMENTO et al., 2014).

Os bancos de germoplasmas são de extrema importância, pois tem como objetivo identificação de genótipos prósperos para o agronegócio, segundo Hosbino et al. (2002), a preservação de germoplasmas, na avaliação e caracterização, são imprescindíveis para a manutenção, conservação e utilização sustentáveis dos recursos genéticos.

O fruto do camucamuzeiro, Figura 01, é do tipo bagáceo, globoso, com mesocarpo carnoso (gelatinoso) e esbranquiçado, de sabor cítrico; apresentam de 1,4 a 2,7 cm de diâmetro longitudinal 1,6 a 3,10 cm de diâmetro transversal, apresentando de 1 a 4 sementes por fruto, o epicarpo é liso e brilhante, e os frutos maduros apresentam coloração que variam do vermelho escuro a vermelho púrpura, devido à presença de antocianinas (RIBEIRO et al., 2014 2002; ZANATTA e MERCADANTE, 2007; YUYAMA, 2011).



Figura 01. Frutos do camu-camu
Fonte: O autor

Os frutos do camucamuzeiro vêm se destacando mundialmente por seu elevado teor de ácido ascórbico. Em geral não são comumente consumidos *in natura* ou na forma de polpa integral, em razão de sua elevada acidez. No entanto estudos na literatura apontam a abundância em compostos bioativos e efeitos biológicos dos frutos, fatores estes que vêm despertando um crescente interesse por parte das indústrias de alimentos e farmacêuticas (AKTER et al., 2011; FUJITA et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014). As cascas dos frutos de camu-camu apresentam características de composição físico-química de acordo com a Tabela 01.

Tabela 01. Composição físico-química de cascas de camu-camu, segundo diferentes autores.

	(Maeda, 2006)	(Souza, 2014)
Umidade (g/100g)	88,26±0,27	86,02±0,36
Cinzas (g/100g)	-	2,2±0,32
Lipídios (g/100g)	-	14,5±0,62
Proteínas (g/100g)	-	5,74±0,29
Carboidratos	-	79,58±2,11
Vit. C (g/100g)	3,09±35,11	2,84±0,59

*Média ± desvio padrão

Pesquisas evidenciam o camu-camu como uma possível fonte de biocompostos (FRACASSETTI, D, et al., 2013; FUGITA, et al., 2015). Os compostos bioativos são

amplamente difundidos entre frutas e outros vegetais, sendo metabólitos secundários presentes em todo reino vegetal e que são fundamentais para a manutenção da saúde humana (SAXENA e PRADHAN, 2012). Nesse sentido, as frutas têm sido estudadas por serem verdadeiras fontes de compostos antioxidantes, principalmente em virtude da capacidade de proteção do organismo humano contra os danos causados pelos radicais livres e seus efeitos biológicos (MALTA, et al., 2013; TUDOR, et al., 2015).

Fugita et al. (2015) relata que o fruto de camu-camu apresenta altos teores de flavonóides, compostos estes que de acordo com autor podem apresentar propriedades antioxidante e anti-inflamatória e apresentam potencial para combater estresse oxidativo.

De acordo com Yuyama (2011), os frutos de camu-camu apresentam uma coloração característica devido a presença de antocianinas. Estudos realizados por Neves et al. (2015), mostram que estas substâncias são predominantes na casca do fruto e podem ser potencialmente extraídas durante o estágio final de amadurecimento e no início da senescência, quando os maiores níveis de antocianina foram detectados nos frutos.

Logo, o camu-camu apresenta-se como uma possível fonte para a extração de compostos tais como a antocianinas, e a utilização destes como corantes naturais ou ainda microencapsulação dos mesmos.

Técnicas de microencapsulação podem ser realizadas para aumentar o tempo de vida de um determinado composto. Amin et al. (2017) realizaram microencapsulação de antocianinas utilizando PEG como agente encapsulante e verificaram uma alta estabilidade na antocianina encapsulada.

O incentivo para o cultivo de camucamuzeiros e a extração dos pigmentos presentes é de grande importância para a comunidade acadêmica e industrial, uma vez que se observa uma tendência dos consumidores por uma procura por produtos com ingredientes naturais e que tragam benefícios à saúde.

2.1.1 Compostos bioativos

Os compostos bioativos são amplamente difundidos entre frutas e outros vegetais, sendo metabólitos secundários presentes em todo reino vegetal e que são vitais para a manutenção da saúde humana (SAXENA et al. 2012). Mais de 8.000 compostos fenólicos já foram relatados e estão amplamente dispersos em todo o reino vegetal (WILLIAMSON e CLIFFORD, 2010). Segundo Saxena e Pradhan (2012), os polifenóis apresentam algumas

características em comum: são substâncias orgânicas, geralmente de baixo peso molecular, possuem um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas.

Compostos fenólicos representam a maior categoria de agentes fotoquímicos atualmente reconhecidos, podendo ser divididos em até 10 diferentes classes dependendo de sua estrutura química básica, sendo as principais classes a dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. São considerados metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o seu desenvolvimento natural e uma maior concentração dos mesmos é encontrada nas cascas e sementes das diferentes fontes vegetais (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

As antocianidinas pertencem o subgrupo dos flavonoides que são subdivididos em diferentes grupamentos, tais como: os flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas e flavanois, que diferem, entre si quanto ao posicionamento dos grupos hidroxila nas estruturas do anel aromático (ROSS e KASUN, 2002). Antocianidinas são menos insolúveis que seus glicosídeos correspondentes (antocianinas), e não são encontradas livremente na natureza (FENNEMA, 2010).

O maior subgrupo de compostos fenólicos é composto pelas antocianidinas que são pigmentos solúveis em água devida presenças de hidroxilas, ligadas ao seu anel aromático, encontrados em plantas são responsáveis pelas colorações vermelhas, púrpuras e azuis de muitas frutas, vegetais e de flores (HE e GIUSTI, 2010).

Esses pigmentos apresentam diversas estruturas, e algumas são mais observadas na natureza tais como: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvinidina, sendo fitoconstituintes importantes na dieta, podendo apresentar uma ampla atividade farmacológica (HUSSEIN et al., 2016). Na figura 02, podem ser observadas as estruturas das principais antocianidinas encontradas no reino vegetal.

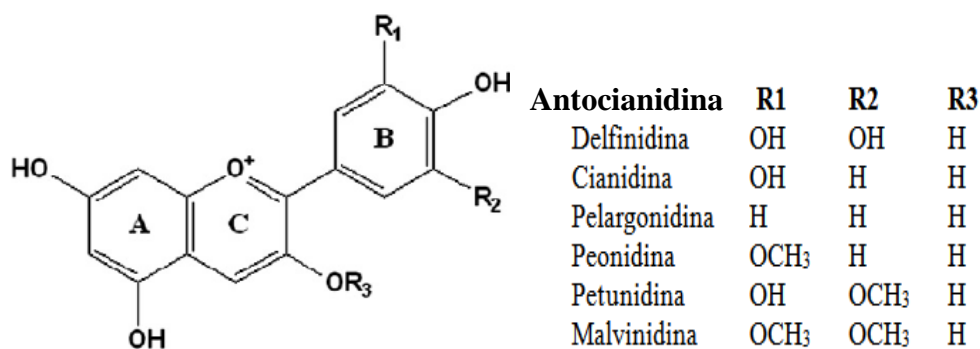
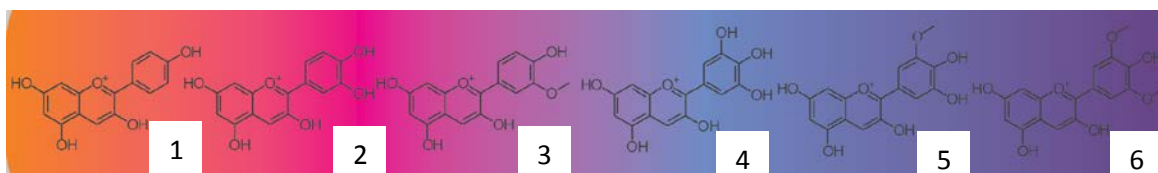


Figura 02. Estrutura básica do pigmento antocianidina, das principais antocianidinas encontradas em vegetais.

Fonte: Chiou et al. (2014)

As diferentes estruturas das antocianidinas influenciam as suas propriedades químicas, que, por sua vez, têm implicações importantes para sua estabilidade, seu equilíbrio aquoso, sua cor, seus efeitos de copigmentação, sua reatividade e suas propriedades antioxidantes (VALLS et al., 2009). Na figura 03, podem ser observadas as diferentes colorações das principais antocianidinas.



1-Pelargonidina 2- Cianidina 3- Peonidina 4- Delfinidina 5-Petunidina 6- Malvinidina

Figura 03. Gama de cores visíveis de antocianidinas

Fonte: Adaptada, Ananga, et al, 2013.

Diferentes fatores afetam a coloração e a estabilidade destes compostos, como pH, temperatura, luz, presença de copigmentos, íons metálicos, enzimas, oxigênio, ácido ascórbico, açúcar, entre outros. A forma como é feita a extração e o solvente empregado é responsável diretamente pelo teor de antocianinas extraído como também os diferentes tipos de antocianinas presentes nos extratos obtidos (HE & GISTIN, 2010). Mudanças de coloração das antocianinas em diferentes pH em meio aquoso estão dispostas na Figura 04.

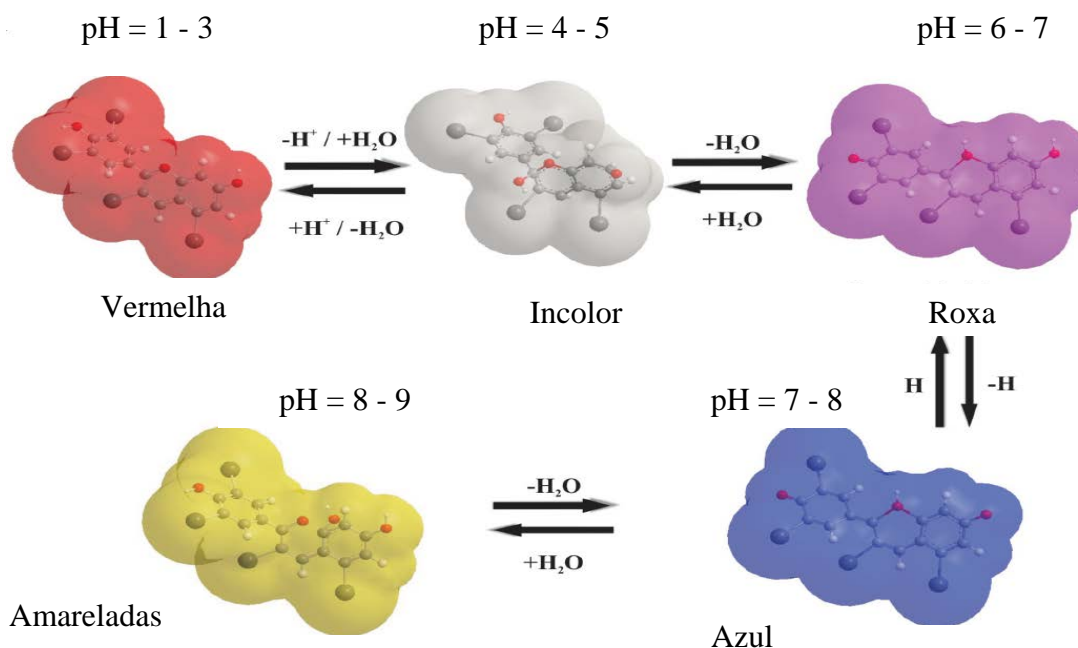


Figura 04. Mudanças de colorações de antocianinas em diferentes pH

Fonte: Adaptado, Ananga, et al, 2013.

O conhecimento dos fatores que conduzem a estabilidade das antocianinas é vital para a eficiência da sua extração/purificação e para sua utilização como corante alimentício. As antocianinas são mais estáveis sob condições ácidas, e podem ser degradadas, para soluções descoloridas ou produtos amarelados ou marrons, durante a extração/purificação ou durante o processamento e estocagem. (JACKMAN, 1992).

Para utilização de antocianinas como corantes, estas podem ser extraídas empregando solvente, após processo de secagem ou liofilização de frutas (VALDUGA et al., 2005). Como as antocianinas são moléculas hidrofílicas, o solvente mais comumente utilizado é o ácido clorídrico (HCl) (CASTAÑEDA-OVANDO, 2009). Vários procedimentos para a extração destes compostos são eficientes, no entanto os extratos nem sempre são seguros para o consumo humano, devido aos efeitos tóxicos dos solventes residuais (PATIL, 2009).

O camu-camu apresenta em sua composição dois tipos de antocianinas, pesquisa realizada por Zanatta, et al (2005) mostrou que o camu-camu apresenta antocianinas do grupo das cianidinas, especificamente cianidina-3-glicosídeo seguido de delphinidina-3-glicosídeo, do grupo das delphinidinas como antocianinas predominantes na casca do fruto, uma vez que as mesmas são predominantes nas cascas dos frutos. Suas estruturas estão representadas na Figura 05.

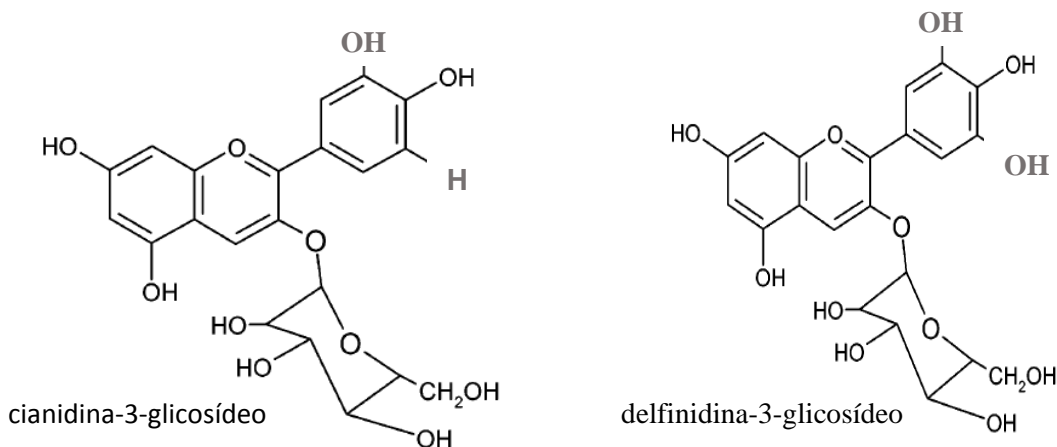


Figura 05. Estrutura do pigmento antocianina (cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo) majoritárias no camu-camu

Fonte: Zanatta et al, 2005.

A temperatura também é um dos fatores que podem alterar a estabilidade das antocianinas. Foi observado, durante o estudo da degradação térmica das antocianinas presentes na casca do mangostão realizado por Chisté, et al, (2010), que a cianidina-3-glicosídeo, apresenta degradação de tempo de meia vida de 370 horas na temperatura de 28°C,

e na temperatura de 50°C em 93 horas, o que confirma que as antocianinas são mais instáveis com o aumento da temperatura.

O camucamu é uma fruta, que em geral é conhecida como boa fonte de vitamina C, fibra dietética e minerais, contém altos níveis de componentes naturais de polifenóis que atuam como potentes antioxidantes (AKTER, 2011). A principal fonte desta vitamina vem da dieta através do consumo de vegetais e frutas (MOURA, 2010). Na figura 06 é descrita a estrutura química da Vitamina C, também denominada de ácido ascórbico.

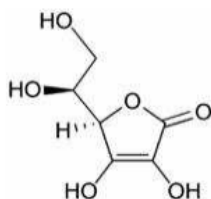


Figura 06. Estrutura química da vitamina C

Fonte: MOURA, 2010, 2005.

O ácido ascórbico é um composto polar, ocorre naturalmente em frutas e vegetais e apresenta a função de nutriente essencial. Possui uma grande utilização devido as suas propriedades antioxidantes (FENNEMA, 2010).

2.2 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)

O Sistema Aquoso Bifásico (SAB) foi estudado inicialmente no século XIX, em 1896, por Beijerinck, que, ao misturar soluções aquosas de amido e gelatina ou ágar-ágar e gelatina observou a separação das fases espontaneamente. Esses sistemas formados por duas fases líquidas são constituídos por duas fases aquosas parcialmente imiscíveis, que coexistem em equilíbrio, formadas pela adição de compostos hidrossolúveis. Cada fase do sistema torna-se enriquecida com um dos compostos, originando duas fases aquosas de naturezas, química e física diferentes, conduzindo a migração das biomoléculas para uma das fases por afinidade (ALBERTSSON, 1986).

Os SAB's são formados de uma maneira geral pela combinação de polímeros (ALBERTSSON, 1961; DHADGE et al., 2014); ou pela mistura de um álcool e um sal (orgânico ou inorgânico), (LIU et al., 2013; WU et al., 2014); mistura de sal com polímero (ASENJO e ANDREWS, 2011; JAMPANI e RAGHAVARAO, 2015) e mais recentemente, pela mistura de líquidos iônicos e sais inorgânicos (QUENTAL et al., 2015).

Os sistemas compostos por polímeros/sais apresentam vantagens em relação aos sistemas compostos por polímeros-polímeros-água, pois apresentam menor tempo de separação de fases e propriedades físicas favoráveis à operação em larga escala, como elevada seletividade e diferenças de densidade, viscosidade entre as fases adequadas para o trabalho com equipamentos de extrações disponíveis (ALBERTSSON, 1986).

A formação do SAB depende da concentração dos componentes do sistema, sendo composta por regiões monofásica e bifásica de acordo com a concentração de cada componente. O diagrama de fases delinea o comportamento de um determinado sistema bifásico, é único para cada sistema em condições determinadas de temperatura e concentração de componentes (BARROS, 2014).

As fases dos SAB's são duas regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, condutividade e composição. Como as duas fases dos SAB's coexistem em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica varia em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004), representada esquematicamente na figura 07.

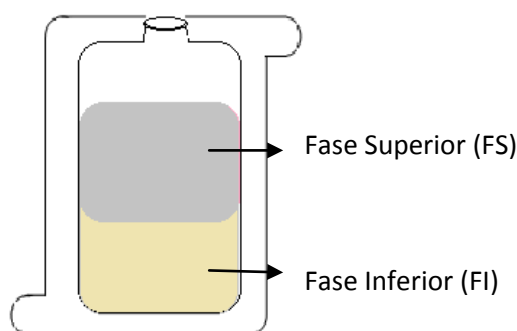


Figura 07. Esquema do SAB, composto por duas fases parcialmente imiscíveis.

Os dados de equilíbrio de fases de SAB's são representados na forma cartesiana, ou em diagramas triangulares. Na figura 08 é representado esquematicamente um diagrama de fases em coordenadas retangulares. O estudo do comportamento deste sistema é muito importante para determinação da região de miscibilidade parcial (binodal).

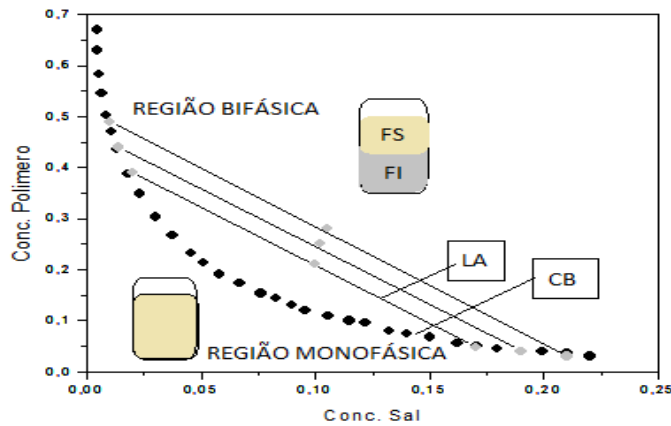


Figura 08. Esquema representativo de um diagrama de fases em coordenadas retangulares, para um SAB.

A curva binodal (CB) ou curva de solubilidade separa a região de miscibilidade parcial do sistema e é obtida através da determinação do limite de solubilidade dos três componentes, portanto valores de concentração acima da CB tem a região de duas fases e valores abaixo da CB, região monofásica. No diagrama são representadas três linhas de amarração (LA), que ligam pontos do diagrama que representam as composições das duas fases em equilíbrio.

Para se medir as diferenças das propriedades termodinâmicas entre as fases é calculado o comprimento das linhas de amarração, (CLA), equação 01. O CLA mede a distância entre os pontos na FS e FI, quanto maior for o valor do CLA maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas (BRITO, 2007).

$$CLA = \sqrt{[(C_{PS} - C_{Pi})^2 + (C_{SS} - C_{Si})^2]} \quad (01)$$

Sendo C_{PS} e C_{Pi} concentrações em % (massa/massa) de polímero na fase superior e inferior respectivamente e C_{SS} e C_{Si} as concentrações de sal nas fases superior e inferior respectivamente.

A Inclinação da Linha de Amarração (ILA) é uma característica importante em um diagrama de equilíbrio, pois é uma medida de como a composição das fases pode variar com a alteração de uma propriedade físico-química, como a temperatura e a massa molar (BARBOSA, 2013). Os valores das inclinações podem ser calculados pela Equação 02.

$$ILA = \frac{(C_{PS} - C_{Pi})}{(C_{SS} - C_{Si})} \quad (02)$$

A base para separação de substâncias com emprego de sistemas de duas fases aquosas está na distribuição seletiva dos conteúdos entre as fases formadas, calculando-se o coeficiente de partição (K) do composto de interesse (Equação 03), definido por:

$$K = \frac{C_S}{C_I} \quad (03)$$

Onde C_S e C_I as concentrações da substância, nas fases superior e inferior respectivamente e K é uma variável que mede a eficiência do processo de separação da substância de interesse (FERREIRA, 2007). Diversos tipos de interações podem ocorrer entre as substâncias de interesse e os componentes do sistema, tais como: interações de cargas, interações entre as pontes de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas. Portanto, existe uma série de fatores que podem influenciar na eficiência da partição (Albertsson, 1986).

2.2.1 Constituintes das fases - Polietilenoglicol (PEG) e sal (Na_2SO_4)

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ramificada, com massa molar variável, constituindo a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes. É solúvel em água e em vários solventes orgânicos (CARVALHO, 2004).

No Brasil, na indústria de alimentos, a utilização de polietilenoglicol, é regulamentada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), como veículo em edulcorantes de mesa e em suplementos vitamínicos e ou minerais (BRASIL, 2005). Por ser não antigênico e nem imunogênico foi aprovado pelo FDA, (Food and Drug Administration). Devido à sua capacidade de formação de uma camada protetora, o PEG pode diminuir a taxa de rejeição de materiais em sistemas biológicos em humanos. De acordo com as suas propriedades, o PEG tem uma série de aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas (SBRUZZI, 2010). Estas propriedades são, portanto, de notável importância industrial uma vez que estes polímeros apresentam baixo custo.

O sulfato de sódio (Na_2SO_4) é um sal branco, cristalino, fino com solubilidade em água de : 200 g/L. Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a 25 °C quando em solução de 50 g/L de sulfato de sódio em água (SYNTH, 2008).

3.3 PARTIÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

Técnica de extração de biomoléculas tais como compostos antioxidantes, principalmente as antocianinas vem sendo realizadas por separação por sistemas aquosos bifásicos por apresentarem vantagens, uma vez que podem ser constituídos por substâncias atóxicas, de baixo custo, além disso, sistemas que utilizam PEG podem ser ajustados para coincidir com a hidrofobicidade e o teor de água de um grande número de solventes (HUDDLESTON et al., 1998; ROGERS et al., 1998).

Atualmente, pesquisas de extração e partição de biomoléculas vêm sendo realizadas pelo estudo da partição de Sistemas Aquosos Bifásicos. Algumas aplicações de extração de biomoléculas utilizando SAB's estão descritas na tabela 02. Este tipo de estudo vem sendo realizado, como uma técnica de partição de proteínas (ABBOTT, et al. 1992; AUMILLER E KEATING, 2017). Mais recentemente estes sistemas vêm sendo utilizados na extração de corantes e compostos antioxidantes (WU et al., 2014), em outros segmentos como no tratamento de poluentes orgânicos do meio ambiente (ÁLVAREZ et al., 2015).

Assim, a utilização de sistemas constituídos por PEG e sal se mostram como um meio adequado para a extração de biomoléculas, sendo a fase superior (FS), rica em PEG, e a fase inferior (FI), rica em sal (BARBOSA, 2013; REIS, et al, 2015).

Tabela 02. Exemplos de empregos e componentes utilizados na formação do SAB em distintas aplicações.

Componente 1	Componente 2	Biomolécula	Referência
PEG	SAL	ANTOCIANINAS	PATRÍCIO (2012)
PEG	SAL	ANTOCIANINAS	JAMPANI e RAGHAVARAO, 2015
PEG	SAL	BETALAÍNAS	MARTINS (2012)
PEG	SAL	CLOROFILAS	MARTINS (2012)
ÁLCOOL	SAL	ANTOCIANINAS	LIU <i>et al.</i> (2013)
ÁLCOOL	SAL	ANTOCIANINAS	WU <i>et al.</i> (2014)

Patrício (2012) avaliou o efeito de diversos tipos de sais e PEG's, com diferentes pesos moleculares, e analisou comportamento da partição das antocianinas utilizado SAB's, e

observou que as antocianinas se concentram preferencialmente na fase rica em polímeros, e que a partição das antocianinas é dependente dos comprimentos das linhas de amarração.

Martins (2012) estudou a partição de betalaínas e clorofilas por SAB's utilizando PEG e SAL em diferentes temperaturas (5, 25 e 45 °C), observou que os sistemas aquosos bifásicos na extração betalaína e clorofila mostraram-se eficientes, nas condições trabalhadas, exceto para betalaína a 45°C, no qual o corante foi degradado.

Já pesquisas realizadas por Barbosa et al. (2013) avaliaram o efeito do peso molecular do polietileno glicol (PEG) e da temperatura para SAB constituído de polímero e sulfato de sódio em pH 2 nas temperaturas de 20 e 40 °C, avaliando as condições para aplicação da partição de antocianinas do Jamelão, e observaram que as antocianinas presentes nos extratos aquosos de Jamelão também se concentram na fase superior, seus melhores resultados ocorreram nas temperaturas de 20 °C.

Liu et al. (2013) estudaram a otimização de extração em duas fases aquosas compostos por sal e álcool, a partir de antocianinas da batata doce roxa por metodologia de superfície de resposta, onde no presente trabalho foi encontrado o melhor ponto para a partição das antocianinas e foi observado que o pH do melhor sistema de partição era igual a 3,3.

Wu et al. (2014) avaliaram a extração e purificação de antocianinas do suco de uva em SAB utilizando fosfato de sódio monobásico e etanol, investigando o efeito da composição do SAB sobre a estabilidade das antocianinas, onde foi observado que o processamento em condições de baixa temperatura, favorecem a extração e partição de pigmentos naturais e que o método de extração mostrou potencial de industrialização.

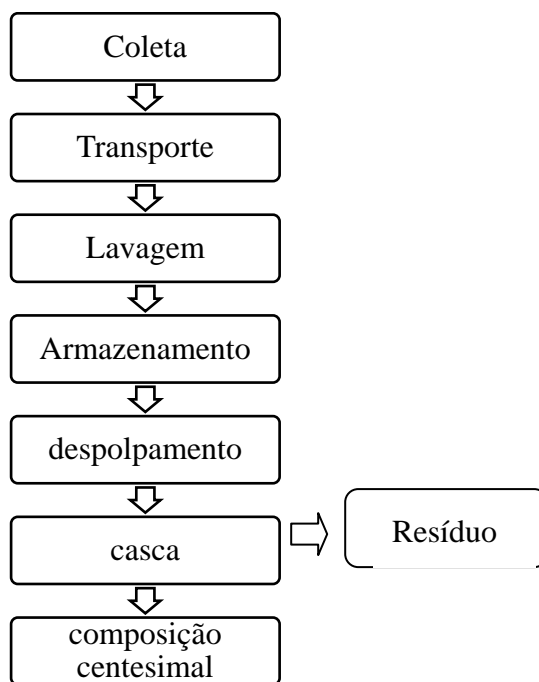
Jampani e Raghavarao (2015) avaliaram a partição e purificação de antocianinas com sistemas compostos por PEG 4000 e sal, e observaram que as antocianinas se concentram na FS (Rica em PEG), e foi realizada a purificação das antocianinas, com a retirada do PEG por metodologia de extração orgânica aquosa, e foi observado que após a retirada do polímero, foi observado um aumento de 2 á 3 vezes na concentração de antocianinas na fase aquosa, resultados onde segundo autor, podem facilitar a utilização de antocianinas extraídas por tal método como corante alimentar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima

A matéria prima utilizada neste trabalho foi tratada de acordo com o fluxograma 01. Os frutos de camu-camu, *in natura* foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Amazônia Oriental localizada na cidade de Belém-Pará no mês de janeiro de 2017. Foram transportados ao Laboratório de Equilíbrio de Fases (LEF), localizado na Universidade Federal do Pará, Campus Belém, onde foram lavados e sanitizados, e em seguida armazenados em freezer. Para realização da partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu, os frutos foram descascados manualmente e a casca adicionado a cada sistema estudado. Posteriormente foi realizada a composição centesimal das cascas dos frutos.



Fluxograma 01: Coleta e armazenamento dos frutos de camu-camu

4.1.2 Composição centesimal

Para a realização das análises de composição centesimal, os frutos de camu-camu foram descascados manualmente, e na casca do fruto foram realizadas análises de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos (por diferença) sendo os resultados expressos em porcentagem (%). As análises foram realizadas em triplicata segundo as metodologias abaixo.

- **Umidade:** Determinada via método gravimétrico, por secagem em estufa a vácuo, á 70°C, até peso constante.

- **Cinzas:** Determinada gravimetricamente, por calcinação da amostra a 550 °C, de acordo com o método 940.26 da AOAC (2002).
- **Lipídios:** Determinado por extração intermitente da fração lipídica, pelo método Soxhlet, Segundo o método no 922.06 da AOAC (1997).
- **Proteínas:** Determinadas a partir do nitrogênio total contido na amostra pelo método Kjeldahl, de acordo com o método 920.152 da AOAC (2002).
- **Carboidratos:** Determinados por diferença. De acordo com Brasil (2003).

4.1.3 Reagentes e equipamentos

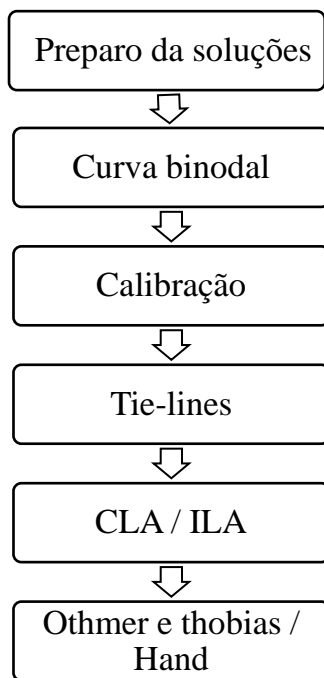
Para a formação do equilíbrio líquido-líquido foram utilizados PEG 1500 (Synth, 99%), Na₂SO₄ (Synth, 99%), água destilada. Os ajustes de pH foram feitos com ácido fosfórico (Dinâmica, 98%) e bicarbonato de sódio (Nuclear, 99%). Estes foram manuseados com o uso de balança analítica (Quimis, Q500L210C- 1mg) e banho termostático (B. Braun Biotech International, Thermomix BM), medidor de bancada multiparâmetro com eletrodo para condutividade (Hanna HI763400), manta aquecedora (Quimis, Q-321A24), células em vidro encamisadas (volume 20 mL), seringas, agulhas, tubos de ensaio e agitador magnético vórtex (QL-901), bomba a vácuo (Primatec 131 ¼ CV) e Espectrofotômetro UV-VIS (Pharmacia biotech-Ultrospec 2000).

4.2 MÉTODOS

O ponto de partida deste trabalho consistiu em estudar o sistema de duas fases aquosas contido por PEG 1500+Na₂SO₄+água, nas temperaturas de 25 e 45 °C (sistemas em branco). Posteriormente, foi realizada a partição das antocianinas da casca dos frutos de camu-camu, entre as fases destes sistemas. A composição centesimal das cascas dos frutos de camu-camu foi realizada. É descrita também a metodologia utilizada para avaliar os efeitos do tempo sobre a partição de antocianinas de casca do fruto de camu-camu nos sistemas de duas fases aquosas, constituídos por PEG 1500+ Na₂SO₄+ água. Em seguida, é exibida determinação do ponto onde ocorreu a maior quantificação de antocianinas na FS do sistema e a partir deste ponto foi realizada as quantificações de vitamina C, compostos fenólicos totais no ponto de maior concentração de antocianinas na FS.

4.2.1 Determinação de dados de equilíbrio (sistemas em branco)

Os dados de equilíbrio foram determinados conforme o Fluxograma 02.



Fluxograma 02. Construção dos sistemas aquoso bifásico SAB

4.2.1.1 Preparo das soluções estoque

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de PEG 1500 na contração 60% (massa/massa) e de Na_2SO_4 na concentração 20% (massa/massa). As soluções foram preparadas com auxílio de manta aquecedora, até que houvesse a completa solubilização.

4.2.1.2 Curva Binodal

As curvas binodais (curvas de solubilidade) dos sistemas $\text{PEG 1500} + \text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{água}$, nas temperaturas de 25 e 45 °C foram construídas através do método de titulação turbidimétrica. Este método consiste, na titulação de uma solução estoque de PEG a uma solução estoque de sal, até que a mistura final das soluções tornem-se turvas, este procedimento foi repetido até a obtenção de pontos para a construção das curvas binodais, onde, a partir das diferentes frações mássicas obtidas, foram construídas as curvas binodais dos dois sistemas. Estes procedimentos foram realizados em células encamisadas (em vidro) acopladas a um banho termostático, nas temperaturas de 25 e 45 °C. Em seguida cada curva

foi correlacionada em duas equações, uma referente à fase superior (rica em PEG, Equação 04) e outra para fase inferior (rica em sal, Equação 05).

$$W_1^S = f(W_2^S) \quad (04)$$

$$W_1^I = f(W_2^I) \quad (05)$$

4.2.1.3 Curva de calibração

Para a construção das curvas de calibração, foram selecionados pontos de mistura sobre as curvas binodais, em seguida foram reproduzidas as soluções em concentrações conhecidas e posteriormente realizadas medidas de condutividade. Os dados obtidos foram correlacionados usando a equação (Equação 06), de modo a obter-se um coeficiente de correlação (R^2), próximo à unidade.

$$CONDUTIVIDADE = f(W_1, W_2) \quad (06)$$

4.2.1.4 Linhas de amarração (*Tie-lines*)

As linhas de amarração foram obtidas com o preparo de soluções com composições globais dentro da curva binodal (região bifásica). Dessa forma, os componentes requeridos foram pesados, (em tubos de ensaio), homogeneizados em vortex por 1 minuto e em seguida foram mantidos em repouso (submersos no banho termoeestático), durante 24 horas nas temperaturas de cada sistema, tempo mais que suficiente para atingirem o equilíbrio de fases.

Após alcançarem o equilíbrio termodinâmico, amostras de ambas as fases, foram coletadas (com os tubos ainda submersos no banho) e os componentes do sistema foram quantificados utilizando a metodologia do método indireto, que consiste na quantificação dos componentes em cada fase, com a resolução de um sistema de 3 equações, equação da curva binodal (equações 04-05), equação de calibração (equação 06) e a equação de balanço de massa dada pela equação 07.

$$w_1 + w_2 + w_3 = 1 \quad (07)$$

Comprimento das linhas de amarração (CLA) e inclinação das linhas de amarração (ILA) de acordo com as Equações 01 e 02, respectivamente.

A correlação de OTHMER-TOBIAS (Equação 08) e HAND (Equação 09) foram utilizadas para testar a validade dos dados experimentais dos sistemas estudados, de modo a

medir a confiabilidade dos dados obtidos experimentalmente. A linearidade destas correlações indica o quanto os dados estão bons.

$$\ln\left(\frac{1 - w_1^S}{w_1^S}\right) = A + B \cdot \ln\left(\frac{1 - w_2^I}{w_2^I}\right) \quad (08)$$

$$\ln\left(\frac{w_S^S}{w_1^S}\right) = A + B \cdot \ln\left(\frac{w_S^I}{w_2^I}\right) \quad (09)$$

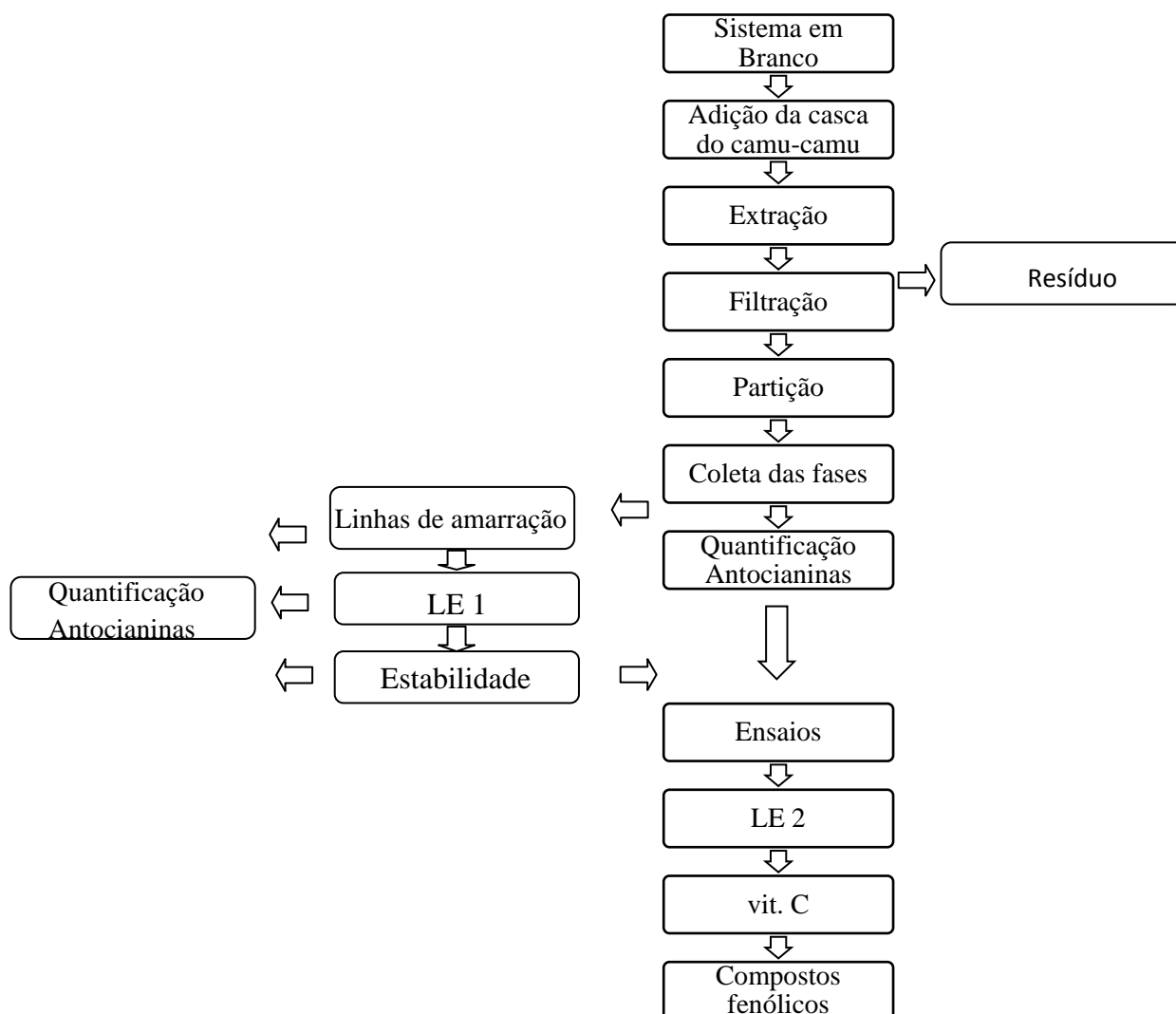
Onde w_1 corresponde à fração mássica de PEG, w_2 a fração mássica de sal, e w_3 a fração mássica de água; e os sobrescritos S e I representam os pontos na fase superior e a fase inferior, respectivamente.

4.2.2 Estudo da partição das antocianinas da casca de camu-camu

Os valores de pH utilizados na partição foram de (2 e 4,5), estes valores foram adotados com base em estudos realizados por (WU et al., 2014). As temperaturas dos sistemas (25 e 45 °C) e o tempo de estabilidade das antocianinas foram avaliados experimentalmente.

Os ensaios foram realizados de acordo com o fluxograma 03, para cada sistema em branco foi avaliado o efeito da concentração dos componentes dos sistemas sobre a partição das antocianinas, com controle de temperatura (25 °C) ao abrigo da luz. Para avaliar tal efeito, foram reproduzidas as 4 linhas de amarração no pH 3,25 (pH médio). Em cada linha de amarração dos sistemas em branco foram adicionados 3 gramas de casca do fruto, e foram mantidas sob extração/agitação por 3 minutos em vórtex. Posteriormente, este material foi filtrado sob vácuo, e deixados em repouso até os sistemas entrarem em equilíbrio (partição). Após atingirem o equilíbrio, as fases superiores e inferiores foram coletadas e em seguida realizadas análises de antocianinas totais, de acordo com o método do pH diferencial descrito por Fuleki e Francis (1968).

Com base nestes resultados foi verificada a melhor linha de amarração LE 1 (aquela onde houvesse maior concentração de antocianinas em uma das fases do sistema), e após foi realizado testes em relação ao tempo de análises (estabilidade).



Fluxograma 03. Ensaios de extração, partição e escolha da linha de estudo para extração e partição das antocianinas, vitamina C, compostos fenólicos totais via SAB.

4.2.2.1 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu nos sistemas, em relação ao tempo.

Para determinação da estabilidade foram realizados ensaios de partição das antocianinas da casca de camu-camu, utilizando a melhor linha de amarração (Linha de estudo LE 1), para avaliar a taxa de conservação de antocianinas através da quantificação de antocianinas totais em relação aos tempos de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 min.

Estes ensaios consistiram na preparação da LE 1, em seguida dos tubos foram mantidos em repouso sob o abrigo de luz, na temperatura de 25 °C, até que ocorresse a separação das fases. Sequencialmente, foram coletadas as fases superiores e inferiores dos tubos e após cada tempo preestabelecido foram realizadas a quantificação das antocianinas

totais, de acordo com o método do pH diferencial descrito por Fuleki e Francis (1968) conforme descrito com item 4.2.3.1.

Diante da definição da degradação das antocianinas no sistema em relação ao tempo, foi analisado o melhor tempo de extração para diferentes pH's e temperaturas dos sistemas.

4.2.2.2 Avaliação dos efeitos tempo, pH e temperatura sobre a partição das antocianinas presentes na casca de camu-camu

Após a determinação da LE 1, os demais ensaios foram realizados de acordo com a composição da mesma, pois nesta as antocianinas foram mais estáveis na FS.

A metodologia de extração/partição empregada, foi realizada de acordo com Wu et al. (2014) com algumas modificações. Foi utilizada uma proporção 1:5 (m/m) em relação à quantidade de casca do fruto utilizado a massa do sistema. Os frutos de camu-camu foram descascados manualmente, em seguida maceradas, 3 gramas das cascas foram adicionadas a 15 gramas de sistemas, que foram agitados com auxílio de vórtex por 3 minutos, após a agitação os mesmos foram filtrados sob vácuo (para retirada da casca), e em seguida os mesmos foram deixados a abrigo da luz em suas respectivas temperaturas. As partições foram realizadas em triplicata de acordo com a tabela 03.

Tabela 03. Ensaios das partições das antocianinas da casca do camu-camu via SAB

Experimentos	Variáveis		
	T (°C)	pH	t (minutos)
1	25	2	70
2	45	2	70
3	25	4,5	70
4	45	4,5	70
5	25	2	240
6	45	2	240
7	25	4,5	240
8	45	4,5	240

Foram preparadas soluções com as frações mássicas correspondentes a cada fase, o pH dos pontos foram corrigidos com ácido fosfórico para o pH 2 e com solução de Bicarbonato

de sódio 10 %, para pH 4,5. As medições do pH das linhas foram medidas em pHmetro. Os sistemas foram pesados em tubos de ensaio, em seguida adicionados a casca do camu-camu. Após, foram homogeneizados por 3 minutos, em Vortex Mixer (Kylin-Bell, modelo QL-901), filtrados sob vácuo, os tubos foram colocados ao abrigo de luz em banho termostático de acordo com a temperatura utilizada e o tempo estabelecido, para se avaliar as diferentes partições das antocianinas da casca do camu-camu via SAB.

Após o tempo de partição foram coletadas as fases superiores e inferiores de ambas as fases e nestas foram realizadas análises de antocianinas totais pelo método de pH diferencial descrito por Fuleki e Francis (1968). Com base nos resultados de antocianinas totais foi determinado a Linha de estudo 2 (LE 2), para os ensaios de partição das antocianinas da casca do camu-camu via SAB, descritos na tabela 3.

4.2.3 Partição

Foi realizado o cálculo do coeficiente de partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu, de acordo a razão das concentrações de antocianinas nas fases superiores e inferiores, respectivamente para todos os ensaios realizados.

Sendo que, foram realizadas as análises dos demais compostos abordados, tais como: Vitamina C, Compostos fenólicos totais na LE 2, experimento onde houve a maior concentração de antocianinas na FS, conforme as condições estabelecidas na tabela 3.

Para verificar a existência de diferença significativa entre as extrações, as médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com auxílio de softwares.

4.2.3.1 Antocianinas Totais

A quantificação de antocianinas totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico do pH diferencial, que utiliza soluções tampões pH 1,0 e 4,5, conforme descrito por Fuleki e Francis (1968).

Uma alíquota de amostra foi pipetada para 2 tubos de ensaio e, em seguida, foi adicionado 10 mL de solução tampão pH 1,0 (HCl/KCl) ao primeiro tubo e 10 mL de tampão pH 4,5 (HCl/CH₃COONa) ao segundo tubo. A mistura foi homogeneizada em vortex. A absorbância das soluções foi determinada em espectrofotômetro, em comprimentos de onda de 510 e 700 nm, utilizando água destilada como branco. Para o cálculo das antocianinas totais foi utilizada a Equação 10.

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{[(Abs_{510nm} - Abs_{700nm})_{pH1,0} - (Abs_{510nm} - Abs_{700nm})_{pH4,5}] \times MM \times FD \times 1000}{AM} \quad (10)$$

Onde C é igual a concentração de antocianinas presentes na amostra e a diferença dos valores de absorvância em pH 1,0 e 4,5 é diretamente proporcional à concentração de antocianinas. O cálculo foi baseado em cianidina-3-glucosídeo, antocianina predominante nas amostras de camu-camu (ZANATTA *et al.*, 2005), com massa molecular (MM) de 449,2 g/mol e absorvidade molar de 26.900 L/mol/cm (AM). Para o cálculo do fator de diluição (FD) dividiu-se o volume final da solução, após a adição do tampão, pelo volume da alíquota de amostra utilizada.

4.2.3.2 Quantificação de vitamina C

Foi quantificada de acordo com o método titulométrico n° 43.065 da AOAC (1984), modificado por Benassi (1990), que se baseia na oxidação do ácido ascórbico a ácido deidroascórbico. O ensaio utiliza o 2,6-dicloro-fenol-indofenol (DCFI), conhecido como reativo de Tillmans, que é reduzido pela solução ácida do ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em g/100 g.

4.2.3.3 Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método descrito por Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé et al. (2005), que se baseia na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdênico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstístico ($H_3PW_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}), pelos compostos fenólicos em meio alcalino, produzindo um complexo de coloração azul. Segundo Naczki e Shahidi (2004), além dos compostos fenólicos, o reagente Folin-Ciocalteu também é capaz de reduzir substâncias como o ácido ascórbico, açúcares e alguns aminoácidos. Dessa forma, esses compostos atuam como interferentes nos resultados.

A extração dos compostos fenólicos na FS do sistema aquoso bifásico item 4.2.2.2 foi realizada no melhor ponto de concentração das antocianinas na FS, onde está foi coletada, e em seguida solubilizada com solução aquosa de acetona 70% (v/v). A mistura foi agitada (na

ausência de luz). O extrato obtido foi filtrado e, posteriormente, diluído em água destilada a fim de corrigir a concentração de acetona para 7%, obtendo-se o extrato bruto.

Para a remoção de compostos interferentes na análise, uma alíquota de 2 mL do extrato bruto foi eluída em um cartucho de separação OASIS[®] HLB 3cc (*Waters Corporation*, EUA), previamente ativado com metanol puro e água destilada. Os compostos fenólicos foram absorvidos na coluna e o extrato composto somente por substâncias redutoras (ácido ascórbico e/ou açúcares redutores) foram eluídos por meio da passagem de duas alíquotas de 2 mL de água destilada. Os filtrados foram recolhidos em uma proveta e homogeneizados, resultando no extrato lavado.

Uma alíquota de 0,5 mL dos diferentes extratos (bruto e lavado) foi submetida à reação com 2,5 mL de Folin-Ciocalteu e, após 2 minutos de repouso em temperatura ambiente, foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7,5% (m/v). Após 60 minutos de reação foi realizada a quantificação. Para o branco, a alíquota de extrato foi substituída pela mesma quantidade de acetona 7%. A quantificação foi feita por leitura espectrofotométrica a 760 nm. Ácido gálico foi utilizado para obtenção da curva padrão. O teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de ácido gálico equivalente/100 g, foi calculado pela diferença entre os valores obtidos para o extrato bruto e para o extrato lavado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS CASCAS DO CAMU-CAMU

Na Tabela 04 estão reportadas a composição centesimal da casca do camu-camu. Os valores de umidade, cinzas se assemelham aos encontrados por (SOUZA, 2014) para a casca do camu-camu onde a pesquisa encontrou valores de umidade entre 82 e 86% e de cinzas entre 1,46 e 2,05 %.

Tabela 04. Composição centesimal da casca do camu-camu

Constituinte	Casca do camu-camu
Umidade (%)	85,35 ± 0,33
Cinzas (%)	1,92 ± 0,07
Lipídeos (%)	9,08 ± 0,35
Proteínas (%)	0,55 ± 0,26
Carboidratos (%)	3,09 ± 0,01

5.1 CURVA BINODAL

A Figura 09 representa as curvas binodais, nestes diagramas compostos por PEG 1500 + Na₂SO₄ + água nas temperaturas de 25 e 45 °C tem-se duas regiões, as quais demarcam as regiões em que os sistemas deixam de ser monofásicos e passam a ser bifásicos. Composições localizadas na região abaixo das curvas formam sistemas homogêneos, enquanto que na região acima, formam sistemas com duas fases (região de separação). Vale ressaltar que, os componentes presentes em maiores quantidades nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente, As composições de equilíbrio dos sistemas estão apresentadas nos anexos I e II expressos em fração mássica (m/m).

A partir da análise dos dados das curvas binodais, foi possível verificar que praticamente não ocorreu variação entre as curvas binodais (Figura 09) entre as duas temperaturas, na região bifásica e monofásica, uma vez que as mesmas se encontram praticamente sobrepostas, segundo Barbosa (2013), este fato indica que há uma variação insignificante da capacidade calorífica das fases e, conseqüentemente, baixa variação de entalpia associada ao processo de separação.

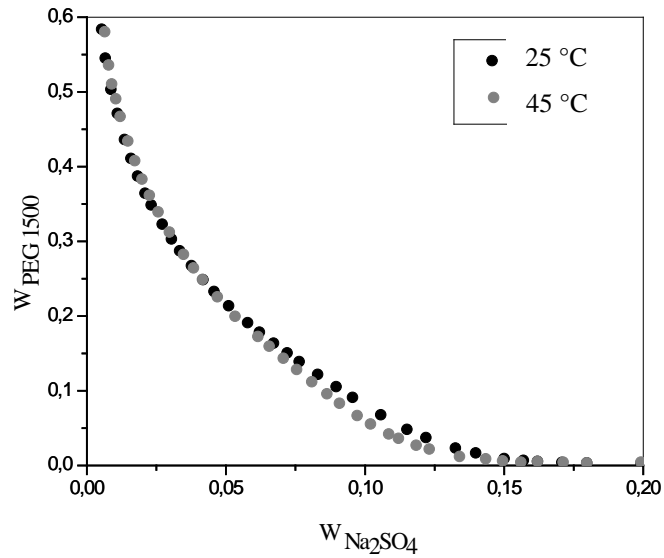


Figura 09. Curvas binodais do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 °C (●) e 45 °C (●)

Os dados da curva binodal foram correlacionados por equações, e para melhorar os ajustes, estes dados foram separados em duas regiões, uma rica em PEG e outra em Sal. Esta divisão permitiu ajustar duas equações que demonstrassem o comportamento das curvas binodais (Equações 10 e 11) para as partes das curvas ricas em PEG e Sal, na temperatura de 25 °C. Para temperatura de 45 °C as partes das curvas ricas em PEG e Sal foram ajustadas (Equações 12 e 13). Os parâmetros das equações usados para reproduzir os dados, se encontram representados na Tabela 05. As Equações das curvas binodais foram utilizadas posteriormente, para o cálculo das composições das fases no sistema.

$$w_1^S = A + B \cdot w_2^S + C \cdot (w_2^S)^2 + D \cdot (w_2^S)^3 + E \cdot (w_2^S)^4 \quad (10)$$

$$w_2^I = A + B \cdot w_1^I + C \cdot (w_1^I)^2 + D \cdot (w_1^I)^3 \quad (11)$$

$$w_1^S = A + B \cdot w_2^S + C \cdot (w_2^S)^2 + D \cdot (w_2^S)^3 + E \cdot (w_2^S)^4 \quad (12)$$

$$w_2^I = A + B \cdot w_1^I + C \cdot (w_1^I)^2 + D \cdot (w_1^I)^3 + E \cdot (w_1^I)^4 \quad (13)$$

Onde w_1 corresponde às frações mássicas de PEG, w_2 a frações mássicas de Sal, e os sobre-escritos S e I superior e inferior, respectivamente.

Tabela 05. Parâmetros A, B, C e D e os coeficientes de determinação (R^2) obtidos para as equações das curvas binodais dos sistemas PEG 1500 + sulfato de sódio + água a **25 e 45 °C**

Equações	Parâmetros					R^2
	A	B	C	D	E	
01	0,7161	-30,7902	936,8361	14914,2607	89786,9101	0,9991
02	0,4766	-6,0764	23,3429	-23,7263	-	0,9982
03	0,7318	-30,6867	897,2352	-13873,7771	80947,1607	0,9983
04	0,4665	-4,7664	-11,2366	247,9712	-652,5901	0,9993

5.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Os dados da curva de calibração são apresentados na tabela 06, que mostra as frações mássicas de cada componente do sistema, médias dos valores de condutividade e seus respectivos coeficientes de variação nas temperaturas de 25 e 45 °C, para cada sistema estudado.

As curvas de calibração foram construídas a partir dos resultados de condutividade das misturas em função das frações mássicas de cada componente (tabela 06), na Figura 10 e Equações 14 e 15 respectivamente, se encontram representados as curvas de calibração, assim como os polinômios utilizados para reproduzir os dados das curvas nas temperaturas de 25 e 45 °C.

As correlações dos dados apresentaram coeficientes de determinação R^2 0,9999, para o sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 °C, R^2 0,9998 para o sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 45°C, os parâmetros obtidos nos ajustes foram posteriormente utilizados para as quantificações das fases em equilíbrio.

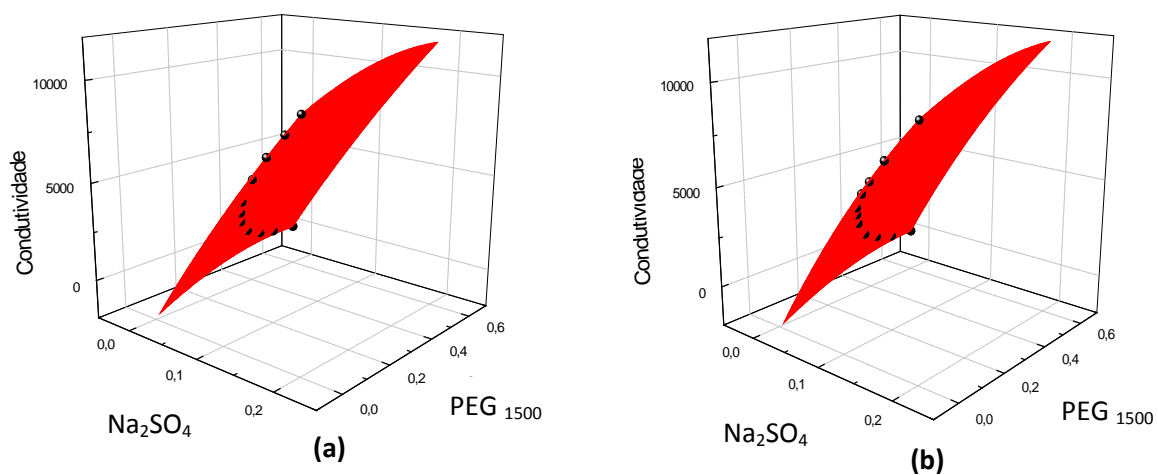


Figura 10. Curva de calibração dos sistemas PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 °C **(a)** e a 45°C **(b)**.

Tabela 06. Dados das curvas de calibração dos sistemas compostos por PEG 1500 (1) + sulfato de sódio (2) + água (3) a 25 e 45 °C.

Pontos	w ₁	w ₂	w ₃	Condutividade (μS/cm)	CV (%)*	Pontos	w ₁	w ₂	w ₃	Condutividade (μS/cm)	CV (%)*
25 °C¹						45 °C²					
1	0,5839	0,0054	0,4107	337	0,38	1	0,5806	0,0065	0,4130	400	0,28
2	0,4712	0,0109	0,5179	626	0,24	2	0,4672	0,0119	0,5208	672	0,17
3	0,3874	0,0182	0,5944	994	0,23	3	0,3618	0,0225	0,6157	1230	0,36
4	0,2873	0,0334	0,6794	1722	0,34	4	0,2645	0,0383	0,6971	1977	0,11
5	0,1911	0,0578	0,7511	2874	0,13	5	0,1595	0,0656	0,7749	3257	0,18
6	0,1391	0,0763	0,7845	3727	0,31	6	0,1121	0,0808	0,8071	4057	0,34
7	0,0912	0,0955	0,8133	4657	0,39	7	0,0667	0,0972	0,8361	4717	0,32
8	0,0258	0,1325	0,8417	6297	0,09	8	0,0269	0,1184	0,8547	5707	0,20
9	0,0069	0,1569	0,8362	7557	0,08	9	0,0121	0,1340	0,8539	6453	0,24
10	0,0043	0,1797	0,8159	8697	0,15	10	0,0045	0,1560	0,8395	7577	0,15
11	0,0025	0,1992	0,7983	9700	0,12	11	0,0031	0,1993	0,7977	9587	0,16

*CV=coeficiente de variação

¹ Sistema composto por PEG 1500+Na₂SO₄+H₂O a 25 °C

² Sistema composto por PEG 1500+Na₂SO₄+H₂O a 45 °C

$$\text{CONDUTIVIDADE} = -1982,82765 + 67194,10205 \cdot W_2 - 7016,69622 \cdot \quad (14)$$

$$W_1 - 43603,74341 \cdot W_2^2 - 6313,04602 \cdot W_1^2$$

$$\text{CONDUTIVIDADE} = -2225,29659 + 74463,46595 \cdot W_2 - 7041,65595 \cdot \quad (15)$$

$$W_1 - 76544,75297 \cdot W_2^2 - 5758,19104 \cdot W_1^2$$

5.3 LINHAS DE AMARRAÇÃO (*TIE-LINES*)

Soluções de composições globais foram preparadas a partir de pontos escolhidos dentro das regiões heterogêneas, delimitadas pelas curvas binodais dos sistemas compostos por PEG 1500+Na₂SO₄+H₂O nas temperaturas de 25 e 45 °C, foram preparados experimentalmente para obtenção de dados das linhas de amarração (*Tie-lines*), mostrados na Tabela 07, juntamente com os dados de leituras de condutividade e seus respectivos coeficientes de variação das fases superiores e inferiores coletadas em cada linha de amarração.

De posse dos resultados de condutividade para cada grupo de pontos, foram substituídos nas (Equações 10 e 11 de calibração), e solucionados com o auxílio do software. Os sistemas compostos pelas Equações para o sistema composto por PEG 1500+Na₂SO₄+H₂O a 25 °C (Equações 07, 10, 14), para a fase superior, (Equação 07, 11, 14) para a fase inferior, e para o sistema composto por PEG 1500+Na₂SO₄+H₂O a 45 °C (Equação 07, 12, 15), para a fase superior, (Equação 07, 13, 15), resultando nas frações mássicas de cada componente presente nas fases coletadas, apresentadas na tabela 07, juntamente com as composições globais e das fases superior e inferior do sistema para cada temperatura. Na Figura 11 estão reportados os diagramas de equilíbrio e apresentadas na forma cartesiana (frações mássicas).

Tabela 07. Dados de equilíbrio líquido-líquido do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água e condutividade ($\mu\text{c}/\text{cm}$) das Tie-lines, nas temperaturas de a **25 e 45 °C**

<i>Tie-lines</i>	Composição Global			Fase Superior			Fase Inferior						
	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	Cond. ($\mu\text{c}/\text{cm}$)	CV*	w ₁	w ₂	w ₃	Cond. ($\mu\text{c}/\text{cm}$)	CV*
25 °C													
1	0,1062	0,1244	0,7694	0,3124	0,0287	0,6589	1486	0,17	0,0044	0,1610	0,8346	7737	0,13
2	0,1103	0,1429	0,7468	0,3458	0,0232	0,6310	1224	0,12	0,0009	0,1767	0,8224	8537	0,26
3	0,1144	0,1612	0,7243	0,3834	0,0184	0,5982	1006	0,24	0,0011	0,1841	0,8148	8920	0,15
4	0,1185	0,1797	0,7018	0,4201	0,0149	0,5650	884	0,17	0,0048	0,1987	0,7965	9685	0,21
45 °C													
1	0,1062	0,1244	0,7694	0,3403	0,0228	0,6369	1298	0,16	0,0118	0,1532	0,8350	7477	0,13
2	0,1103	0,1429	0,7468	0,3907	0,0171	0,5922	1058	0,19	0,0044	0,1610	0,8346	8180	0,50
3	0,1144	0,1612	0,7243	0,4332	0,0135	0,5533	873	0,53	0,0008	0,1767	0,8225	8867	0,36
4	0,1185	0,1797	0,7018	0,4553	0,0119	0,5328	849	0,09	0,0044	0,1979	0,7977	9643	0,39

w₁= fração mássica de PEG; w₂= fração mássica de SAL; w₃= fração mássica de ÁGUA; *CV=coeficiente de variação

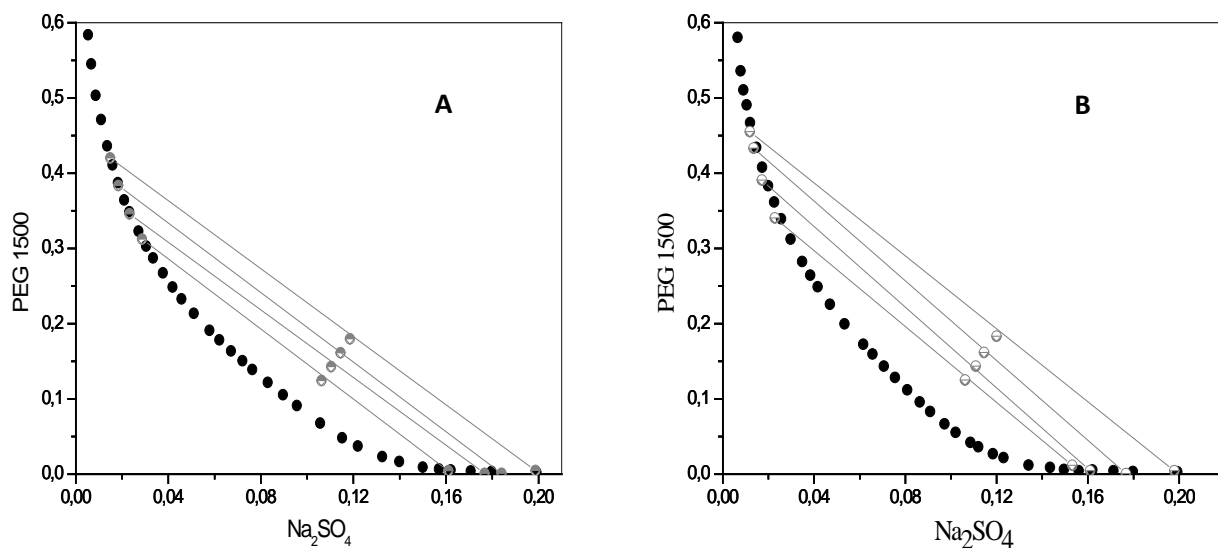


Figura 11. *Tie-lines* do diagrama de fases do sistema PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 (A) e 45 (B) °C.

Para assegurar a confiabilidade dos dados obtidos, foram realizadas correlações empíricas para as linhas de amarração obtidas através do método de Othmer & Tobias e Hand. Os parâmetros e coeficientes de determinação das mesmas estão apresentados na tabela 07. Pode-se observar na Figura 12 e nos coeficientes de determinação (tabela 08), que a linearidade indica boa qualidade dos dados, mostrando serem confiáveis.

Tabela 08. Parâmetros e coeficientes de determinação das equações de Othmer & Tobias e Hand para os sistemas composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.

Correlação	A	B	R ²
Temperatura 25 °C			
Othmer & Tobias	-2,2081	1,8109	0,9916
Hand	-2,0950	1,7195	0,9881
Temperatura 45 °C			
Othmer & Tobias	-2,2645	1,6676	0,9703
Hand	-2,2531	1,6489	0,9771

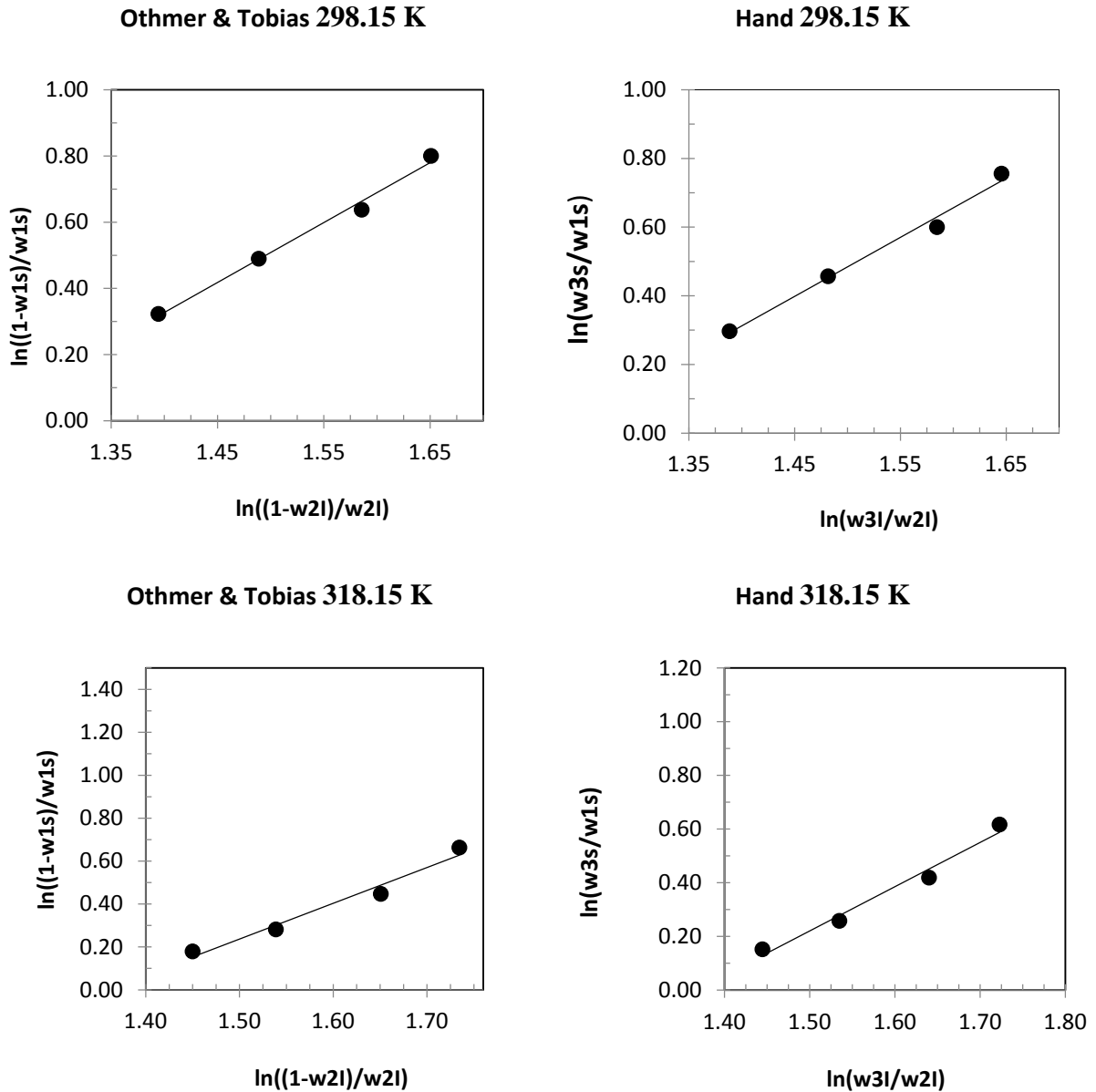


Figura 12. Gráficos de Othmer & Tobias e Hand para os sistemas compostos por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.

Na Tabela 09 são mostrados, os valores das inclinações das linhas de amarração nas temperaturas de 25 e 45 °C. Foi observado que o aumento na temperatura aumentou o comprimento da linha das linhas de amarração. A inclinação das linhas de amarração (ILA) mede como as composições das fases podem variar, com alteração de uma propriedade físico química, como a temperatura e a massa molar (BARBOSA, 2013).

Tabela 09. Inclinação das linhas de amarração (ILA) para o sistema composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C

Método	Inclinação das Tie-Lines			
	1	2	3	4
ILA 25 °C	-2,3280	-2,2469	-2,3072	-2,2595
ILA 45 °C	-2,5192	-2,6845	-2,6495	-2,4242

Outra característica importante é o comprimento da linha de amarração (CLA), é um parâmetro que pode ser utilizado para comparações entre os sistemas aquosos bifásicos, os (CLA) foram calculados em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase, tabela 10. Com o aumento do CLA temos um aumento nas diferenças entre a fase superior e inferior, em termos de propriedades intensivas (BRITO, 2007). Foi observado um aumento nas ILA para todas as linhas de amarração com o aumento da temperatura.

Comportamento semelhante foi observado por BARBOSA, et al., 2013 para sistema composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 30 e 40 °C, onde o CLA e ILA também aumentaram com a elevação da temperatura.

Tabela 10. Comprimento das linhas de amarração (CLA) para o sistema composto por PEG 1500 + sulfato de sódio + água a 25 e 45 °C.

Método	Comprimento das Tie-Lines			
	1	2	3	4
CLA 25 °C	0,3352	0,3775	0,4167	0,4542
CLA 45 °C	0,3534	0,4122	0,4622	0,4878

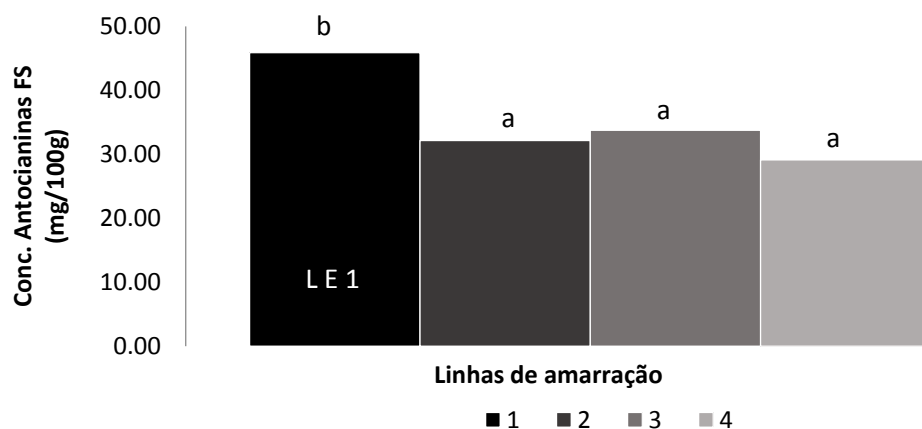
5.4 ESTUDO DA PARTIÇÃO DAS ANTOCIANINAS DA CASCA DE CAMU-CAMU

Neste item é mostrada a escolha da melhor linha de amarração (LE 1), para realização do presente trabalho, após a determinação foi verificado a estabilidade da mesma em relação ao tempo, para sucessivamente a realização da determinação do melhor ponto de partição e concentração das antocianinas presentes na casca do camu-camu.

5.4.1 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu em relação às linhas de amarração

Primeiramente foram realizadas partições para determinação da melhor linha de amarração (LE 1), as partições foram realizadas na temperatura de 25 °C, no pH de 3,25 (pH médio). A temperatura foi escolhida por ser a menor temperatura desta pesquisa, para composição dos sistemas e o pH por ser o pH médio entre as variações abordadas neste trabalho (pH 2,0-4,5).

Na Figura 13, pode-se observar que a linha de amarração (*tie-line* 1) apresentou maior estabilidade das antocianinas na fase superior (FS), desta forma foi estabelecido que esta era a LE 1, e foi a linha que apresentou o menor CLA e maior ILA, no sistema a 25 °C. De acordo com o teste de tukey (5% de significância), houve diferença significativa entre a LE 1 em relação as demais linhas estudadas. Resultado semelhante foi encontrado por (MAGESTE et al., 2009) ao estudar a partição do corante carmin, por sistemas compostos por PEG 1500 e sulfato de lítio e por (BARBOSA, 2013), ao estudar a partição de antocianinas do jamelão por sistema composto por PEG 1500 e sulfato de sódio, onde as concentrações dos compostos de interesse se concentraram na fase superior.



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

Figura 13. Efeito das linhas de amarração na partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu.

Na Figura 14 pode ser observado o comportamento das antocianinas da casca do camu-camu no sistema nas diferentes *tie-lines*.

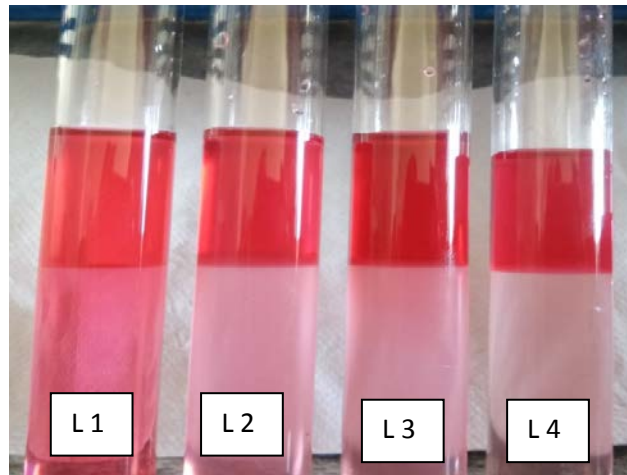
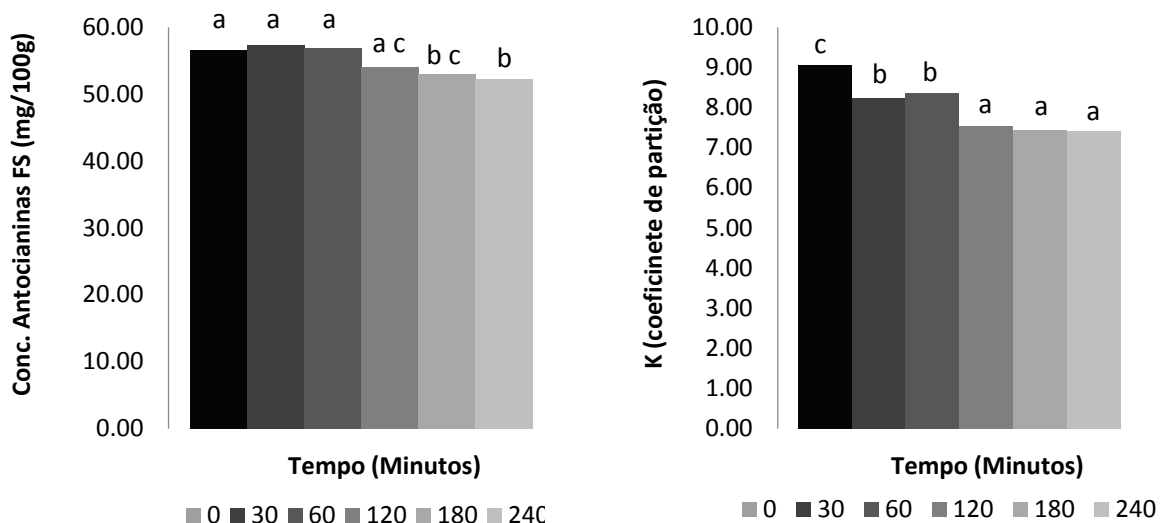


Figura 14. Efeito do comportamento das antocianinas da casca do camu-camu nas diferentes linhas de amarração.

5.4.2 Estabilidade das antocianinas da casca do camu-camu nos sistemas em relação ao tempo

O teste de estabilidade foi realizado na Linha 1 (LE 1), linha que apresentou maior concentração das antocianinas na fase superior. A figura 15 mostra a estabilidade das antocianinas em relação concentração de antocianinas na fase superior e no coeficiente de partição, em diferentes tempos.



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

Figura 15. Efeito do tempo na linha de amarração 1 (LE 1) na concentração de antocianinas na fase superior e na partição das antocianinas presentes na casca do camu-camu.

Verifica-se que não houve diferença significativa na concentração de antocianinas na fase superior, de acordo com o teste de tukey, em relação aos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, somente nos tempos de 180 e 240 minutos, que ocorreu diferença significativa, em relação a degradação das antocianinas, na fase superior.

Observa-se que em relação ao coeficiente de partição, houve diferença significativa de acordo com o teste de tukey, em relação aos tempos 0, 30 e 60 minutos, após o tempo 120 minutos foi observado que o coeficiente de partição não apresentou diferença significativa em relação aos demais tempos.

Como não houve diferença significativa entre os primeiros tempos em relação a concentração de antocianinas na fase superior o menor tempo para partição para o estudo foi de 70 minutos e o maior tempo foi o tempo 240 onde ocorreu uma maior degradação das antocianinas.

5.4.3 Avaliação dos efeitos tempo, pH e temperatura sobre a partição das antocianinas presentes na casca de camu-camu

Os resultados das oito extrações feitas variando pH, tempo e temperatura, de acordo com a Tabela 3, são apresentados nas Figuras 16 e 17, e Tabela 11.

Tabela 11. Quantificação das antocianinas na FS e coeficiente de partição K dos ensaios das partições das antocianinas da casca do camu-camu via SAB

Ensaio	T (°C)	pH	t (min.)	[Ant (mg/100g)] FS	K
1	25	2	70	26,73±0,37 ^d	1,45±0,08 ^b
2	45	2	70	40,85±0,11 ^a	6,10±0,01 ^a
3	25	4,5	70	41,67±0,07 ^a	4,37±0,11 ^c
4	45	4,5	70	32,68±1,51 ^b	7,63±0,61 ^d
5	25	2	240	18,91±0,78 ^c	2,00±,011 ^b
6	45	2	240	36,96±1,06 ^b	6,05±0,01 ^a
7	25	4,5	240	57,25±0,09 ^e	5,49±0,79 ^a
8	45	4,5	240	42,82±0,86 ^a	13,41±1,58 ^e

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância ($\alpha=0,05$).

Observou-se que as concentrações das antocianinas extraídas e particionadas da casca do camu-camu via SAB, em relação às diferentes temperaturas, ocorreu um aumento na concentração de antocianinas destes ensaios realizados no pH 2 (Ensaio 1, 2, 5 e 6), tabela

10. Já para os ensaios realizados a pH 4,5 (Ensaio 3, 4, 7 e 8), foi observado um comportamento inverso, uma diminuição na concentração das antocianinas na fase superior com o aumento da temperatura. O que também pode ser observado na Figura 16 A.

De acordo com o teste de tukey pode-se observar que o ensaio 7, realizado na temperatura de 25 °C, ofereceu maior concentração das antocianinas na fase superior e o mesmo apresentou diferença significativa em relação a todos os demais ensaios.

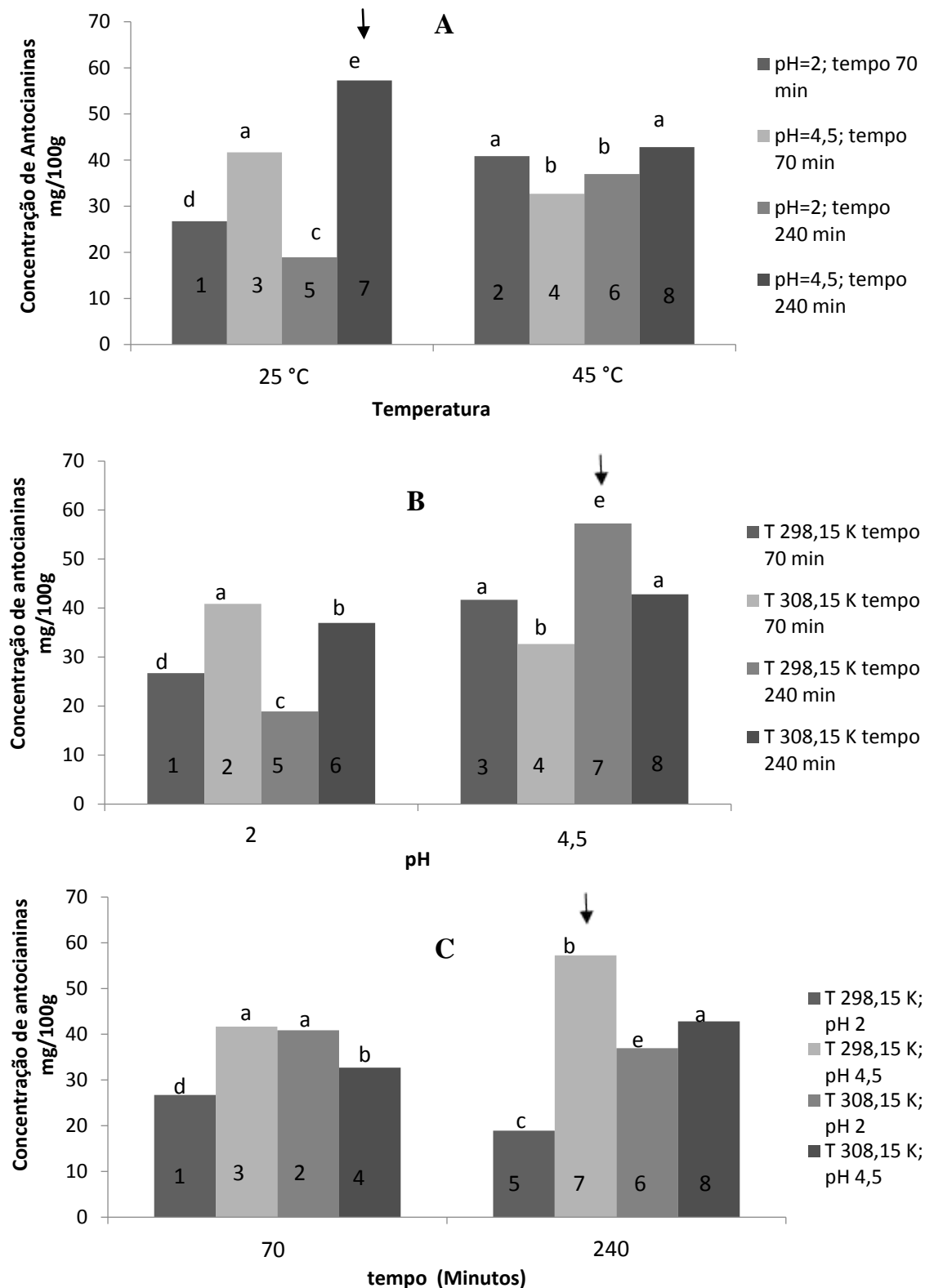
Em relação ao coeficiente de partição, em analogia à temperatura, tabela 10, foi possível observar que houve um aumento no coeficiente de partição para todos os ensaios com o aumento da temperatura. O ensaio que apresentou maior coeficiente de partição foi o ensaio 8, no entanto o mesmo não apresentou maior concentração na fase superior, como pode ser observado na Figura 17 A.

Através da quantificação da concentração das antocianinas na fase superior, Figura 16 B, foi possível observar que para todos os ensaios no pH 2 (Ensaio 1, 2, 5 e 6) e no pH 4,5 (3, 4, 7 e 8), houve diferença significativa entre todos os ensaios entre si.

Na Figura 16 B, em relação aos ensaios realizados em diferentes pH's, foi observado que ocorreu um aumento na concentração das antocianinas na fase superior para quase todos os testes com a elevação do pH de 2 para 4,5, exceto para os ensaios realizados na temperatura 308,15 K (45 °C) e 70 minutos, pois neste tempo houve redução na concentração de antocianinas com a elevação do pH (Ensaio 2 e 4).

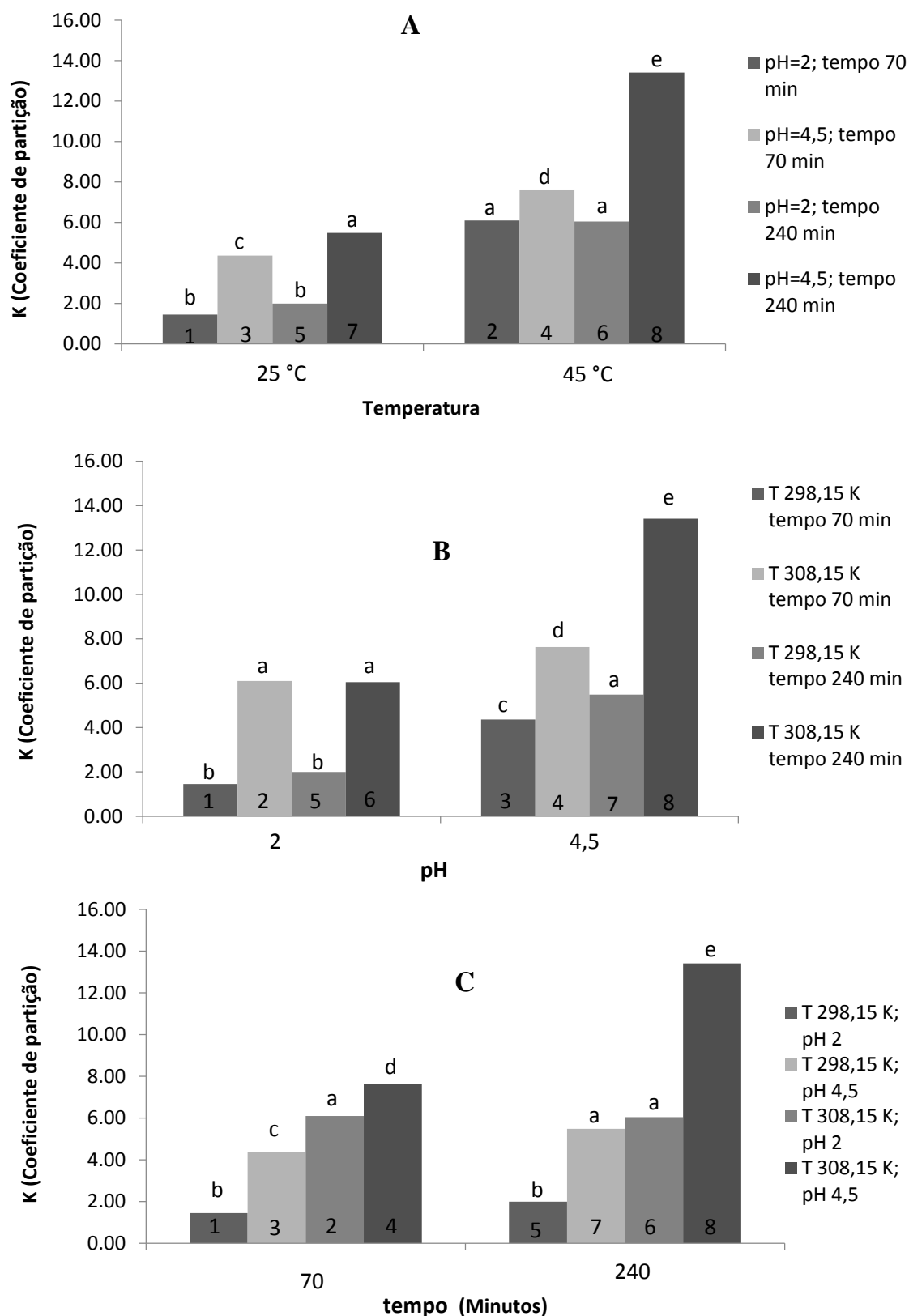
Apesar do ensaio 7 apresentar um pH menos ácido, mostrou-se mais eficiente para o processo de extração, apresentando maior concentração de antocianinas na fase superior. O aumento na concentração de antocianinas na FS quando o pH é alterado de 2 para 4,5 também foi observado por Wu et al., 2011, onde o melhor pH para concentração de antocianinas da amoreira na FS por SAB, também foi o 4,5. Na Figura 17 B, observa-se que a elevação do pH de 2 para 4,5 provocou um acréscimo no coeficiente de partição para todos os ensaios.

A concentração das antocianinas na fase superior em relação ao tempo, Figura 16 C, apresentou um decréscimo na concentração das antocianinas na FS para os diferentes tempos de partição quando o pH dos ensaios foram iguais a 2, ensaios (1 e 5) e (2 e 7), já nos pH's 4,5 ocorreu uma elevação na concentração de antocianinas com o aumento do tempo de partição ensaios (3 e 7) e (4 e 8).



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

Figura 16. Influência de temperatura (A), pH (B) e tempo na concentração de antocianinas (C) na fase superior extraídas da casca do camu-camu via SAB



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

Figura 17. Influência de temperatura (A), pH (B) e tempo no coeficiente de partição (K) das antocianinas (C) da casca do camu-camu via SAB

O coeficiente de partição em relação ao tempo dos ensaios, Figura 17 C, apresentou aumento para todos os ensaios com a elevação do tempo de partição de 70 para 240 minutos. Após a determinação do melhor ensaio (ensaio 7) LE 2, este foi reproduzido para posteriores análises de Vitamina C e Compostos fenólicos totais.

5.4.3.1 Quantificação de vitamina C

Foi realizada a quantificação de Vitamina C nas duas fases do sistema do LE 2, tabela 12, e foi observado que a vitamina C se concentrou na FI, o que evidencia a partição das antocianinas presentes na FS uma vez que a mesma é um dos fatores que podem afetar a estabilidade das antocianinas (FENNEMA, 2010).

Tabela 12. Quantificação de vitamina C na FS, FI e coeficiente de partição LE 2, da casca do camu-camu via SAB

LE 2	Vitamina C (g/100g)	K
FS	0,7765±1,19	0,60±0,055
FI	1,2659±3,34	

Diante dos resultados foi possível observar que o SAB, é eficiente para concentração de antocianinas na fase superior e a concentração da vitamina C na FI, o que é de grande importância uma vez a vitamina C acelera o processo de degradação das antocianinas. Logo o SAB se mostra como uma proposta de purificação de antocianinas na FS com uma maior estabilidade, devido a este resultados encontrados nesta pesquisa.

5.4.3.2 Compostos fenólicos totais

Na Tabela 13, são apresentados os teores de compostos fenólicos totais (mg AGE/100g) na LE 2 (Ensaio 7).

Tabela 13. Quantificação de Compostos fenólicos totais na LE 2, na partição casca do camu-camu via SAB

Compostos fenólicos totais (mg AGE/100g)	
FS	125,97

O teor de compostos fenólicos totais da FS apresentou valor semelhante a um dos genótipos estudados por (SOUZA, 2014), ao avaliar os compostos fenólicos totais da casca do camu-camu, com valores de 585,57, 236,67 e 127,45 (mg AGE/100g) para três diferentes genótipos, os resultados encontrados nesta pesquisa se assemelham a resultado encontrado para o genótipo 44.

Devido aos resultados encontrados nesta pesquisa, o SAB se mostra como uma alternativa de purificação de antocianinas, após a purificação das antocianinas o polímero pode ser eliminado do sistema conforme metodologia proposta por (JAMPANI, 2015) ou ainda pode ser realizada a microencapsulação da FS do sistema, como proposto por Amin et al. (2017), que encapsulou antocianinas com a utilização de PEG 2000 e observou que com a utilização do PEG na microincapsulação, as antocianinas apresentaram um maior tempo de estabilidade que as antocianinas que estavam em solução, segundo o autor em conclusão o método apresentou significância nos seus resultados.

6 CONCLUSÃO

Dados experimentais de equilíbrio líquido-líquido dos sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG1500+sulfato de sódio+ água, foram determinados nas temperaturas de 25 e 45°C, usando técnica turbidimétrica para a obtenção da curva binodal, curva de calibração e balanço de massa para determinação da composição das fases. Os ajustes das equações empíricas de Othmer & Tobias e de Hand nos dados experimentais, apresentaram-se lineares, tornando as respostas confiáveis.

Constatou-se que o efeito da temperatura sobre os sistemas não apresentou grandes variações na região bifásica. Os sistemas aquosos bifásicos podem ser uma alternativa para a extração e partição das antocianinas presentes na casca de camu-camu, uma vez que as moléculas de antocianina particionam preferencialmente para fase superior, rica polímero. observou-se que a linha de amarração LE 1 que apresenta a maior ILA e menor CLA foi a linha de amarração que apresentou maior concentração de antocianinas na FS.

Através dos ensaios realizados constatou-se que o Ensaio 07 (com tempo de 240 minutos, pH 4,5 e temperatura de 25 °C) foi o ensaio que apresentou maior concentração de antocianinas na FS do sistema, apresentando diferença estatística a todos os demais avaliados.

Foram realizadas análise de compostos fenólicos totais na LE 2 e se observou que a FS da mesma apresenta um elevado teor de compostos fenólicos totais e ainda que o contudo de vitamina C também é particionado no sistema, onde este se concentra na FI (Rica em sal), o que evidência e enfatiza o método de extração e purificação via SAB, uma vez que a Vitamina C se concentrou na FI e as antocianinas na FS.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES:																									
Atividade/Mês	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cumprimento das disciplinas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X														
Obtenção da curva binodal e dados de equilíbrio do SAB													X	X	X	X		X	X						
Extração das buimoléculas via SAB																X	X	X	X	X	X				
Elaboração dos artigos																				X	X	X	X		
Entrega da Dissertação II											X														
Entrega da Dissertação III																			X						
Entrega da Dissertação IV																									X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D.; e HATTON, T. A. Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Polymer Systems 4 Proteins in Solutions of Entangled Polymers. **Macromolecules**. v. 25, p. 5192-5200, 1992
- AKTER, S.; OH, S.; EUN, J.B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International** 44, 1728-1732, 2011.
- ALBERTSSON, P. A. Fractionation of particles and macromolecules in aqueous two-phase systems. **Biochemical Pharmacology**. v. 5, p. 351-358, 1961.
- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell and macromolecules**. New York: John Wiley, 1986.
- ÁLVAREZ, M. S.; ESPERANÇA, J. M.S.S.; DEIVE, F. J.; SANROMÁN, M. Á.; RODRÍGUEZ, A. A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. **Separation and Purification Technology**. v. 153, p. 91-98, 2015.
- ANANGA, A.; GEORGIEV, V.; OCHIENG, J.; PHILLS, B.; TSOLOVA, V. **Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries**. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/54592>
- AZEVEDO, J.; FERNANDES, I.; FARIA, A.; OLIVEIRA, J.; FERNANDEZ, A.; FREITAS, V. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. **Food Chemistry**, v. 119, p. 518-523, 2010.
- AZEVÊDO, J. C. S.; FUJITA, A.; OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. Dried camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) industrial residue: A bioactive-rich Amazonian powder with functional attributes. **Food Research International**. v. 62, p. 934-940, 2014.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potencial uses. **Journal Food Chem**. v. 99, p. 191-203, 2006.
- BALDEÓN, E. O.; ALCANIZ, M.; MASOT, R.; FUENTES, E. M.; BARAT, J. M.; GRAU, R. Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. **Journal Food Control**, v. 54, p. 181-187, 2015.
- BARBOSA, A. A. **Obtenção de dados de equilíbrio de sistemas aquosos formados por peg, sulfato e água e partição de antocianina do Jamelão**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.
- BARROS, K. V. G. **Sistema de duas fases aquosas napa/peg aplicado na purificação de proteases produzidas por fungos filamentosos**. Tese (Doutorado em ciências farmacêuticas). Universidade de Brasília, 2014.

BRASIL. Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, coadjuvantes de tecnologia, estabelecendo suas funções e limites, e veículos para suplementos vitamínicos e ou minerais. Resolução RDC nº24, de 15 de fevereiro de 2005. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União. Brasília, 16 de fevereiro de 2005.

BRITO, G. M. **Termodinâmica de partição do ânion $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos.** Dissertação (Mestrado). Universidade federal de Viçosa, 2007.

CAMARA, A. K.; LESNEFSKY, E. J.; STOWE, D. F. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, p. 280-388. 2010.

CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P e FERREIRA, I. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.13, p 377-399 ,2014.

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

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. H.; RODRÍGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CHIOU A.; PANAGOPOULOU, E.A.; GATZALI, F.; MARCHI, S.D.; KARATHANOS, V.T. Anthocyanins content and antioxidant capacity of Corinthian currants (*Vitis vinifera* L., var. Apyrena). **Food Chemistry**, v. 146, p. 157–165, 2014.

CHIRINOS, R.; GALARZA, J.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1019-1024, 2010.

CHISTÉ, R. C.; LOPES, A. S.; FARIA, L. J. G. Thermal and light degradation kinetics of anthocyanin extracts from mangosteen peel (*Garcinia mangostana* L.). **Journal of Food Science and Technology**. v. 45, p. 1902–190, 2010.

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

DE ROSSO, V. V. & MERCADANTE, A. Z. The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola. **Food Chemistry**. v. 103, p. 935-943, 2007.

DHADGE, V. L.; ROSA, S. A. S. L.; AZEVEDO, A.; AIRES-BARROS, R.; ROQUE, A. C.A. Magnetic aqueous two phase fishing: a hybrid process technology for antibody purification. **Journal of chromatography A**. v. 1339, p. 59-64, 2014.

DONG-YANG, Z.; YUAN-GANG, Z.; YU-JIE, F. WEI.; W.;, ZHANG, L.; LUO, M.; MU, F.; YAO, X.; DUAN, M. extração aquosa em duas fases e enriquecimento de dois

flavonóides principais a partir de raízes de guandu e a atividade antioxidante. **Journal Separation and Purification Technology**. v. 102, p. 26-33, 2013.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-361, 2007.

FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FERREIRA, J. F. **Caracterização e purificação da enzima bromelina em sistema de duas fases aquosas peg/fosfato**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, 2007.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; BARBERÁN, F. T. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Journal Food Chemistry**, v. 139 p. 578-588, 2013.

FUJITA, A.; BORGES, K.; CORREIA, R.; FRANCO, B.D.G.M.; GENOVESE, M.I. Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). **Food Research International**. V. 54, n. 1, p. 495-500, 2013.

FUJITA, A.; SARKAR, D.; WU, S.; KENNELLY, E.; SHETTY, K.; GENOVESE, M. I. Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation **Food Research International**. V. 77 , p. 194-203, 2015.

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

GAWLIK-DZIKI , U.; JEŻYNA, M.; ŚWIECA, M.; DZIKI, D.; BARANIAK, B.; CZYŻ, J. Effect of bioaccessibility of phenolic compounds on in vitro anticancer activity of broccoli sprouts. **Journal Food Research International**. v. 49, p.469-476, 2012.

GENOVESE, M. I.; SILVA, M. P.; SOUZA, A. E.; Y LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits commercial frozen pulps from Brazil. **Food Sci. Techn**. v.14, p.207 – 214, 2008.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005.

GONÇALVES, A. E. S. S.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666-4674, 2010.

GONÇALVES, A. E. S. S.; SANTOS, C. L.; CURI, R.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Frozen pulp extracts of camu-camu(*Myrciaria dubia* McVaugh) attenuate the hyperlipidemia

and lipid peroxidation of Type 1 diabetic rats. **Journal Food Research International**, v. 64, p.1-8, 2014.

GURGEL F. L.; GURGEL, R. S.; NASCIMENTO, W. M. O.; SOARES, A. C. S. Localização geográfica de acessos do banco ativo de germoplasma de camucamuzeiro (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) da Embrapa Amazônia Oriental. **Anais XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR**, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 13 a 18 de abril de 2013.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: Natural Colorants with HealthPromoting Properties. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** v.1, p.163–187, 2010.

HEDREN, E., DIAZ, V., & SVANBERG, U. Estimation of carotenoids accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 425-430, 2002.

HOSBINO, A. A.; PALARIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, G. R. GIMENES, M. A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, n. 29, p. 146-150, 2002.

HUSSEIN, M. A.; ALMAGRIBI, W.; AL-RASHIDI, M. N. Antiradical and reductant activity of anthocyanidins and anthocyanins, structure-activity relationship and synthesis. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1275-1282. 2016.

JACKMAN, R.L.; SMITH, J.L. **Anthocyanins and betalains**. In: **HENDRY, G.A.F. and HOUGHTON, J.D.** Natural Food Colorants. London: Blackie Academic. p.183-241, 1992.

JAMPANI, C.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Differential partitioning for purification of anthocyanins from Brassica oleracea L. **Separation and Purification Technology**. v. 151, p. 57-65, 2015.

JOHANSSON, H. O.; FEITOSA, E. E PESSOA, A. J. Phase Diagrams of the Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol)/Sodium Polyacrylate/Salts, **Polymers** v. 3, p. 587-601, 2011.

KANESHIMA, T.; MYODA, T.; NAKATA, M.; FUJIMORI, T.; TOEDA, K.; NISHIZAWA, M. Antioxidant activity of C-Glycosidic ellagitannins from the seeds and peel of camu-camu (*Myrciaria dubia*), **Journal Food Science and Technology**, v. 69, p. 76-81, 2016.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables. The millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 703-725, 2001.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. **Anthocyanins—More Than Nature's Colours**. *Journal Biomed Biotechnol.* 239–240. (2004).

LIU, X.; UM, T.; SUN, H.; ZHANG, M.; CHEN, J. Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 141, p.3034–3041, 2013.

MA, T.; HU, N.; DING, C.; ZHANG, Q.; LI, W.; SUO, Y.; WANG, H.; BAI, B. *In vitro* and *in vivo* biological activity of anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. **Food Chemistry**, v. 194, p. 296-303. 2016.

MARTINS, M. C. P. **Partição de clorofilas betalaína utilizando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

MALTA, L. G.; TERRASO, E. P.; EBERLIN, M.; PASTORE, G. M.; LIU, R. H. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417-425. 2013.

MYODA, T.; FUJIMURA, S.; PARK, B.; NAGASHIMA, T.; NAKAGAWA, J.; NISHIZAWA, M. Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 8, n. 2, p. 304-307, 2010.

MOUKETTE, B. M.; ANATOLE, P. C.; BIAPA, C. P. N.; NJMOU, J. R.; NGOGANG, J. Y. Free radical quenching potential, protective properties against oxidative mediated ion toxicity and HPLC phenolic profile of a cameroonian spice: piper guineenses. **Toxicology Reports**. V. 2, p. 792-805, 2015.

NASCIMENTO, W. M. O.; GURGEL, F. L.; BHERING, L. L.; RIBEIRO, O. D. Pré-melhoramento do camucamuzeiro: estudo de parâmetros genéticos e dissimilaridade **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 61, n.4, p. 538-543, jul/ago, 2014.

NEVES, L. C., SILVA, V. X., PONTISC, J. A., FLACHD, A., ROBERTO, S. R. Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. **Journal Scientia Horticulturae**. v. 186, p. 223-220, 2015.

OTHMER, D. F.; TOBIAS, P. E. **Tie line correlation**. *Ind. Eng. Chem.*, v. 34, n. 6, p. 693-696, Jun. 1942.

PARADA, J., & AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n.2 , p.21-32, 2007.

PATIL, G; MADHUSUDHAN, M.C.; BABU, B. R.; RAGHAVARAO, K.M.S.; Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. **Chemical Engineering and Processing** 48 (2009).

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

PINEDO, R. A. **Estudo da estabilização da polpa de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) congelada visando a manutenção de ácido ascórbico e de antocianinas**. 2007. 180p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas.

PLAZA, M., POZZO, T., LIU, J., ARA, K. Z. G., TURNER, C., & KARLSSON, E. N. Substituent effects on *in vitro* antioxidant properties, stability, and solubility in flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 3321–3333, 2014.

QUENTAL, M. V.; CABAN, M.; PEREIRA, M. M.; STEPNOWSKI, P.;COUTINHO, J. A. P.; FREIRE, M. G. Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems. **Journal Biotechnology**, v. 10 p. 1466-1457, 2015.

RIBEIRO, S. I.; MOTA, M. G. C.; CORRÊA, M. L. P. Recomendações para o Cultivo do Camucamuzeiro no Estado do Pará. Embrapa Amazônia Oriental: **Circular Técnica 31**. Belém-PA. 9p., 2002.

REIS, I. A. O.; CAMPOS, A. F.; SANTOS, P. H. S.; SANTOS, S. B.; SOARES, C. M. F. e LIMA, Á. S. Potassium Phosphate Salts-Based Aqueous Two-Phase Systems Applied in the Extraction of Gallic Acid from Guava. **Separation Science and Technology**. v.50, p 520-528, 2015.

RODRIGUES, R. B.; MARX, F. Camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh]: a promising fruit from the Amazon Basin. **Nutrition**, v. 30, n. 9, p. 376-381, 2006.

RODRIGUES, R. B., MENEZES, H. C., CABRAL, L. M. C., DORNIER, M., RIOS, G. M., & REYNES, M. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu-camu juice (*Myrciaria dubia*). **Journal of Food Engineering**, 63, 97–102, 2004.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. In Current Protocols. **Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-11. 2001.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

RUFINO, M. D.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PEREZJIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; Y MANCINI FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits Brazil. *Food Chem*. v. 121, p.996 – 1002, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

SAXENA, M.; SAXENA, J.; PRADHAN, A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 16, p. 130-134, 2012.

SBRUZZI, D. **Análise da viabilidade econômica da purificação da bromelina das folhas de curauá em sistema bifásico aquoso peg/fosfato**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, 2010.

SELVAM, R.M., ATHINARAYANAN, G., NANTHINI, A.U.R., SINGH, A.J.A.R., KALIRAJAN, K., SELVAKUMAR, P.M. Extraction of natural dyes from *Curcuma longa*, *Trigonella foenum graecum* and *Nerium oleander*, plants and their application in antimicrobial fabric. **Industrial Crops and Products**. v.70, p 84-90, 2015.

SILVA, L. H. M. **Equilíbrio de fases em sistemas aquosos peg/fosfato de potássio**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 1994.

SYNTH. Disponível em: <http://lojasynth.com>, maio, 2017.

SOUZA, A. O. **Principais compostos Bioativos e capacidade antioxidante no epicarpo do camu-camu (*Myrciaria Dubia*) em Função da Maturação.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, 2012.

THOMAS-BARBERAN, F. A.; ANDRES-LACUEVA, C. Polyphenols and health: Current state and progress. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 8773-8775, 2012.
TUDOR, V.; MANOLE, C. G.; TEODORESCU, R.; ASANICA, A.; BARBULESCU, L. D. Analysis of some phenolic compounds and free radical scavenging activity of strawberry fruits during storage period. **Agroculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 157-164, 2015.

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

WANG, Y.; YAN, Y.; HU, S.; HAN, J.; XU, X. Phase Diagrams of Ammonium Sulfate + Ethanol/1-Propanol/2-Propanol + Water Aqueous Two-Phase Systems at 298.15 K and Correlation. **Journal of Chemical & Engineering** v. 55, p. 876-881, 2010.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S3, p. S48-S66, 2010.

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

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

YUYAMA, K. The camu-camu culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 335-690, 2011.

YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; YUYAMA, K.; LOPES, T.M.; FÁVARO, D.I.T.; BERGIL, P.C.P.; VASCONCELOS, M.B.A. Teores de elementos minerais em algumas populações de camu-camu **Acta Amazônia**, Manaus. V. 33, n. 4, p. 549-554, 2003.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P.; MERCADANTE, A. Z. Determination of Anthocyanins from Camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9531-9535, 2005.

ZANATTA, C. F.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid composition from the Brazilian tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1526-1532, 2007.

ANEXOS

Anexo 01. Datos de equilibrio para curva bimodal a 25 °C

W PEG	W sal	W H2O	W PEG	W sal	W H2O
0,5839	0,0054	0,4108	0,1636	0,0671	0,7693
0,5451	0,0067	0,4482	0,1505	0,0720	0,7775
0,5034	0,0086	0,4879	0,1391	0,0763	0,7846
0,4711	0,0110	0,5180	0,1220	0,0830	0,7950
0,4363	0,0135	0,5502	0,1055	0,0896	0,8049
0,4109	0,0159	0,5732	0,0912	0,0955	0,8133
0,3874	0,0182	0,5944	0,0680	0,1056	0,8264
0,3644	0,0210	0,6146	0,0483	0,1151	0,8366
0,3485	0,0231	0,6283	0,0375	0,1219	0,8407
0,3231	0,0271	0,6498	0,0233	0,1325	0,8443
0,3031	0,0304	0,6665	0,0167	0,1398	0,8434
0,2873	0,0334	0,6794	0,0094	0,1500	0,8406
0,2674	0,0376	0,6949	0,0069	0,1569	0,8362
0,2487	0,0418	0,7095	0,0056	0,1620	0,8324
0,2329	0,0457	0,7213	0,0042	0,1707	0,8251
0,2138	0,0510	0,7352	0,0033	0,1797	0,8169
0,1911	0,0578	0,7511	0,0025	0,1992	0,7983
0,1783	0,0620	0,7597	-	-	-

Anexo 02. Datos de equilibrio para curva bimodal a 45 °C

W PEG	W sal	W H2O	W PEG	W sal	W H2O
0,5806	0,0065	0,4130	0,1283	0,0755	0,7962
0,5359	0,0078	0,4563	0,1121	0,0808	0,8071
0,5107	0,0090	0,4803	0,0959	0,0863	0,8178
0,4909	0,0104	0,4987	0,0831	0,0908	0,8260
0,4672	0,0119	0,5208	0,0667	0,0972	0,8361
0,4341	0,0148	0,5511	0,0555	0,1020	0,8425
0,4079	0,0172	0,5749	0,0421	0,1085	0,8494
0,3831	0,0199	0,5970	0,0364	0,1120	0,8516
0,3618	0,0225	0,6157	0,0269	0,1184	0,8547
0,3393	0,0256	0,6351	0,0221	0,1231	0,8549
0,3123	0,0297	0,6580	0,0121	0,1340	0,8539
0,2826	0,0348	0,6826	0,0088	0,1434	0,8478
0,2645	0,0383	0,6971	0,0061	0,1495	0,8444
0,2489	0,0416	0,7095	0,0056	0,1620	0,8324
0,2257	0,0470	0,7273	0,0045	0,1560	0,8395
0,1995	0,0533	0,7471	0,0044	0,1712	0,8244
0,1727	0,0615	0,7658	0,0033	0,1797	0,8169
0,1595	0,0656	0,7749	0,0031	0,1992	0,7977