



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PALOMA LIRA PINTO**

**EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE FLAVONOIDES DO EXTRATO DA CASCA DO  
MARACUJÁ**

**FORTALEZA**

**2018**

PALOMA LIRA PINTO

EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE FLAVONOÍDES DO EXTRATO DA CASCA DO  
MARACUJÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva.  
Coorientador: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

P73e Pinto, Paloma Lira.  
Extração e separação de flavonoides do extrato da casca do maracujá / Paloma Lira  
Pinto. – 2018.  
57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior .

Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.

1. Sistema aquoso bifásico. 2. Subprodutos. 3. Passiflora edulis f. Flavicarpa. I. Título.

CDD 660

---

PALOMA LIRA PINTO

EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE FLAVONOÍDES DO EXTRATO DA CASCA DO  
MARACUJÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 30/01/2018

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Edy Sousa de Brito  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo  
Pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

A Deus.  
A minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me permitir passar por essa experiência de vida, que não foi fácil. Aprendi a lidar com situações novas, a rever pontos de vistas e a perceber que posso ir muito além da minha capacidade para conquistar meus objetivos.

A minha família, mãe Graça, irmã Camila e noivo Filipe, meu porto seguro, pelo encorajamento, apoio e acolhimento quando sempre precisei, fosse nas horas boas ou difíceis.

Ao prof. Dr. Ivanildo pela oportunidade de orientação, mesmo com a minha dificuldade de conciliar trabalho e estudo.

Ao Dr. Edy pela orientação e paciência, e por ter abertas as portas da EMBRAPA para o desenvolvimento da maior parte do meu trabalho, me proporcionando o convívio com profissionais maravilhosos e solidários, que me ajudaram a crescer tanto profissional como pessoalmente.

Ao professor Dr. Hosiberto Batista e ao Dr. Guilherme Zocolo participantes da banca pelas valiosas colaborações dadas de forma respeitosa e amistosa.

A todos os meus colegas de laboratório do LP1, da EMBRAPA e da Química que fizeram parte deste projeto, me ajudando seja com um conselho, seja tirando uma ou mil dúvidas ou metendo a mão na massa comigo, me doando um pouco (ou muito) do seu tempo para me ajudar. Todos foram essenciais, em especial Ana Cristina, Adriana Dutra, Alessandro Marinho, Carol Souza e Paula Luciana.

Aos meus amados colegas de trabalho por terem me incentivado sempre a dar continuidade a este projeto, vibrando comigo nas conquistas e me apoiando nas horas de angústia que não foram poucas.

E por último, aos meus amigos que participaram de forma indireta e que foram tão importantes quanto os citados anteriormente.

"O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos" (Lao-Tsé).

## RESUMO

A casca do maracujá é um subproduto da indústria alimentícia rico em flavonoides que possuem vários benefícios para a saúde, podendo ser extraídos utilizando-se várias metodologias, dentre elas, o Sistema Aquoso Bifásico, SAB. Trata-se de uma técnica eficiente de extração líquido-líquido que confere altos rendimentos preservando a atividade biológica dos compostos. Este trabalho objetivou separar os flavonoides da casca de maracujá (previamente extraídos por meio da extração por solvente pressurizado) utilizando-se o SAB constituído por etanol, solução salina e água. Avaliou-se a influência de dois tipos de sais, sulfato de amônio e fosfato de potássio, e a concentração componentes do SAB sobre a partição e a recuperação dos flavonoides. Inicialmente, variou-se a concentração de etanol fixando-se a concentração de sal. A variação de etanol foi de 26,5 a 32,19 %, fixando-se o sal em 18,5 %, no sistema Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e de 19,9 a 25,3 %, fixando-se a concentração de sal em 22,03 %, no sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Em seguida, variou-se a concentração de sal fixando-se a concentração de etanol. A variação de sal foi de 14,86 a 18,5 %, fixando-se o etanol em 30,14 % no sistema Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e de 18,10 a 26,09 %, fixando-se a concentração de etanol em 21,26 % no sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . As determinações analíticas realizadas foram: rendimento, pH, teor de polifenóis totais, açúcares totais e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O coeficiente de partição e a recuperação foram calculados. Em ambos os sistemas, a partição dos flavonoides foi superior a 70, e a dos açúcares variou entre 0,01 e 0,03. A recuperação dos flavonoides e dos açúcares esteve acima dos 99 % e 92 % no sistema Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e acima de 98% e 96% no sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , respectivamente. A elevação da concentração do etanol não influenciou significativamente a recuperação dos compostos. Já o acréscimo na concentração dos sais provocou um aumento na recuperação dos açúcares de 92,98 % para 97,25 % no sistema Etanol/  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , e de 96,7 % para 98,73 % no sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . O SAB mostrou-se eficaz para a separação dos flavonoides. Ambos os sais foram adequados para a separação, devendo-se atentar para o pH conferido ao meio. A casca de maracujá foi fonte de 12 diferentes tipos de flavonoides, sendo uma boa alternativa e de baixo custo para obtenção desses compostos bioativos.

**Palavras-chave:** Sistema aquoso bifásico. Subprodutos. *Passiflora edulis f. flavicarpa*.



## ABSTRACT

Passion fruit peel is a by-product of the flavonoid-rich food industry that has several health benefits, and can be extracted using several methodologies, including the aqueous two-phase system (ATPS). It is an efficient liquid-liquid extraction technique that confers high yields while preserving the biological activity of the compounds. This work aimed to separate flavonoids from passion fruit peel (previously extracted through pressurized solvent extraction) using ATPS consisting of ethanol, salt and water. The influence of the two types of salts, ammonium sulfate and potassium phosphate, and the concentration of ATPS components on the partition and recovery of flavonoids were evaluated. Initially, ethanol concentration was varied by setting the salt concentration. The ethanol variation was from 26.5 to 32.19%, with the salt being fixed in 18.5% in Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  system, and 19.9 to 25.3%, with the salt being fixed 22.03% in Ethanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  system. Thereafter, the salt concentration was varied by setting the ethanol concentration. The salt variation was from 14.86 to 18.5%, with the ethanol being set at 30.14% in ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  system, and 18.10 to 26.09%, with the ethanol being set at 21.26% in Ethanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  system. The analytical determinations were: yield, pH, total polyphenol content, total sugars and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Partition coefficient and recovery were calculated. In both systems, the partition of flavonoids was higher than 70, and that of sugars varied between 0.01 and 0.03. The recovery of flavonoids and sugars was above 99% and 92% in the Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  system, and above 98% and 96% in the Ethanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  system, respectively. The elevation of ethanol concentration did not significantly influence the recovery of the compounds. On the other hand, the increase in the concentration of salts caused an increase in the recovery of sugars from 92.98% to 97.25% in the Ethanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  system and from 96.7% to 98.73% in the Ethanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  system. ATPS was shown to be effective for the separation of flavonoids. Both salts were suitable for the separation, paying attention to the pH conferred to the system. The passionfruit peel was source of 12 different types of flavonoids, being a good and low cost alternative to obtain these bioactive compounds.

**Keywords:** Biphasic aqueous system. By-products. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Estrutura química básica dos flavonoides .....	16
Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (ROSS; KASUM, 2002) .....	17
Figura 3 - Curva binodal, onde T = composição da fase topo, F = composição da fase fundo, TCF = curva binodal, C = ponto crítico, TF = linha de amarração, e X, Y and Z = composição total do SAB. ....	23
Figura 4 - Extração em batelada .....	24
Figura 5 - Pó da casca de maracujá .....	29
Figura 6 - Extrato obtido no ESP com etanol e água na proporção 60:40 (v/v).....	31
Figura 7 - Fluxograma de separação dos flavonoides e dos açúcares por sistema aquoso bifásico formado por etanol, sal e água .....	32
Figura 8 - Sistema aquoso bifásico formado por Etanol/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (à direita) e Etanol/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (à esquerda) .....	41
Figura 9 - Cromatograma em BPI obtido no sistema UPLC-QTOF-MS em modo negativo (ESI-) do extrato da casca de maracujá das amostras de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> .....	43
Figura 10- Compostos 1 – 15 que foram tentativamente identificados no extrato das amostras em amostras de <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos realizados de extração com SAB de compostos fenólicos em diferentes matérias-primas alimentícias reportados na literatura .....	28
Tabela 2 - Rendimento da extração utilizando método ESP .....	36
Tabela 3 - Efeito da variação dos parâmetros de processo na recuperação de flavonoides e açúcares utilizando SAB formado por Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .	37
Tabela 4 - Efeito da variação dos parâmetros de processo na recuperação de flavonoides e açúcares utilizando Sab formado por Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....	38
Tabela 5 - Valores de pH das fases aquosas dos SAB a 25°C .....	41
Tabela 6 - Compostos identificados na casca do maracujá .....	46
Tabela 7 - Composição de equilíbrio de fases para o sistema composto de etanol (1), sulfato de amônio (2) e água (3) a 25°C .....	57
Tabela 8 - Composição de equilíbrio de fases para o sistema composto de etanol (1), fosfato de potássio (2) e água (3) a 25°C.....	57

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Maracujá .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Compostos bioativos .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Compostos fenólicos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1</b>	<b><i>Flavonoides.....</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b>2.4</b>	<b>Aproveitamento de subprodutos agroindustriais .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Sistema aquoso bifásico (SAB).....</b>	<b>20</b>
<b>2.5.1</b>	<b><i>Sistema aquoso bifásico formado por álcoois de cadeia curta .....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b>2.5.2</b>	<b><i>Mecanismo de separação de fases no sistema formado por álcool, sal e água. ....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b>2.5.3</b>	<b><i>Sistema aquoso bifásico e suas propriedades.....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b>2.5.4</b>	<b><i>Extração em batelada.....</i></b>	<b><i>24</i></b>
<b>2.5.5</b>	<b><i>Parâmetros do sistema e do processo que influenciam na partição do soluto.....</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b>2.5.5.1</b>	<b><i>pH.....</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b>2.5.5.2</b>	<b><i>Tensão interfacial .....</i></b>	<b><i>26</i></b>
<b>2.5.5.3</b>	<b><i>Temperatura .....</i></b>	<b><i>26</i></b>
<b>2.5.5.4</b>	<b><i>Razão de volume.....</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b>2.5.5.5</b>	<b><i>Massa de soluto .....</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b>2.5.6</b>	<b><i>Aplicação do SAB formado por álcoois e sal .....</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta e preparo das cascas para extração .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Etapas do estudo.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Condição da extração dos compostos bioativos .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Condição da separação de polifenóis e açúcares por sistema aquoso bifásico .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Coeficiente de partição dos flavonoides e dos açúcares .....</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Recuperação dos flavonoides e dos açúcares .....</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b>3.4.3</b>	<b><i>Razão Volumétrica .....</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b>3.5</b>	<b>Métodos analíticos .....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Rendimento.....</i></b>	<b><i>33</i></b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>pH.....</i></b>	<b><i>34</i></b>

3.5.3	<i>Polifenóis totais</i> .....	34
3.5.4	<i>Açúcares Totais</i> .....	34
3.5.5	<i>Cromatografia líquida e espectrometria de massas</i> .....	34
3.6	<i>Análise Estatística</i> .....	35
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1	<b>Rendimento dos flavonoides</b> .....	36
4.2	<b>Separação de flavonoides e açúcares pelo SAB</b> .....	36
4.2.1	<i>Influência do tipo de sal no comportamento de partição dos flavonoides e dos açúcares</i> .....	36
4.2.2	<i>Efeito da variação na concentração do etanol no SAB</i> .....	38
4.2.3	<i>Efeito da variação da concentração do sal no SAB</i> .....	39
4.2.4	<i>Efeito do pH do sistema</i> .....	40
4.3	<b>Cromatografia líquida e espectrometria de massas</b> .....	42
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
	<b>ANEXO A - COMPOSIÇÃO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA OS SISTEMAS SULFATO DE AMÔNIO E FOSFATO DE POTÁSSIO</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo o IBGE, em 2016 foram produzidas 703.489 toneladas de maracujá, o que torna o Brasil o maior produtor e consumidor de maracujá no mundo, responsável por 60 % da produção mundial (OLIVEIRA et al., 2016). O cultivo de maracujá possui as vantagens de poder ser feito durante o ano todo, gerar renda mensal ao agricultor, possuir mercados diversos e de haver possibilidades diferentes de agregar valor ao produto (FALEIRO; JUNQUEIRA, 2016).

O maracujá é uma fruta muito versátil, podendo-se aproveitar desde a polpa até a casca, evitando-se a geração de grandes quantidades de resíduos. A polpa é utilizada na fabricação de sucos, néctares, iogurtes, doces, geleias, dentre outros. Também é componente de pratos na culinária gourmet. A farinha da casca é utilizada na fabricação de pães, sorvetes e massas alimentícias como agente espessante. O extrato das folhas é utilizado na produção de fitoterápicos em razão de sua ação calmante. Já as sementes são aproveitadas na fabricação de cosméticos (FALEIRO; JUNQUEIRA 2016).

Cerca de 52 % da composição mássica do maracujá é composta de casca, que possui propriedades funcionais importantes e úteis para a fabricação de novos produtos (MEDINA, 1980). A casca do maracujá tem elevadas quantidades de fibras solúveis (pectina) além de flavonoides, que são metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, que possuem várias funções, dentre elas, citam-se: proteção contra raios ultravioletas e contra patógenos (VIGANÓ; MARTINEZ, 2015).

Estudos comprovam a ação benéfica dos flavonoides sobre a saúde, pois apresentam características antialérgicas, anticarcinogênicas, anti-inflamatória, hipoglicêmica ou antidiabetes, além da proteção cardiovascular, o que seria atribuído ao seu poder antioxidante, pois são capazes de eliminar os radicais livres e de quelar íons metálicos (JURASEKOVA et al., 2014).

Existem vários procedimentos para a extração destes compostos. A escolha do processo mais apropriado para o material deve ser feita cuidadosamente, pois suas características influenciam diretamente no rendimento e na bioatividade do extrato (BIESAGA, 2011).

O método mais comum é a extração sólido-líquido, na sua forma mais simples, a maceração. Porém, esta metodologia tem sido substituída por outras mais modernas, como extração assistida por ultrassom (EAU), extração assistida por micro-

ondas (EAM), extração por fluido supercrítico (EFS) e extração com líquido pressurizado (ELP), em que a extração é feita em menor tempo sem necessitar de grandes quantidades de solventes, podendo ser mais seletiva (CASTRO-LÓPEZ et al., 2017).

O Sistema Aquoso Bifásico é uma técnica de fracionamento líquido-líquido que vem sendo considerada como uma alternativa para a extração, separação, purificação e enriquecimento de biomoléculas em função de sua alta eficiência. É utilizado para a partição de vários tipos de moléculas, como proteínas, enzimas, vírus e aquelas de baixo peso molecular, como os flavonoides, o que o configura como uma técnica bastante versátil pelas suas diferentes possibilidades de emprego (IQBAL et al., 2016).

Dentre outras vantagens do SAB, pode-se citar a rapidez e a simplicidade do processo, dispensando o uso de equipamentos caros, a possibilidade de emprego de substâncias químicas menos tóxicas, como etanol e sais, sendo a maior parte constituída de água. Pode-se citar, também, a separação seletiva, emprego de baixas temperaturas, alto rendimento de recuperação, características estas bastante interessantes e importantes para a redução do impacto ambiental e dos custos da produção (IQBAL et al., 2016; RAJA et al., 2012).

Para a obtenção das melhores condições de separação dos compostos bioativos, os parâmetros do processo, como a concentração e a composição das fases devem ser estudados, pois possuem forte influência na eficácia do procedimento (BENAVIDES e RITO-PALOMARES, 2007).

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a separação dos flavonoides provenientes da casca de maracujá por meio da técnica de extração líquido-líquido utilizando-se o sistema aquoso bifásico formado por etanol e solução aquosa salina. Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar a partição dos flavonoides no sistema aquoso bifásico utilizando sulfato de amônio e fosfato de potássio;
- b) verificar o efeito da variação da concentração dos componentes das fases na partição e na recuperação dos flavonoides;
- c) identificar os compostos bioativos presente na casca de *Passiflora edulis flavicarpa*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Maracujá

O gênero *Passiflora* compreende cerca de 500 espécies, sendo a *Passifloraceae* a maior família, que é cultivada por ter uma fruta com valor ornamental, alimentício e por suas propriedades medicinais (PETRY et al., 2001).

Os maracujás pertencentes à família *Passifloraceae* com origem na América tropical, são extensamente cultivados e processados em todo mundo. No Brasil, a cultura do maracujá começou a ganhar importância econômica a partir da década de 1970 (ARAÚJO, 1980). O Brasil continua sendo o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, sendo que maior parte da produção se concentra nas regiões norte e nordeste, em razão das condições climáticas ideais ao cultivo que permite produção durante o ano todo (STEINBERG, 1988). A espécie *Passiflora edulis*, conhecido como maracujá-amarelo, é a única cultivada no Brasil para fins comerciais, ocupando 95 % dos pomares (MELETTI; SOARES-SCOTT; BERNACCI, 2005).

O maracujá é rico em vitaminas A e C, ácido fólico e minerais (WIJERATNAM, 2016) além de conter substâncias como polifenóis (ZERAİK et al., 2010) conferindo ação antioxidante, ácidos graxos poli-insaturados (KOBORI; JORGE, 2005), fibras (CÓRDOVA et al., 2005), dentre outras. Zucolotto e colaboradores (2012) em seus estudos encontraram flavonoides C-glicosídeos em quantidade majoritária nas folhas e no pericarpo de *P. alata*, *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. tripartita* var. *molíssima* e *P. edulis* var. *Edulis*. Gomes e colaboradores (2017) identificaram os flavonoides isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina e rutina em 17 espécies de *Passiflora*, dentre elas a *P. edulis* f. *flavicarpa*.

### 2.2 Compostos bioativos

Compostos bioativos são definidos como compostos essenciais e não essenciais encontrados na natureza que podem apresentar efeitos sobre a saúde humana (BIESALSKI et al., 2009).

Alguns alimentos são considerados funcionais em razão de conter esses compostos bioativos. Alimentos funcionais são qualquer alimento ou ingrediente de



alimento que fornece benefícios à saúde além dos nutrientes tradicionais que ele contém (SINHA et al., 2010).

Inúmeros compostos bioativos, também denominados fitoquímicos, têm sido identificados em alimentos de origem vegetal. Alguns tipos de fitoquímicos parecem apresentar possíveis efeitos à saúde, são eles: carotenoides, compostos fenólicos, como flavonoides, compostos organosulfurados, entre outros. Evidências comprovam que é possível se reduzir o risco de doenças degenerativas com a ingestão de alimentos vegetais (BIESALSKI et al., 2009).

### **2.3 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários (VALLS et al., 2009). Eles são responsáveis por grande parte das características sensoriais dos alimentos vegetais e bebidas, especialmente propriedades que conferem cor e sabor, além de contribuírem para sua qualidade nutricional (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE et al., 2008).

Os polifenóis são representados por mais de 8.000 compostos com estrutura divergente, porém, cada um apresenta, pelo menos, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila. São divididos em 10 classes, dependendo da sua estrutura química de base (GARCIA-SALAS et al., 2010). Os ácidos fenólicos (ácidos benzoico e cinâmico) e os flavonoides, 30 e 60 % do total, respectivamente, constituem as classes de polifenóis mais abundantes na dieta (ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

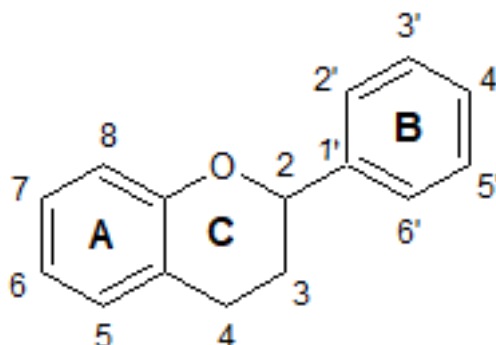
Embora o interesse mais comum nesses compostos esteja em torno das propriedades sensoriais, como cor e sabor, o seu valor nutricional vem se tornando o foco nas últimas décadas em razão da ação de seus efeitos benéficos sobre a saúde, como a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como cânceres, úlceras e trombozes. Estas propriedades estão sendo aplicadas na fabricação de cosméticos, medicamentos, produtos farmacêuticos, suplementos nutricionais e alimentos funcionais (VALLS et al., 2009).

### 2.3.1 Flavonoides

Há mais de um século, os flavonoides têm sido conhecidos como pigmentos vegetais (ROSS; KASUM, 2002) encontrados em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho (KUHNAU, 1976), que auxiliam nas funções de crescimento, desenvolvimento e defesa dos vegetais contra patógenos (DORNAS et al., 2007). Uma variedade de mais de 8.000 mil destes compostos já foi identificada (FALCONE; RIOS; CASATI, 2012).

O termo “flavonoide” é dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo-pirona (HAVSTEEN, 2002). A sua estrutura química consiste em dois anéis fenil (A e B) ligados por um anel pirano (C), como pode ser visto na Figura 1. Aqueles que apresentam um grupo hidroxila na posição C-3 do anel C são classificados como 3-hydroxiflavonoides; e aqueles que não possuem, são classificados como 3-desoxiflavonoides (ERLUND, 2004).

Figura 1 - Estrutura química básica dos flavonoides

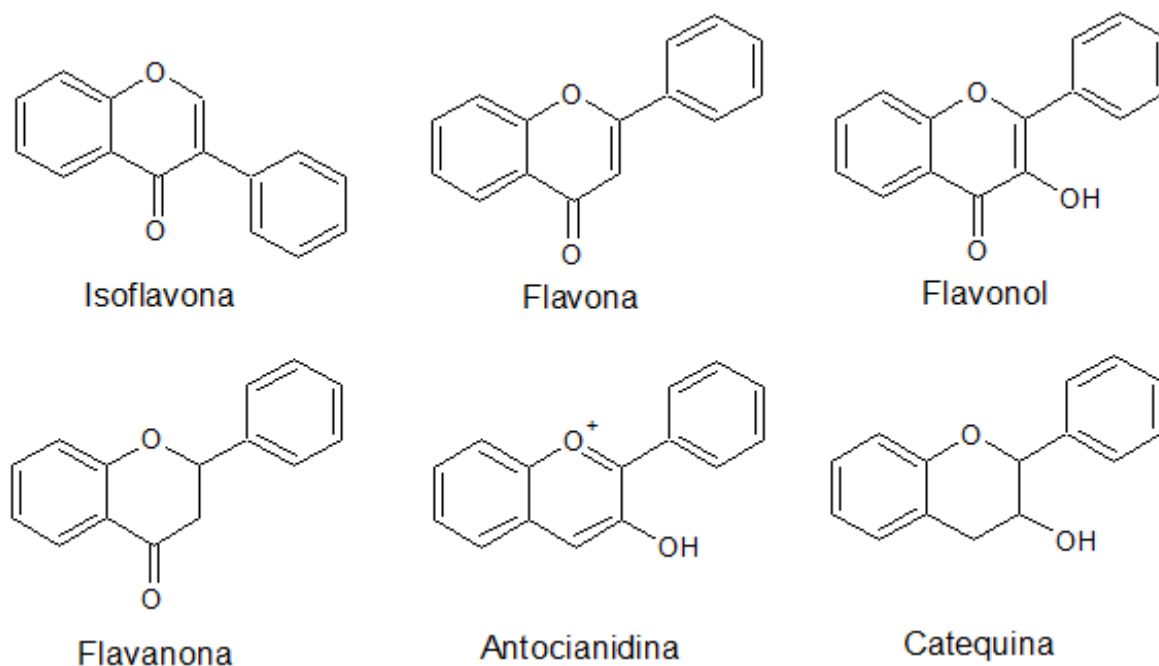


Fonte: Autora (2017)

Os flavonoides são subdivididos em seis subclasses principais que diferem entre si em função das variações no anel C-heterocíclico, são elas: flavonas,

flavanonas, flavonóis, catequinas, antocianidinas e isoflavonas. (ROSS; KASUM, 2002). Tais estruturas podem ser vistas na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (ROSS; KASUM, 2002)



Fonte: adaptada de ROSS e KASUM (2017)

Os flavonoides podem ser encontrados em plantas na forma de agliconas, contribuindo para características como a cor (azul, carmesim, laranja) de frutas, flores e folhas, mas geralmente são encontrados na forma de glicosídeos, (GARCIA-SALAS et al., 2010). Os flavonoides encontrados em espécies de *Passiflora* são principalmente do tipo C-glicosídeos, nos quais os açúcares apresentam pouca diversificação, sendo o principal a glucose, e estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono resistente à hidrólise, apenas nas posições 6 e 8 do núcleo dos flavonoides (ZERAIK et al., 2010). O maior interesse nestes compostos reside no fato de possuírem efeitos biológicos. O primeiro registro destas atividades biológicas foi feito em 1936 por Rusznyak & Szent-Gyorgyi (ROSS; KASUM, 2002). Pesquisas mostraram que a ingestão de flavonoides tem correlação inversa à mortalidade em razão de doenças cardíacas coronarianas (KNEKT et al., 1996) efeito este que foi reforçado por estudos epidemiológicos subsequentes (GROOT; RAUEN, 1998).

Outras propriedades como a eliminação de radicais livres, a modulação da atividade enzimática, a inibição de proliferação celular, os efeitos antibióticos, antialérgicos, antidiarreicos, anti-ulcerativos e anti-inflamatórios foram observadas *in vitro* (BRAVO, 1998). Algumas atividades farmacológicas são atribuídas aos flavonoides vitexina e isovitexina, como hipotensiva, anti-inflamatória, antiespasmódica, antimicrobiana e antioxidante (HE et al., 2016).

O flavonoide rutina tem sido associado à melhoria dos sintomas das doenças hemorrágicas e de hipertensão, aumentando a permeabilidades e a resistência dos vasos sanguíneos e linfáticos (PATHAK et al., 1991). Também possui efeitos benéficos no tratamento de artrite causada por *C. albicans* (HAN, 2009).

Estudos mostraram que a mistura dos flavonoides orientina, rutina, quercetina e caempferol inibiu completamente o vírus responsável pelo herpes simples tipo 2 (LAM et al., 2016), mostrando a atividade antiviral destes compostos. Ali e Dixit (2012) em seu trabalho utilizaram a combinação de orientina e vicenina para verificar seu efeito antimicrobiano e evidenciaram uma inibição do crescimento das bactérias, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus*.

A luteolina, que possui uma estrutura essencial para a atividade antioxidante dos flavonoides, tem atividades anticâncer pela indução do apoptose e da inibição da proliferação celular, metástase e angiogênese (LIN et al., 2008).

## **2.4 Aproveitamento de subprodutos agroindustriais**

Toneladas de resíduos de atividades agroindustriais são geradas em todo mundo (LAROZE; ZUÑIGA-HANSEN, 2007). Em 2013, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) publicou um estudo no qual revelou que, anualmente, um terço de todo alimento produzido para o consumo humano no mundo é perdido ou desperdiçado, sendo que mais da metade desse desperdício (54 %) dar-se-ia na fase inicial da produção, manipulação pós-colheita e armazenagem, enquanto que os restantes 46 % ocorreriam nas etapas de processamento, distribuição e consumo. Os impactos da perda e do desperdício de alimentos sobre os recursos naturais também foram evidenciados: o consumo de água associado aos alimentos produzidos que não foram consumidos é de, anualmente, 350 km<sup>3</sup> (volume este equivalente ao fluxo anual do rio Volga na Rússia), além de serem responsáveis pela

emissão de 3,3 bilhões de toneladas de gases de efeito estufa na atmosfera do planeta (FAO, 2013).

Os dados também mostraram que as frutas são responsáveis por 18 % da pegada hídrica, perdendo apenas para os cereais. O maior desperdício de água foi observado nos continentes asiático, europeu e latinoamericano (FAO, 2013). Em razão disto, nos últimos anos, tem-se direcionado grandes esforços no sentido de minimização e reaproveitamento dos resíduos sólidos.

Os resíduos de frutas, formados em sua maioria por casca e caroço são fontes de diversas substâncias valiosas, como proteínas, enzimas e óleos essenciais (COELHO et al., 2001) e podem ser reutilizados em mercados secundários ou na produção de ração animal (FAO, 2013). Segundo Oliveira e colaboradores (2002), as cascas e sementes que são descartadas no processamento de suco de maracujá correspondem cerca de 65 a 70 % do peso do fruto, tornando-se um grande problema de resíduo industrial.

Esses subprodutos possuem quantidades consideráveis de compostos bioativos que podem ser recuperados (KAMMERER; KAMMERER; CARLE, 2014), como os compostos fenólicos, que possuem ação anticarcinogênica, antitrombótica, anti-inflamatória, antimicrobianas e antioxidantes, propriedades de interesse às indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos.

As cascas de maracujá (*P. edulis*) são ricas em pectinas e mucilagens, vitamina B3, cálcio e fósforo (CÓRDOVA et al., 2005). Em se tratando da indústria alimentícia, vários produtos têm sido desenvolvidos utilizando a farinha de maracujá, como biscoitos, cookies, cereais matinais, barras de cereais e doces em caldas. Ramos e colaboradores (2007) evidenciaram que a farinha de maracujá atua positivamente sobre o organismo humano, reduzindo os níveis de colesterol total e do colesterol LDL (*low density lipoprotein*).

Em um estudo clínico realizado com pessoas saudáveis que ingeriram farinha de maracujá (*P. edulis*) como suplemento de sua dieta, foi observado o mesmo efeito redutor da farinha sobre o colesterol total e LDL, correspondendo a uma redução média de 18 e 19 %, respectivamente, além da diminuição dos níveis de glicemia (5 %) e de triglicerídeos (15 %) (MEDEIROS et al., 2009).

Preparado de extrato de maracujá foi administrado para um grupo de pacientes que sofriam de osteoartrose. Após 30 dias de uso, melhoras significativas foram observadas das funções físicas, e houve melhorias na rigidez e na dor após 60

dias de administração (FARID et al., 2010). Ichimura e colaboradores (2006) evidenciaram efeito vasodilatador dos polifenóis, mais precisamente a luteolina, presentes no extrato metanólico da casca da *P. edulis* em ratos hipertensos.

## 2.5 Sistema aquoso bifásico (SAB)

O sistema aquoso bifásico, SAB, é um tipo de extração líquido-líquido (ELL) que surge como mais uma alternativa para o enriquecimento de produtos naturais. Trata-se de um processo rápido e de baixo custo, no qual há a possibilidade de operação contínua e de emprego de menores quantidades de solventes orgânicos, diminuindo o impacto no meio ambiente (ZHANG et al., 2013).

O microbiologista Martinus Willem Beijerinck foi o primeiro a observar e a reportar, em 1896, a formação de sistema bifásico utilizando-se ágar, gelatina e água (LETCHER et al, 2015). Meio século após, Per-Åke Albertsson redescobriu o sistema e publicou estudos sobre a utilização do SAB para purificação de produtos biológicos (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

O SAB é formado quando compostos hidrofílicos são combinados sob uma dada concentração crítica, que resultam na formação de duas fases, tendo como principal componente a água (BENAVIDES et al., 2008). Esse sistema tem sido utilizado para extração, purificação e enriquecimento de proteínas (SUAREZ RUIZ et al., 2017), carboidratos (CHENG et al., 2017), antibióticos (SANTOS et al., 2011), ácidos nucleicos e DNA (MASHAYEKHI et al., 2009), fitoquímicos, como flavonoides (ZHANG et al., 2013), além de metais pesados (HAMTA; DEHGHANI, 2017).

Atualmente existem várias possibilidades de combinações de compostos para a formação deste sistema, dentre os quais podemos citar polímero-polímero (ex.: polietilenoglicol e dextrana), polímero e sal (ex.: fosfatos e sulfatos), álcool e sal (ex.: etanol, propanol) e líquido iônico (ex.: acetato de 1-butil-3-metilimidazólio) e um sal (MONTALVO-HERNÁNDEZ; RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2012).

Os mais comuns são formados por polímero-polímero e polímero-sal. Porém, SAB formado por polímeros apresentam certas limitações de uso em razão de sua alta viscosidade, o que dificulta na separação das fases, além da facilidade de emulsionar (LIU et al., 2013). Possuem também um alto custo e o mecanismo de separação das fases é pouco compreendido (WANG et al., 2009).

### **2.5.1 Sistema aquoso bifásico formado por álcoois de cadeia curta**

Características interessantes apresentadas por sistemas aquosos formados por álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol, e soluções salinas, tem os tornado uma alternativa ao uso de polímeros e líquidos iônicos.

Suas vantagens estão relacionadas à baixa viscosidade e facilidade de separação das fases (simplificando o procedimento), ao seu baixo custo (CHENG et al., 2017), ao reduzido consumo de energia, ao aumento no rendimento do produto pela facilidade de recuperação do produto de interesse (LIU et al., 2013) e à possibilidade de reciclagem da fase alcoólica (WANG et al., 2009).

O sistema álcool-sal inorgânico pode ser utilizado nos estudos de extração e separação de princípios ativos de produtos naturais tradicionais (LIU et al., 2013). O uso de etanol é recomendado para moléculas anfífilas como os compostos fenólicos (CISNEROS et al., 2004).

### **2.5.2 Mecanismo de separação de fases no sistema formado por álcool, sal e água.**

Para a compreensão do mecanismo de separação do SAB, é necessário entender as características físico-químicas dos componentes, bem como a relação que se estabelece entre os mesmos. A formação de duas fases no sistema composto por álcool, sal e água pode ser explicada em razão do efeito *salting out* produzido pelo sal. Esse efeito culmina na diminuição da solubilidade do álcool em razão das moléculas de água darem preferência aos íons dos sais (LIU et al., 2006).

Para a escolha dos componentes que irão constituir o sistema, deve-se levar em consideração a compatibilidade entre o sal e o álcool. Segundo Wang e colaboradores (2009), essa capacidade pode ser estimada através da teoria do volume de exclusão efetivo (VEE), que descreve a habilidade dos sais em promover o efeito *salting out*. Em seus estudos, o autor conclui que, quanto maior for este parâmetro, maior será a habilidade da separação de fases.

A capacidade de polarização dos solventes também é um fator importante para a formação do SAB. Trata-se da tendência de solubilização dos íons do sal. Seu valor é diretamente proporcional a essa capacidade de solubilização do sal. A

capacidade da água é maior que a dos solventes hidrofílicos, portanto, o sal terá maior afinidade pela água.

Mas não só a interação entre solvente e sal é importante, como também a interação entre as próprias moléculas do solvente. Através do ponto de ebulição dos álcoois pode-se estimar o grau das forças de interação que, no caso se dá pela força de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Quanto maior essa interação, maior a facilidade de exclusão do solvente orgânico da fase salina para a fase etanólica (WANG et al., 2009).

### ***2.5.3 Sistema aquoso bifásico e suas propriedades***

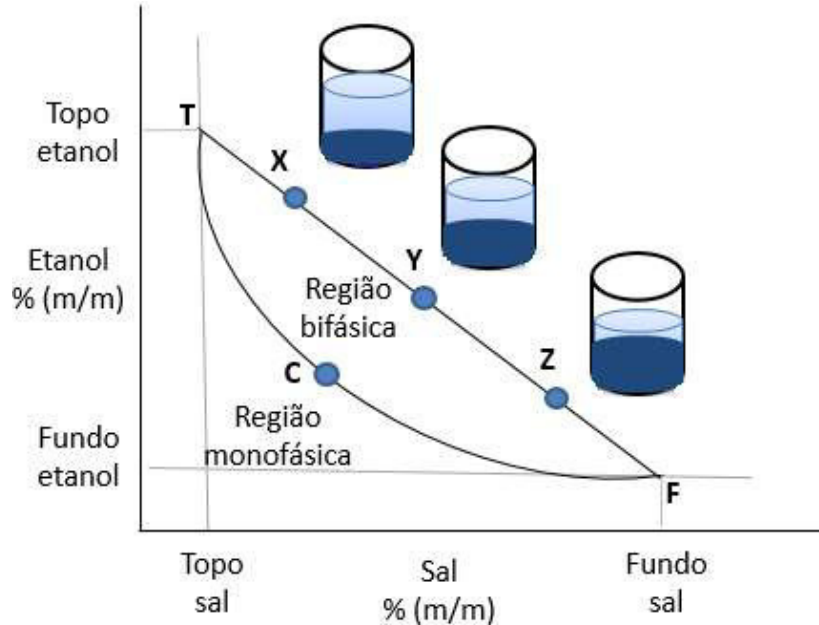
As fases líquidas resultantes de uma mistura eletrolítica ternária contêm os três componentes dessa mistura. As forças intermoleculares e iônicas, além das ligações de hidrogênio, determinam a composição das fases e afetam o equilíbrio termodinâmico (FENG et al., 2012).

Cada SAB possui um diagrama de fases específico, obtido sob condições operacionais de temperatura e pH, por exemplo (HATTI-KAUL, 2000). Esse diagrama fornece informações necessárias para se trabalhar com um sistema bifásico, como a concentração dos componentes necessária para a obtenção de um sistema de duas fases em equilíbrio, bem como a proporção de seus volumes (RAJA et al., 2012).

A curva binodal ou curva de equilíbrio (TCB) representada na Figura 3, separa a área de formação de duas fases (área acima da curva), da área de formação de uma fase (área abaixo da curva). Nela tem-se o ponto crítico (C), indicando que, acima deste ponto, o volume das duas fases é teoricamente igual. Os dados da curva binodal são utilizados tanto para a realização do processo de extração do SAB quanto para predição do particionamento das moléculas (IQBAL et al., 2016).



Figura 3 - Curva binodal, onde T = composição da fase topo, F = composição da fase fundo, TCF = curva binodal, C = ponto crítico, TF = linha de amarração, e X, Y and Z = composição total do SAB.



Fonte: Autora (2017)

A linha de amarração, ou *tie line*, também mostrada na Figura 3, conecta dois pontos na curva binodal (segmento de reta TF), que representam a concentração final dos componentes nas fases topo e fundo. Ao escolher sistemas ao longo da *tie line*, obtém-se sistemas com a mesma concentração final dos componentes de ambas as fases, porém com composições totais (X, Y e Z) e razão volumétrica diferentes (IQBAL et al., 2016).

No ponto crítico, o comprimento da linha de amarração (CLA) ou *tie line length (TLL)* é igual a zero. A unidade da CLA é a mesma das concentrações dos componentes e é calculada pela razão da massa conforme equação abaixo (IQBAL et al., 2016):

$$\frac{V_t \times \rho_t}{V_f \times \rho_f} = \frac{XF}{XT} \quad (1)$$

em que V é o volume e  $\rho$  a densidade do topo (t) e fundo (f), e XF e XT são os segmentos mostrados na Figura acima.

A CLA também pode ser obtida de forma mais precisa, de acordo com a equação abaixo (IQBAL et al., 2016):

$$CLA = \sqrt{\Delta X^2 + \Delta Y^2} \quad (2)$$

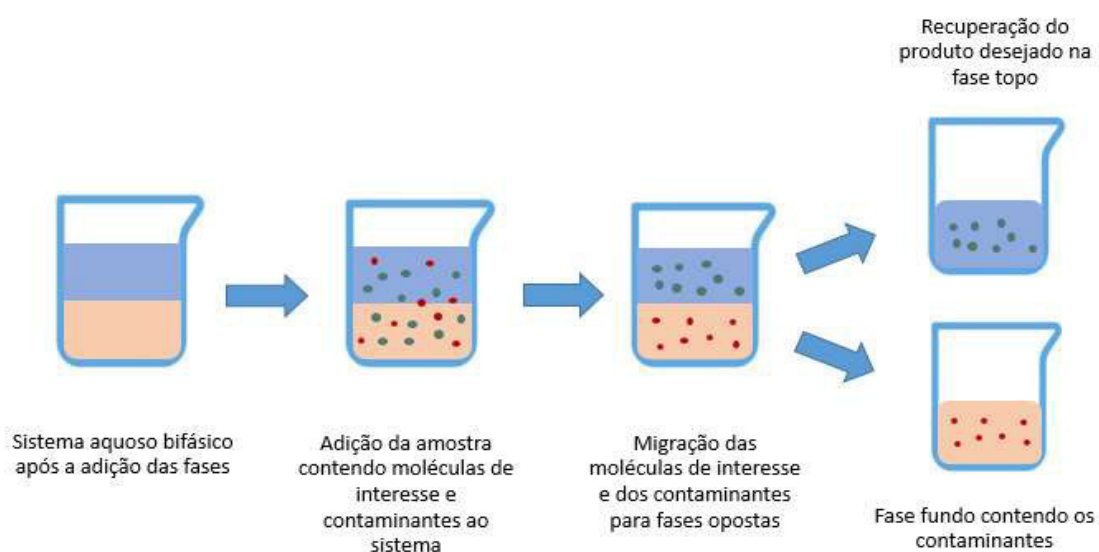
As propriedades intensivas termodinâmicas das duas fases são comumente expressas pela CLA. Quanto maior o seu valor, maior a incompatibilidade entre as fases e, portanto, maior a partição do soluto de interesse (DA SILVA et al., 2006).

#### 2.5.4 Extração em batelada

A extração em batelada trata-se de um sistema simples por ser constituído de apenas uma etapa, porém capaz de promover em alguns casos rendimentos acima dos 90 % na recuperação e na concentração do composto de interesse (RAJA et al., 2012).

Primeiramente, o sistema bifásico é preparado com os componentes escolhidos. Logo após, uma alíquota da amostra de interesse é adicionada ao sistema, que sofre agitação vigorosa, de forma a maximizar o contato entre as duas fases líquidas. A separação das fases poderá ocorrer em função do efeito da gravidade ou por centrifugação. O composto de interesse deverá ficar concentrado na fase com a qual possui maior afinidade, enquanto que os contaminantes deverão migrar para a outra (Figura 4). Isso dependerá da escolha correta das condições do sistema. A sua distribuição entre as fases depende da relação de equilíbrio do sistema (RAJA et al., 2012).

Figura 4 - Extração em batelada



Fonte: Autora (2017)

A eficiência de partição de um dado soluto é dada pelo coeficiente de partição (K), definido como sendo a razão entre a concentração do soluto A na fase topo ( $C_{at}$ ) sobre a sua concentração na fase fundo ( $C_{af}$ ) (IQBAL et al., 2016). Quanto maior a concentração do soluto na fase desejada, maior a eficiência do processo.

$$k = \frac{C_{at}}{C_{af}} \quad (3)$$

O fator de purificação ( $\delta_c$ ) também é utilizado para caracterizar a partição do composto de interesse. Este fator é definido como a razão da concentração do soluto A na fase desejada ( $C_{at}$ ;  $C_{af}$ ), pela sua concentração na amostra inicial ( $C_{ai}$ ) (RAJA et al., 2012).

$$\delta = \frac{C_{at}}{C_{ai}} \quad (\text{Partição do soluto para a fase topo}) \quad (4)$$

$$\delta = \frac{C_{af}}{C_{ai}} \quad (\text{Partição do soluto para a fase fundo}) \quad (5)$$

O rendimento da extração pode ser representado pela recuperação através da equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{tf} \times V_{tf}}{C_t V_t + C_f V_f} \times 100 \quad (6)$$

em que  $C_t$  é a concentração (mg/mL) mensurada do produto de interesse na fase topo ou fundo e  $V_{tf}$  é o volume da fase topo ou fundo (CHENG et al., 2017).

### **2.5.5 Parâmetros do sistema e do processo que influenciam na partição do soluto**

#### **2.5.5.1 pH**

O pH do sistema provoca alteração na carga do soluto ou na razão das moléculas carregadas, podendo, portanto, ser manipulado com o intuito de alterar a partição de biomoléculas.

. Biomoléculas como os flavonoides, por exemplo, tendem a ionizar quando se encontram em meio com pH maior ou menor que o seu pKa, que é em torno de 7 (REIS et al., 2014). Dependendo da carga que apresentarem, positiva ou negativa, terão maior afinidade por uma determinada fase. Contudo, assim como as moléculas-alvo, a afinidade eletroquímica dos contaminantes pode ser alterada com a variação

do pH, trazendo consequências indesejadas como sua migração para a fase de recuperação (BENAVIDES et al., 2008).

O coeficiente de partição de uma biomolécula varia exponencialmente com a diferença de potencial eletroquímico entre as fases e a carga da biomolécula particionada (GÜNDÜZ; KORKMAZ, 2000).

A composição das fases também muda quando se realiza variações no pH e na temperatura, e tal mudança culmina na expansão da área de formação de duas fases do sistema (RAJA et al., 2012).

#### *2.5.5.2 Tensão interfacial*

A tensão interfacial corresponde à energia livre de Gibbs por unidade de área na interface entre as fases. Possui um papel importante no sistema aquoso bifásico pois controla a partição das biomoléculas. O processo de separação das fases é beneficiado pelo aumento da tensão, porém, esse incremento provoca um efeito contrário na extração do soluto por dificultar a sua migração de uma fase para a outra, levando a sua precipitação na interface (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

A tensão interfacial varia de acordo com a temperatura, aumentando ou diminuindo, dependendo da distância entre a composição em que se está trabalhando e o ponto crítico (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

#### *2.5.5.3 Temperatura*

Variações na temperatura afetam tanto a partição, como as fases líquidas através da composição, da viscosidade e da densidade, estando estas duas últimas entre as principais forças motrizes para o estabelecimento de um sistema bifásico, sendo maiores à medida que se afastam curva binodal, ou seja, quanto mais adentram na região bifásica (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

As características da biomolécula com a qual se deseja trabalhar também devem ser levadas em consideração durante a escolha da temperatura. Aumentos na temperatura favorecem a extração de compostos fenólicos em razão do aumento do coeficiente de difusão e solubilidade desses compostos no solvente. Mas altas temperaturas interferem na capacidade antioxidante dos fenólicos, diminuindo-a, em razão da degradação destes compostos (CHEW et al., 2011).

#### *2.5.5.4 Razão de volume*

A razão dos volumes das fases é outro parâmetro a ser analisado pois quando  $V_r$  é maior que 1, há um aumento na recuperação de produtos com baixa massa molecular, apesar desse resultado nem sempre ser observado quando se trata de pureza (CABEZAS, 1996).

Esse efeito pode ser explicado pela afinidade relativa dos solutos (compostos de interesse e contaminantes) pelas fases e pelo volume livre disponível das fases (CABEZAS, 1996). Quanto maior for a diferença entre o volume livre das fases, maior o coeficiente de partição da molécula (EITEMAN; GAINER, 1989).

A redução do volume da fase de recuperação causa a concentração da molécula-alvo na mesma, levando a sua precipitação no momento em que se excede seus limites de solubilidade, concorrendo para a diminuição do rendimento (RITO-PALOMARES; HERNANDEZ, 1998).

#### *2.5.5.5 Massa de soluto*

A massa de soluto adicionado ao sistema (% m/m) em relação à massa total deve ser verificada, uma vez que utilizar quantidades muito grandes pode saturar a fase com a qual o soluto possui afinidade, influenciando na sua recuperação e pureza, já que com esta saturação, o soluto começa a migrar para a fase não desejada (BENAVIDES et al., 2008).

### ***2.5.6 Aplicação do SAB formado por álcoois e sal***

Estudos recentes sobre a aplicação de SAB utilizando-se etanol e sal na extração de compostos fenólicos de diferentes fontes vegetais, como raízes, folhas e frutos, têm sido realizados, e apresentaram rendimentos acima de 70 %. Na tabela abaixo são apresentados o tipo de matéria-prima, o composto fenólico de interesse, a faixa operacional, a composição do SAB escolhida, a concentração das fases e o rendimento obtido.

Tabela 1 - Estudos realizados de extração com SAB de compostos fenólicos em diferentes matérias-primas alimentícias reportados na literatura

<b>Matéria-prima</b>	<b>Molécula de interesse</b>	<b>Faixa operacional</b>	<b>Composição SAB (m/m)</b>	<b>Rendimento obtido (%)</b>	<b>Referência</b>
Raiz de ervilha	Ginisteína; apigenina	Etanol: 16-28 % Sal: 20-25 %	Etanol: 28 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 22 %	93,8 e 94	(ZHANG et al., 2013)
Crotalaria sessiliflora L*.	Vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina	Etanol: 25-35 % Sal: 15-24 %	Etanol: 32 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 22 %	94,14 a 105,5	(XIE et al., 2017)
Madressilva	Flavonas	Etanol: 28-36 % Sal: 4-5g	Etanol: 36 % NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 4,6 g	98	Liu et al., (2013)
Amora	Antocianinas	Etanol: 20-30% Sal: 12,5-20,5 %	Etanol: 30 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> : 20 %	85,1	(WU et al., 2011)
Açafrão	Crocina	Etanol: 14-17 % Sal: 23-26 %	Etanol: 19,8 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 16,5 %	79,27	Montalvo-Hernández; Rito-Palomares; Benavides (2012).

Fonte: Autora, 2017.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e preparo das cascas para extração

Para este estudo, foi utilizado o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) provenientes de cultivo orgânico no Fruitessence Frutas Orgânicas, localizado no município de Maracanaú – Ceará. Os frutos foram levados à planta piloto de processamento da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza – Ceará, onde foram higienizados e despulpados.

Em seguida, as cascas foram cortadas em tamanhos pequenos e colocadas em estufa de circulação de ar a 60 °C por 48 horas.

Logo após, as cascas foram moídas em moinho de facas tipo Willey, modelo BT 602 (Figura 5). Não foi realizada a separação no mesh. O material foi mantido em temperatura ambiente até o início das análises.

Figura 5 - Pó da casca de maracujá



Fonte: Autora (2017)

#### 3.2 Etapas do estudo

Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa consistiu na extração de compostos bioativos utilizando a técnica de Extração por Solvente Pressurizado, ESP. As extrações foram feitas para posterior aplicação do extrato no sistema aquoso bifásico. As determinações analíticas feitas nesta fase foram análise de rendimento em massa das extrações, teor de polifenóis totais, açúcares totais e

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para identificação dos compostos bioativos presentes no extrato.

Na segunda etapa foi feita a separação dos flavonoides e dos açúcares utilizando o sistema aquoso bifásico composto por etanol, água e sulfato de amônio ou fosfato de potássio. O objetivo foi analisar a partição e a recuperação dos flavonoides utilizando os diferentes sais.

Em seguida, variações na concentração de etanol e na concentração dos sais foram realizadas com intuito de verificar sua influência na partição e na recuperação dos flavonoides e dos açúcares. As composições testadas foram as seguintes:

- a) sistema formado por sulfato de amônio variando-se a concentração de etanol: SAB formado por 26,5 %, 28,1 %, 30,14 % e 32,19 % de etanol, fixando-se a concentração de sal;
- b) sistema formado por sulfato de amônio variando-se a concentração de sal: SAB formado por 14,86 %, 15,55 %, 16,0 %, 17,51 % e 18,5 % de sal, fixando-se a concentração de etanol;
- c) sistema formado por fosfato de potássio variando-se a concentração de etanol: SAB formado por 19,9 %, 21,26 %, 23,44 % e 25,3 % de etanol, fixando-se a concentração de sal;
- d) sistema formado por fosfato de potássio variando-se a concentração de sal: SAB formado por 18,10 %, 20,06 %, 22,01 %, 24,14 % e 26,09 % de sal, fixando-se a concentração de etanol.

A seleção das composições para o desenvolvimento deste trabalho baseou-se nas faixas mais exploradas na literatura. O teste com apenas quatro concentrações de etanol do sistema Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  é justificado pelo fato de a área onde há formação de duas fases no diagrama de fases ser pequena, não possibilitando, desta forma, a análise de um maior número de concentrações. O teste com o sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$  também foi feito com quatro concentrações. Procurou-se trabalhar com razões de volume próximas a 1 de forma a garantir volume suficiente de amostra para a realização das análises posteriores.

Nesta etapa foram realizadas as análises de teor de polifenóis totais, açúcares totais e cromatografia líquida e espectrometria de massas.



### 3.3 Condição da extração dos compostos bioativos

Para a extração dos compostos bioativos, utilizou-se a técnica de Extração com Solvente Pressurizado (ESP), na melhor condição de extração de flavonoides obtida por (DE SOUZA et al., 2017).

A técnica de ESP foi realizada em extrator automático – modelo ASE 350 Dionex. Inicialmente, pesou-se 15 g de amostra e misturou-se com 30g de terra diatomácea. A mistura foi posta em célula de extração de 66 mL. As condições de processo foram: pressão de 10,342-11,721 MPa; temperatura de 80 °C; rinse de 5 min; tempo de extração de 10 min em cada ciclo e purga de 200 s. Todas as extrações foram realizadas três vezes, gerando três ciclos de extrações para cada amostra de substâncias bioativas recuperadas. O extrato é mostrado na Figura 6. Logo após esse processo, as amostras obtidas foram evaporadas em processo a vácuo à baixas temperaturas.

Figura 6 - Extrato obtido no ESP com etanol e água na proporção 60:40 (v/v)



Fonte: Autora (2017)

### 3.4 Condição da separação de polifenóis e açúcares por sistema aquoso bifásico

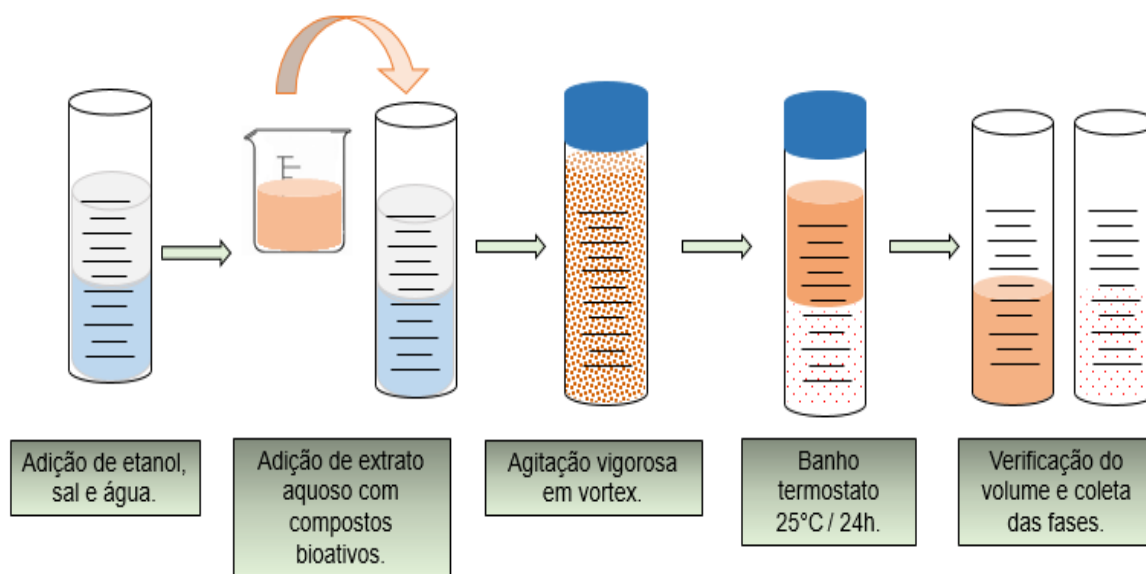
O sistema aquoso bifásico foi preparado da seguinte forma: utilizando-se uma balança analítica e tubos de centrífuga graduados, pesou-se certas quantidades de etanol, de solução estoque salina (sulfato de amônio 41 % ou fosfato de potássio

40 %), de água e de amostra (100 mg), nesta ordem. A massa total do sistema foi de 40 g. Os sistemas foram feitos em duplicata. Não foram realizados ajustes no pH.

Os tubos foram agitados vigorosamente em vortex e colocados em repouso em banho termostático a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h, garantindo, assim, que o sistema atingisse o equilíbrio. Eles foram mantidos fechados a fim de se evitar a evaporação do etanol.

Após esse tempo, anotou-se o volume de cada fase pela observação visual direta do tubo e, então, com a ajuda de seringas, as fases topo e fundo foram coletadas (Figura 7). A coleta foi realizada rápido e cuidadosamente de forma que a perturbação do equilíbrio fosse mínima. Em seguida, foi realizada a determinação da concentração de polifenóis e de açúcares em ambas as fases.

Figura 7 - Fluxograma de separação dos flavonoides e dos açúcares por sistema aquoso bifásico formado por etanol, sal e água



Fonte: Autora (2017)

Os dados de equilíbrio para os sistemas utilizados neste trabalho se basearam nos diagramas de fases do sistema formado por etanol, sulfato de amônio e água obtidos por Wang e colaboradores (2009), e etanol, fosfato de potássio e água obtidos por Katayama e Miyahara (2006). As composições globais utilizadas em cada sistema são mostradas no Anexo A.

### **3.4.1 Coeficiente de partição dos flavonoides e dos açúcares**

O coeficiente de partição dos flavonoides ( $K_p$ ) e dos açúcares ( $K_a$ ) foram calculados segundo a equação 3. Este coeficiente foi calculado para quantificar o grau de separação alcançado no processo.

### **3.4.2 Recuperação dos flavonoides e dos açúcares**

A recuperação dos flavonoides e dos açúcares foi calculada através da equação 6.

### **3.4.3 Razão Volumétrica**

A razão volumétrica ( $R_v$ ) entre ambas as fases do sistema foi determinada através da expressão:

$$V = \frac{V_t}{V_f} \quad (7)$$

em que  $V_t$  e  $V_f$  consistem no volume da fase topo e fundo, respectivamente.

## **3.5 Métodos analíticos**

### **3.5.1 Rendimento**

O rendimento do extrato contendo os compostos bioativos foi calculado segundo a equação abaixo:

$$\text{Rendimento do extrato} = \frac{\text{extrato}}{\text{massa da casca}} \times 100 \quad (8)$$

em que “extrato” corresponde à massa de extrato obtido após a extração seco em gramas, e “massa da casca” corresponde à quantidade de amostra utilizada para a extração. Neste trabalho foram utilizadas 15 g de farinha de casca de maracujá.

### **3.5.2 pH**

O pH dos sistemas foi mensurado em ambas as fases separadamente, utilizando-se medidor de pH à 25°C. A calibração do aparelho foi realizada utilizando duas soluções de pH 4,00 e 7,00.

### **3.5.3 Polifenóis totais**

A concentração dos polifenóis em ambas as fases dos sistemas testados foi determinada pela espectroscopia. Utilizou-se a metodologia descrita por Larrauri e colaboradores (1997). As absorvâncias foram determinadas a 735 nm e usando uma curva de calibração, em que o padrão foi o ácido gálico. As leituras foram feitas em triplicata.

Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por mL de amostra. O balanço de massa foi calculado e esteve entre a variação  $\pm 0,11$  %.

### **3.5.4 Açúcares Totais**

A análise de açúcares totais em ambas as fases dos sistemas testados foi determinada pela espectroscopia. A metodologia utilizada foi a de fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). As absorvâncias foram lidas a 490 nm e usando uma curva de calibração, em que o padrão foi a glicose. Os resultados foram expressos em g/L. O balanço de massa foi calculado e esteve entre a variação  $\pm 1$  %.

### **3.5.5 Cromatografia líquida e espectrometria de massas**

A presença de compostos bioativos foi verificada por cromatografia líquida e espectrometria de massas no equipamento de cromatografia líquida de ultra performance Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo / Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7  $\mu$ m), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2 % a 95 % B (15 min), fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5  $\mu$ l.

O modo ESI<sup>-</sup> foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L / h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

### **3.6 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram tratados utilizando o programa estatístico R, versão 3.44. Diferenças significativas entre as amostras foram determinadas pela análise de *One Way ANOVA* seguido do pós-teste de Tukey ao nível de confiança de 95 %.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento dos flavonoides

A Tabela 2 mostra os valores alcançados de rendimento na extração de flavonoides da casca do maracujá utilizando a técnica ESP.

Pode-se observar que a média de 30,22 % foi um pouco maior que o alcançado por De Souza e colaboradores (2017) de 27,8 % nas mesmas condições, empregando cascas da *Passiflora edulis ssp.*

Tabela 2 - Rendimento da extração utilizando método ESP

Amostra	Rendimento (%)	Média (%)	DP
1	30,20		
2	30,20	30,22	0,56
3	30,26		

Fonte: Autora, 2017

### 4.2 Separação de flavonoides e açúcares pelo SAB

Neste trabalho, o sistema aquoso bifásico foi utilizado para a separação dos flavonoides dos açúcares contidos no extrato da casca do maracujá.

Alguns parâmetros foram testados com o intuito de avaliar sua influência na partição e na recuperação dos açúcares e dos flavonoides, são eles: a composição do SAB e a concentração dos componentes formadores do sistema. Os resultados obtidos a 25°C são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

#### 4.2.1 Influência do tipo de sal no comportamento de partição dos flavonoides e dos açúcares.

Os experimentos de partição utilizando SAB revelaram os flavonoides e os açúcares migraram para fases opostas.

Os flavonoides apresentaram uma maior afinidade pela fase mais hidrofóbica (etanólica). Essa preferência resultou em coeficientes de partição acima de 70. Em decorrência desses altos valores de  $K_p$ , decidiu-se utilizar a recuperação dos flavonoides na fase topo como parâmetro para avaliação do efeito dos componentes do sistema no comportamento dos flavonoides no SAB.

Em relação aos açúcares, os resultados mostraram que a maior concentração destes compostos se encontrou na fase hidrofílica (salina), resultando em coeficientes de partição  $K_a$  menores que 1, variando entre 0,01 e 0,03. Quanto menor este valor for, maior a afinidade do soluto pela fase fundo.

Essa preferência por fases opostas pode ser explicada a partir da análise da estrutura química de cada soluto. Moléculas como os açúcares são muito polares por apresentar uma grande quantidade de hidroxilas em sua estrutura, o que torna a molécula capaz de estabelecer várias ligações de hidrogênio com a água, possuindo, desta forma, uma maior afinidade pela fase salina. Já compostos como os flavonoides são menos polares uma vez que apresentam menor quantidade de grupos ionizáveis, justificando, portanto, a maior afinidade pela fase hidrofóbica constituída pelo etanol (REIS et al., 2012).

Tabela 3 - Influência da variação dos parâmetros de processo na recuperação de flavonoides e açúcares utilizando SAB formado por Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Sistema etanol/sal	Concentração de etanol (%)	Concentração de sal (%)	Razão de volume (Rv)	Recuperação flavonoides fase topo (R, %)	Recuperação açúcares fase fundo (R, %)
Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26,50	18,50	1,11	100	96,58 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
	28,10	18,50	1,20	100	96,13 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
	30,14	18,50	1,44	100	97,25 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>
	32,19	18,50	1,67	100	96,33 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
	30,14	14,86	1,79	99,67 $\pm$ 0,02	92,98 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>
	30,14	15,55	1,67	99,60 $\pm$ 0,05	95,02 $\pm$ 0,39 <sup>ab</sup>
	30,14	16,00	1,63	99,31 $\pm$ 0,01	95,04 $\pm$ 0,63 <sup>ab</sup>
	30,14	17,51	1,31	99,90 $\pm$ 0,01	96,47 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>
	30,14	18,50	1,44	99,62 $\pm$ 0,22	97,25 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>

\* Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Tabela 4 - Efeito da variação dos parâmetros de processo na recuperação de flavonoides e açúcares utilizando Sab formado por Etanol/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Sistema etanol/sal	Concentração de etanol (%)	Concentração de sal (%)	Razão de volume (Rv)	Recuperação flavonoides fase topo (R, %)	Recuperação açúcares fase fundo (R, %)
	19,90	22,03	1,06	99,45 ± 0,01	97,47 ± 0,40 <sup>a</sup>
	21,26	22,03	1,12	99,20 ± 0,04	98,57 ± 0,33 <sup>b</sup>
	23,44	22,03	1,25	99,13 ± 0,02	99,12 ± 0,01 <sup>b</sup>
	25,30	22,03	1,40	99,33 ± 0,01	98,51 ± 0,21 <sup>b</sup>
<b>Etanol/ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	21,26	18,10	1,57	99,35 ± 0,01	96,7 ± 0,40 <sup>a</sup>
	21,26	20,06	1,29	98,99 ± 0,12	98,04 ± 0,10 <sup>ab</sup>
	21,26	22,03	1,15	99,21 ± 0,04	98,57 ± 0,33 <sup>b</sup>
	21,26	24,14	1,03	98,71 ± 0,04	98,67 ± 0,16 <sup>b</sup>
	21,26	26,09	0,94	98,72 ± 0,08	98,73 ± 0,55 <sup>b</sup>

\* Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p>0,05)

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

#### 4.2.2 Efeito da variação na concentração do etanol no SAB.

Nesta etapa do experimento, variou-se a concentração do etanol de 26,5 a 32,19% no sistema Etanol/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, fixando-se a concentração de sal em 18,5 %. No sistema Etanol/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a concentração de etanol variou entre 19,9 a 25,3 %, mantendo-se a concentração do sal em 22,03 %.

Pela análise dos resultados (tabelas 3 e 4), nota-se que a variação na concentração do etanol não possuiu influência na recuperação dos flavonoides, pois em todas as concentrações testadas, não houve variação significativa nos valores de recuperação dos flavonoides, que permaneceu acima de 99 % no sistema Etanol/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, sendo que no sistema Etanol/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, os flavonoides migraram totalmente para a fase rica em etanol, apresentando uma recuperação de 100 % dos compostos de interesse.

Em relação à influência sobre a recuperação dos açúcares, percebe-se que foi levemente influenciada pelo incremento na concentração da fase topo do sistema Etanol/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A tabela 3 mostra uma variação de 96,13 para 97,25%, no momento em que a percentagem de etanol foi de 30,14 %, ao passo que apresentou uma pequena diminuição na recuperação com a sequente elevação no nível de etanol.

No sistema Etanol/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, a maior recuperação, 99,12 %, foi obtida na concentração de 23,44% de etanol, porém não sendo diferente significativamente



daquela obtida na concentração de 21,26 % de etanol, que foi de 98,86 %. Da mesma forma, a recuperação decresceu na maior concentração testada, 25,3 %, em que se obteve um valor de 98,36 %.

Tal comportamento comum aos dois sistemas pode ser explicado pela redução do volume da fase salina, provocada pelo crescente aumento da concentração de etanol, pois a água contida na fase inferior do sistema que dissolvia os açúcares, termina por migrar para a fase superior, acarretando numa maior partição dos açúcares (LIU et al., 2013).

#### **4.2.3 Efeito da variação da concentração do sal no SAB.**

Após a avaliação da concentração do etanol, analisou-se o efeito da concentração dos sais em cada sistema sobre a partição e a recuperação dos flavonoides.

As concentrações testadas no sistema Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  variaram entre de 14,86 a 18,5 %, mantendo-se a concentração de 30,14 % de etanol, já que neste valor, houve um aumento significativo, na recuperação dos açúcares na fase fundo. Ressalta-se que valores acima da concentração de 18,5% culminaram na precipitação do sal.

No sistema Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , testou-se concentrações entre 18,10 e 26,09 %, fixando-se a concentração de etanol em 21,26 %, em razão de o rendimento de açúcares obtido nesta concentração não ter variado significativamente daquelas obtidas ao utilizar concentrações maiores de etanol.

Os resultados obtidos nos dois sistemas testados mostram que o aumento da concentração dos sais não provocou alterações significativas na recuperação dos flavonoides, permanecendo acima dos 98 %.

O efeito *salting out* promovido pelo aumento da concentração dos sais levam a um aumento na concentração de etanol na fase topo, fazendo com que os flavonoides fiquem diluídos mais facilmente na fase topo (Liu et al., 2013).

Em relação aos açúcares, no SAB formado por Etanol/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , observou-se que à medida que se acrescentava sal, a recuperação dos açúcares aumentava, provocando uma variação de 92,1 a 97,64 %.

No SAB formado por Etanol/ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pode-se observar um comportamento semelhante. Houve uma variação significativa no momento em que se variou a

concentração de sal de 18,10 a 20,06 %. Observa-se que apesar do incremento contínuo no sal, a recuperação não sofreu uma variação significativa, chegando a 98,73 %.

Tal comportamento pode ser explicado pelo efeito combinado do coeficiente de partição e do volume de fase. Com o aumento da concentração de sal, possibilitaria a entrada de água na fase fundo, fazendo com que mais açúcares fossem transferidos para a fase fundo (salina) (CHENG et al., 2017).

#### **4.2.4 Efeito do pH do sistema**

O pH do meio é capaz de influenciar a partição dos solutos. O pka dos flavonoides identificados é em torno de 7. Em pH maiores ou menores que este valor, eles tendem a ionizar e, quando carregados, ficam mais propensos a estabelecer interações intermoleculares mais fortes do tipo íon-íon (REIS et al., 2014).

Os dois sais escolhidos para as análises conferem pH diversos ao meio. Na Tabela 5 constam os valores de pH das duas fases em cada sistema.

Como pode ser visto, o sulfato de amônio confere ao meio um pH em torno de 4, e neste valor, as moléculas dos flavonoides são estáveis, ou seja, neutras, e quando se encontram nesta forma, possuem uma maior afinidade pela fase hidrofóbica, o que explica a sua migração preferencial para a fase topo.

No caso do sistema composto por  $K_2HPO_4$ , o pH conferido é em torno de 9,0, no qual os flavonoides sofrem ionização aumentando a possibilidade de migração para a fase mais iônica e hidrofílica, ou seja, a salina (WANG et al., 2009).

Os sistemas aquosos bifásicos formados por etanol e sulfato de amônio, e etanol e fosfato de potássio são mostrados na Figura 8. Percebe-se que a fase salina deste sistema possui uma leve coloração amarelada típica conferida pelos flavonoides, se comparado com o sistema formado por sulfato de amônio. Isto pode indicar presença de flavonoides na fase fundo em razão da ionização das suas moléculas em tal pH. Apesar disso, a maior concentração dos flavonoides na fase etanólica mostra que as interações hidrofóbicas foram predominantes em relação às interações iônicas estabelecidas entre o sal e as hidroxilas e/ou grupos glicosídicos existentes nas moléculas.

Tabela 5 - Valores de pH das fases aquosas dos SAB a 25°C

Sistema	Fração mássica	pH fase topo	pH fase fundo
Etanol/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	26,2/18,50	4,96	4,35
	28,1/18,50	5,33	4,75
	30,14//18,50	5,38	4,62
	32,19/18,50	5,33	4,69
	30,14/14,86	5,18	4,71
	30,14/15,55	5,36	4,60
	30,14/16,00	4,94	4,61
	30,14/17,51	4,93	4,57
	30,14/18,5	5,22	4,65
	Etanol/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	19,9/22,01	10,00
21,26/22,01		9,68	9,66
23,44/22,01		10,02	9,86
25,3/22,01		9,17	9,81
21,26/18,10		9,91	9,77
21,26/20,06		9,26	9,64
21,26/22,01		9,28	9,82
21,26/24,14		9,31	9,88
21,26/26,09		9,18	9,84

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Figura 8 - Sistema aquoso bifásico formado por Etanol/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (à direita) e Etanol/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (à esquerda)



Fonte: Autora (2017)

Os flavonoides identificados na amostra empregada possuem a característica de serem pouco solúveis em água, sendo mais solúveis em solventes orgânicos, fato que pode ser explicado por suas estruturas serem compostas por anéis benzênicos, o que favorece as interações hidrofóbicas.

Os flavonoides tendem a sofrer modificações químicas dependendo das condições do meio, devido às características de sua estrutura que conferem a estes compostos, atividade antioxidante, sendo mais pronunciado em soluções aquosas com pH acima de 11.0 (JURASEKOVA et al., 2014).

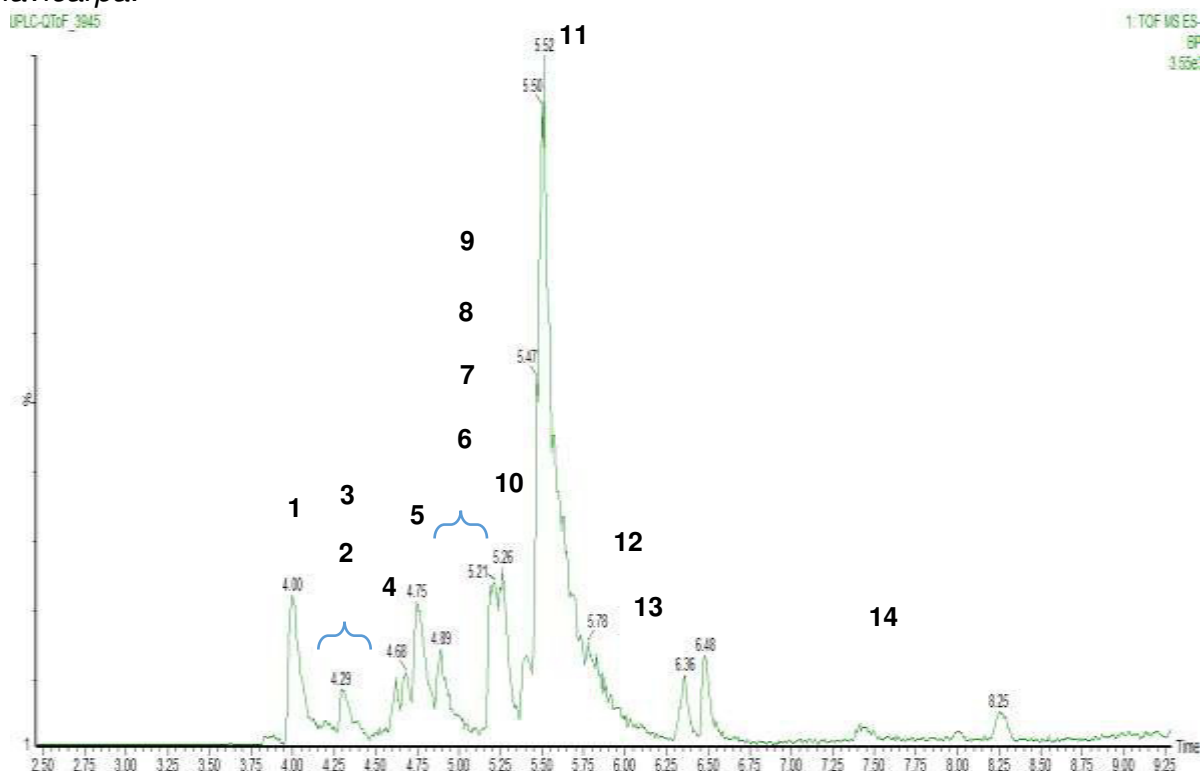
Portanto, para se evitar baixos coeficientes de partição e a degradação dos compostos, a escolha dos parâmetros do sistema como pH e a composição do SAB deve levar em consideração as características do produto de interesse e dos contaminantes, como ponto isoelétrico ou pKa, o peso molecular e a sua hidrofobicidade (BENAVIDES et al., 2008).

### **4.3 Cromatografia líquida e espectrometria de massas**

Na análise com UPLC-QToF-MS<sup>E</sup>, o extrato foi analisado no modo negativo de ionização. Os compostos foram tentativamente identificados comparando-se as fórmulas moleculares obtidas com aquelas contidas na literatura de família, gênero e espécie.

Os resultados mostraram a presença de quinze picos. Dentre os compostos identificados estão as flavonas: orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, lucenina-2, vicenina, violantina, crisina, apigenina, luteolina, scafitosídeo e isoscaftosídeo.

Figura 9 - Cromatograma em BPI obtido no sistema UPLC-QTOF-MS em modo negativo (ESI-) do extrato da casca de maracujá das amostras de *Passiflora edulis f. flavicarpa*.



Fonte: Autora (2017)

O pico **1** [ $m/z$  609.1455 Da [M – H] ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ )] exibe a fragmentação no  $MS^2$  com os íons fragmentos  $m/z$  519,1250 Da [M - H - 90]<sup>-</sup>;  $m/z$  489,0976 Da [M - H - 120]<sup>-</sup>;  $m/z$  399,0724 Da [M - H - 210]<sup>-</sup>;  $m/z$  369,0562 Da [M - H - 240]<sup>-</sup>. Este composto foi tentativamente identificado como luteolina-6,8-di- $C\beta$ -D-glicopiranosídeo (lucenina-2) (FARAG et al., 2016; CAZARIN et al., 2016).

No pico **2** encontrou-se o valor de massa do íon desprotonado igual a  $m/z$  593,1530 Da [M – H], e no espectro  $MS^2$  tem-se os fragmentos  $m/z$  473,1133 Da [M - H - 120]<sup>-</sup>, relativo a perda de uma unidade de hexose e também um fragmento  $m/z$  327,1078 Da [M - H - 266]<sup>-</sup> referente à estrutura da aglicona do flavonoide. Correlacionando a fórmula molecular  $C_{27}H_{29}O_{11}$  obtida pelo software *MassLynx 4.1* com os valores de fragmentos  $MS^2$  na literatura, foi possível identificar o composto como a isoorientina 2''- $O$ -ramnosídeo (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2011).

O pico **3** [ $m/z$  593,1507 Da [M – H] ( $C_{27}H_{30}O_{15}$ )] foi tentativamente identificado como sendo o flavonoide vicenina, a partir dos valores de massa em seu perfil de fragmentação  $MS^2$ , sendo os valores observados  $m/z$  473,1072 Da [M – H –

120]<sup>-</sup> referente à perda e um hexosídeo;  $m/z$  383,0862 Da [M – H – 90 - 120]<sup>-</sup> e  $m/z$  353,0439 Da [M – H – 120 - 120]<sup>-</sup> (característico de perda dupla das unidades C-glicosídeo) e também de sua fórmula molecular obtida com erro estimado em 0,2 ppm (CAZARIN et al., 2016).

O pico **4** ( $t_r = 4,62$ ) e **9** ( $t_r = 5,07$ ) apresentaram os mesmos valores de fórmula molecular (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>O<sub>14</sub>) e massa molecular do íon desprotonado, respectivamente  $m/z$  563.1393 Da [M – H]<sup>-</sup> e  $m/z$  563,1401 Da [M – H]<sup>-</sup>. Estes dois isômeros foram identificados como sendo o scaftosídeo e o isoscaftosídeo com base no perfil de fragmentação MS<sup>2</sup> apresentado (sendo  $m/z$  383.0616 Da [M – H - 180]<sup>-</sup> e  $m/z$  353.0719 Da [M – H - 210]<sup>-</sup> para o scaftosídeo;  $m/z$  473,1126 [M – H – 90]<sup>-</sup> para o seu isômero, isoscaftosídeo) e no tempo de retenção já relatados na literatura (SIMIRGIOTIS et al., 2013; FENG et al., 2016).

O pico **5** ( $t_r = 4,74$ ) e o **6** ( $t_r = 4,95$ ), apresentaram valores de massa do íon desprotonado respectivamente iguais a  $m/z$  447,0927 Da [M – H]<sup>-</sup> e  $m/z$  447,0930 Da [M – H]<sup>-</sup> com mesma fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>, indicando a presença de isômeros. O composto presente do pico 5 apresentou fragmentação no MS<sup>2</sup> com os íons fragmentos  $m/z$  357,0753 Da [M – H – 90]<sup>-</sup> e  $m/z$  327,0755 Da [M – H – 120]<sup>-</sup> e no composto 6 observou-se os valores  $m/z$  357,0850 Da [(M – H) – 90]<sup>-</sup> e  $m/z$  327,0550 Da [M – H – 90 – 30]<sup>-</sup>, ambos valores referentes à perdas de resíduos de açúcares presentes na estrutura das agliconas C-glicosídeos. Estes isômeros foram tentativamente identificados como sendo os flavonoides orientina (pico 5) e isoorientina (pico 6) e diferenciados pelo tempo de retenção apresentado já descritos no trabalho realizado por Cazarin (2016) e colaboradores.

O pico **7** [ $m/z$  577,1556 da [M – H]<sup>-</sup>; (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>)] exibe a fragmentação no MS<sup>2</sup> com os íons fragmentos  $m/z$  367,0715 Da [M – H – 90 - 120]<sup>-</sup> e  $m/z$  337,0766 Da [M – H – 240]<sup>-</sup>, fragmentos esses referentes à perda de unidades de açúcares da estrutura da aglicona. Com base no padrão de fragmentação apresentado e correlacionados com outros trabalhos na literatura, este composto foi tentativamente identificado como violantina (CAZARIN et al., 2016).

O pico **8** foi tentativamente identificado como o flavonoide apigenina-C-deoxosídeo-O-hexosídeo. Este composto apresentou valor de íon desprotonado igual a  $m/z$  577,1572 Da [M – H]<sup>-</sup> no espectro MS e no espectro MS<sup>2</sup> os íons fragmentos  $m/z$  397,1283 Da [M – H - 180]<sup>-</sup> e  $m/z$  473,1126 Da [M – H - 104]<sup>-</sup> ambos fragmentos relacionados com a perda da estrutura C-hexosídeo. A fórmula molecular proposta

pelo software *MassLynx* foi  $C_{27}H_{29}O_{14}$  (FARAG et al., 2016).

Para o composto presente no pico **10** ( $t_r = 5,29$ ) foi obtido a fórmula molecular  $C_{15}H_{20}O_7$  a partir do software *MassLynx* com erro de 0 ppm e massa do íon desprotonado  $m/z$  311,1129 Da  $[M - H]^-$ . No entanto não foi possível identificar este composto na literatura consultada.

Outros compostos isômeros identificados nos extratos da *Passiflora edulis f. flavicarpa* foram encontrados nos picos **11 e 12**, apresentando respectivamente tempos de retenção iguais a 5,65 e 6,08 min. Através do perfil de fragmentação, fórmula molecular ( $C_{21}H_{20}O_{10}$ ) e dos tempos de retenção relatado em outros trabalhos na literatura, estes compostos foram tentativamente identificados como vitexina (pico 11) e seus isômero isovitexina (pico 12). A vitexina apresentou valor de massa do íon desprotonado igual a  $m/z$  431.0975 Da  $[M - H]^-$  e exibe a fragmentação no  $MS^2$  com o íon fragmento  $m/z$  311,1184 Da  $[M - H - 90 - 30]^-$ . A isovitexina apresentou o valor de massa do íon desprotonado de  $m/z$  431,0980 Da  $[M - H]^-$  e seu perfil de fragmentação  $MS^2$  com  $m/z$  311.1650 Da  $[M - H - 90 - 30]^-$  e  $m/z$  341.1256 Da  $[M - H - 90]^-$ . A fragmentação apresentada por ambos os isômeros é tipicamente relacionada à perda de unidade C-hexosil ligadas à unidade da aglicona (CAZARIN et al., 2016; FARAG et al., 2016).

O pico **13** [ $m/z$  561.1600 ( $C_{27}H_{30}O_{13}$ )] exibe a fragmentação no  $MS^2$  com o íon fragmento  $m/z$  295.0795 Da  $[M - H]^-$ . Este composto foi tentativamente identificado como crisina-C-hexosil-6"-O-deoxosídeo (FARAG et al., 2016).

O pico **14** ( $t_r = 7,52$ ) apresentou massa do íon desprotonado de  $m/z$  329,2328 Da  $[M - H]^-$ ) e exibe com os íons fragmentos  $m/z$  183,0141 Da  $[M - H - 146]^-$ ; 227,1111 Da  $[M - H - 44]^-$  309,1610 Da  $[M - H - 126]^-$  no  $MS^2$ . Este composto foi tentativamente identificado como o ácido trihidroxi-octadecaenoico, sendo que este composto teve sua fórmula molecular ( $C_{18}H_{34}O_5$ ) proposta pelo software *MassLynx 4.1* com erro igual a 0,0 ppm (SAKALEM; NEGRI; TABACH, 2011).

Tabela 6 - Constituintes identificados ou tentativamente identificados em amostras de *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Modo negativo.

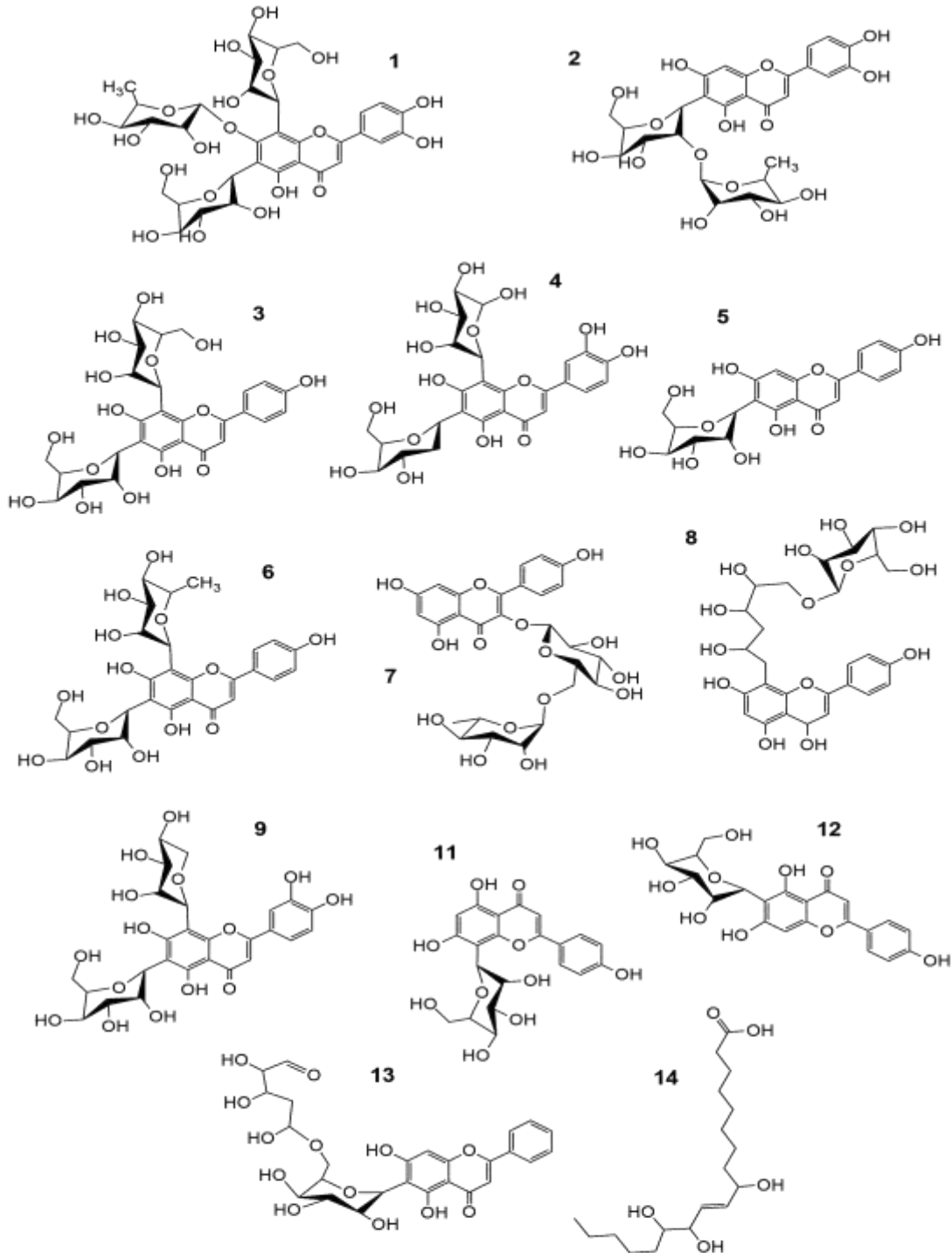
Pico	T <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Observado	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	Fragmentos dos íons MS <sup>2</sup>	Fórmula empírica	Erro	Tentativa de identificação	Referências
1	4,01	609,1455	609,1456	519,1250	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	-0,2	Lucenina-2	(Cazarin et al., 2016)
				489,0976				
				399,0724				
				369,0562				
2	4,31	593,1530	593,1506	473,1133	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>11</sub>	-1,0	Isoorientina 2''-O- rhamnosídeo.	(Sakalem; Nergi; Tabach, 2011)
				327,1078				
				473,1072				
3	4,37	593,1507	593,1506	383,0862	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	0,2	Vicenina	(Cazarin et al., 2016)
				353,0439				
4	4,62	563,1393	563,1401	383,0616	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	-1,1	Isoschaftosídeo	(Simirgiotis <i>et al.</i> , 2013)
				353,0719				
				357,0753				
5	4,74	447,0927	447,0927	327,0755	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	0,7	Orientina	(Cazarin et al., 2016; Sakalem; Negri e Tabach, 2011)
				357,0850				
6	4,95	447,0930	447,0927	327,0550	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	0,0	Isoorientina	(Cazarin et al., 2016)
				367,0715				
7	4,96	577,1556	577,1557	337,0766	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	-0,2	Violantina	(Cazarin et al., 2016)



Pico	T <sub>R</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> Observado	[M-H] <sup>-</sup> Calculado	Fragmentos dos íons MS <sup>2</sup>	Fórmula empírica	Erro	Tentativa de identificação	Referências
8	4,97	577,1572	577,1557	397,1283 473,1126	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub>	2,6	Apigenina- <i>C</i> -deoxosídeo- <i>O</i> - hexosídeo	(Farag et al., 2016)
9	5,07	563,1401	563,1401	473,0948	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	0,0	Schaftósídeo	(Cazarin et al., 2016)
10	5,29	311,1129	311,1131	-	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	0,0	Não identificado	-
11	5,65	431,0980	431,0978	311,1184	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	0,5	Vitexina	(Cazarin et al., 2016)
12	6,08	431,0975	431,0978	341,1256 311,1650	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	- 0,7	Isovitexina	(Cazarin et al., 2016)
13	6,14	561,1600	561,1608	295,0795	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	-1,4	Crisina- <i>C</i> -hexosil-6''- <i>O</i> - deoxosídeo	(Farag et al., 2016)
14	7,52	329,2328	329,2328	183,0141 227,1111 309,1610	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	0,0	Ácido trihidroxi- octadecaenóico	(Farag et al., 2016)

Fonte: Autora (2017)

Figura 10 - Compostos 1 – 15 que foram tentativamente identificados no extrato das amostras em amostras de *Passiflora edulis f. Flavicarpa*.



Fonte: Autora (2017)

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou o emprego do Sistema Aquoso Bifásico, SAB, na separação dos flavonoides do extrato da casca do maracujá. Foi realizada uma avaliação sistemática da influência dos sais utilizados na composição, sulfato de amônio e fosfato de potássio, e da concentração dos componentes formadores, etanol e sal, na partição e na recuperação dos flavonoides, o que possibilitou uma separação com alto rendimento e elevada recuperação.

Após os testes, constatou-se que o SAB foi um método eficaz para a separação dos flavonoides dos interferentes açúcares presentes no extrato, proporcionando uma recuperação superior a 98 % dos flavonoides, e 97 % dos açúcares em ambos os sistemas compostos por sulfato de amônio e fosfato de potássio. Esses resultados mostraram que os dois sais foram adequados para o objetivo deste trabalho, devendo-se atentar para o pH do sistema, pois este possui grande influência na partição e na recuperação dos compostos.

Constatou-se, também, que o aumento na concentração do sal nos dois sistemas favoreceu consideravelmente a partição, aumentando a concentração dos açúcares na fase fundo, enquanto que variações na concentração de etanol não mostraram influência significativa na partição dos compostos.

Em razão dos resultados de recuperação bastante satisfatórios, dispensou-se o uso de outras etapas, como a de multiestágio, diminuindo, desta forma o tempo e os custos com o processo.

Os resultados da análise do extrato da casca do maracujá mostraram que este fruto é fonte de variados tipos de flavonoides que possuem vários benefícios para a saúde, sendo, portanto, uma alternativa de baixo custo de qualidade para obtenção destes compostos bioativos.

## REFERÊNCIAS

- ALI, H.; DIXIT, S. In vitro antimicrobial activity of flavanoids of cimum sanctum with synergistic effect of their combined form. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S396–S398, 2012.
- ARAÚJO, B. C. **Maracujá em Sergipe - situação atual e perspectivas**. Aracaju: [s.n.].
- BENAVIDES, J. et al. Extraction and purification of bioproducts and nanoparticles using aqueous two-phase systems strategies. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 6, p. 838–845, 2008.
- BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 133–142, 2007.
- BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 18, p. 2505–2512, 2011.
- BIESALSKI, H. K. et al. Bioactive compounds: definition and assessment of activity. **Nutrition**, v. 25, n. 11–12, p. 1202–1205, 2009.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- CABEZAS, H. Theory of phase formation in aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. B, Biomedical applications**, v. 680, p. 3–30, 1996.
- CASTRO-LÓPEZ, C. et al. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1139–1148, 2017.
- CAZARIN, C. B. B. et al. Intestinal anti-inflammatory effects of Passiflora edulis peel in the dextran sodium sulphate model of mouse colitis. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 26, p.565-576, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.020>.
- CHENG, Z. et al. Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from Gentiana scabra Bunge by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system. **Industrial Crops and Products**, v. 102, p. 75–87, 2017.
- CHEW, K. K. et al. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1427–1435, 2011.
- CISNEROS, M. et al. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga Chlorella protothecoides. **Journal of Chromatography B: Analytical**

**Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 105–110, 2004.

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 33–42, 2001.

CÓRDOVA, K. R. V et al. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 221–230, 2005.

SILVA, L. H. M. et al. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 46, p. 23540–23546, 2006.

SILVA, L. M. R. et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 143, p. 398–404, 2014.

SOUZA, C. G. et al. Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 5, n. 8, 2017.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DORNAS, W. C. et al. Flavonoides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 31, p. 241–249, 2007.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EITEMAN, M. A.; GAINER, J. L. The effect of free-volume changes on partitioning in magnesium sulfate-poly(ethylene glycol) aqueous two-phase systems. **BBA - General Subjects**, v. 992, n. 1, p. 125–127, 1989.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research**, v. 24, n. 10, p. 851–874, 2004.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews In Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57–139, 2001.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. September, p. 1–15, 2012.

FALEIRO, FÁBIO GELAPE; JUNQUEIRA, N. T. V. **O produtor pergunta, a Embrapa**

**responde**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2016.

FAO. **Food wastage footprint. Impacts on natural resources. Summary Report**. [s.l.: s.n.].

FARAG, M. A. et al. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 12, p. 3125–3143, 2016.

FARID, R. et al. Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 601–606, 2010.

FENG, C. Y.; LI, S. S.; YIN, D. D.; ZHANG, H. J.; TIAN, D. K.; WU, Q.; WANG, L. J.; SU, S.; WANG, L. S. Rapid determination of flavonoids in plumules of sacred lotus cultivars and assessment of their antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 96–104, 2016.

FENG, Z. et al. Liquid-liquid equilibria of aqueous systems containing alcohol and ammonium sulfate. **Fluid Phase Equilibria**, v. 317, p. 1–8, 2012.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

GRILO, A. L.; AIRES-BARROS, M. R.; AZEVEDO, A. M. Partitioning in aqueous two-phase systems: fundamentals, applications and trends. **Separation and Purification Reviews**, v. 45, n. 1, p. 68–80, 2016.

GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 249–255, 1998.

GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase system: effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 743, n. 1–2, p. 255–258, 2000.

HAMTA, A.; DEHGHANI, M. R. Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals. **Journal of Molecular Liquids**, v. 231, p. 20–24, 2017.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 207–211, 2009.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous two-phase systems: methods and protocols**. 11. ed. New Jersey: Human Press, 2000.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids**. [s.l.: s.n.]. v. 96

HE, M. et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74–85, 2016.

ICHIMURA, T. et al. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 718–721, 2006.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.

JOHANSSON, G.; ANDERSSON, M. Parameters determining affinity partitioning of yeast enzymes using polymer-bound triazine dye ligands. **Journal of Chromatography A**, v. 303, n. C, p. 39–51, 1984.

JURASEKOVA, Z. et al. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12802–12811, 2014.

KAMMERER, D. R.; KAMMERER, J.; CARLE, R. Resin adsorption and ion exchange to recover and fractionate polyphenols. In: **Polyphenols in Plants**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 219–230.

KATAYAMA, H.; MIYAHARA, M. Liquid - liquid phase equilibria of (ethanol or methanol + water ) containing either dipotassium hydrogen phosphate or sodium dihydrogen phosphate. **Chem. Eng**, v. 51, p. 914–918, 2006.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 312, n. 7029, p. 478–481, 1996.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KUHNAU, J. The flavonoids. A class of semi essential food components: their role in human nutrition. **World Rev Nutr Diet**, v. 24, p. 117–191, 1976.

LAM, K. Y. et al. A review on medicinal properties of orientin. **Advances In Pharmacological Sciences**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

LAROZE, L.; ZUÑIGA-HANSEN, M. E. Phenolic antioxidant extraction from selected agroindustrial residual sources. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 2, p. S193–S194, 2007.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, 1997.

LETCHER, T.; SCOTT, J.; PATTERSON, D. **Chemical processes for a sustainable future**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015.

LIN, Y. et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Current cancer drug targets**, v. 8, n. 7, p. 634–646, 2008.

LIU, H. et al. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using 2-propanol-salt-H<sub>2</sub>O system. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, n. 1–2, p. 329–336, 2006.

LIU, Y. et al. Selective separation of flavones and sugars from honeysuckle by alcohol/salt aqueous two-phase system and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 776–783, 2013.

LÓPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756–763, 2013.

MASHAYEKHI, F. et al. Concentration of mammalian genomic DNA using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1613–1623, 2009.

MEDEIROS, J. S. et al. Avaliação das atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 2, p. 99–101, 2009.

MEDINA, J. C. **Alguns aspectos tecnológicos das frutas tropicais e seus produtos**. São Paulo: Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), 1980.

MEDINA, S. et al. Quantification of phytoprostanes – bioactive oxylipins – and phenolic compounds of *Passiflora edulis* Sims shell using UHPLC-QqQ-MS/MS and LC-IT-DAD-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 229, p. 1–8, 2017.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 268–272, 2005.

MONTALVO-HERNÁNDEZ, B.; RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. Recovery of crocins from saffron stigmas (*Crocus sativus*) in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1236, n. July 2017, p. 7–15, 2012.

OLIVEIRA, D. A. et al. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55–62, 2016.



OLIVEIRA, L. F. et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, n. 5, p. 371–389, 1991.

PETRY, R. D. et al. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 162–164, 2001.

RAJA, S. et al. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2012.

RAMOS, A. T. et al. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 592–597, 2007.

REIS, I. A. O. et al. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 49, n. 5, p. 656–663, 2014.

REIS, I. A. O. et al. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2453–2461, 2012.

RITO-PALOMARES, M.; HERNANDEZ, M. Influence of system and process parameters on partitioning of cheese whey proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 711, n. 1–2, p. 81–90, 1998.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19–34, 2002.

SAKALEM, M. E.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1219–1232, 2011.

SANTOS, V. C. et al. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1–2, p. 75–83, 2011.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. The *Passiflora tripartita* (banana passion) fruit: a source of bioactive flavonoid C-glycosides isolated by HSCCC and characterized by HPLC-DAD-ESI/MS/MS. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 1672–1692, 2013.

SINHA, N. K. et al. **Handbook of vegetables and vegetable processing**. first ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

STEINBERG, E. **Maracujá - guia prático para um manejo equilibrado**. 4. ed. São

Paulo: Nobel, 1988.

SUAREZ RUIZ, C. A. et al. Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, p. 1–8, 2017.

TAPAS, A.; SAKARKAR, D.; KAKDE, R. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089–1099, 2008.

VALLS, J. et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143–7172, 2009.

VIGANÓ, J.; MARTINEZ, J. Trends for the application of passion fruit industrial by-products: a review on the chemical composition and extraction techniques of phytochemicals. **Food and Public Health**, v. 5, n. 5, p. 164–173, 2015.

WANG, Y. et al. 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 Data**, v. 55, n. 2, p. 876–881, 2009.

WIJERATNAM, S. W. **Passion Fruit** Elsevier, , 2016. (Nota técnica).

WU, X. et al. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 443–453, 2011.

XIE, X. et al. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of four flavonoids in *Crotalaria sessiliflora* L. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 632–642, 2017.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 20, p. 459–471, 2010.

ZHANG, D. Y. et al. Aqueous two-phase extraction and enrichment of two main flavonoids from pigeon pea roots and the antioxidant activity. **Separation and Purification Technology**, v. 102, p. 26–33, 2013.

ZUCOLOTTI, S. M. et al. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 3, p. 232–239, 2012.

## ANEXO A - COMPOSIÇÃO DE EQUILÍBRIO DE FASES PARA OS SISTEMAS SULFATO DE AMÔNIO E FOSFATO DE POTÁSSIO

Tabela 7 - Composição de equilíbrio de fases para o sistema composto de etanol (1), sulfato de amônio (2) e água (3) a 25°C

Número	Composição total		Fase rica em etanol		Fase rica em sulfato de amônio		
	100 $w_1$	100 $w_2$	100 $w^{t_1}$	100 $w^{t_2}$	100 $w^{f_1}$	100 $w^{f_2}$	100 $w^{fa_2}$
1	11,62	29,81	45,69	4,74	8,28	32,30	32,36
2	11,54	31,03	52,34	2,88	6,89	34,27	34,21
3	11,48	32,49	57,87	1,82	5,40	36,55	
4	11,44	32,39	57,75	1,84	5,54	36,32	
5	11,45	32,41	57,27	1,92	5,49	36,41	
6	11,42	32,50	56,62	2,03	5,36	36,62	

Fonte: Wang et al. (2009).

Tabela 8 - Composição de equilíbrio de fases para o sistema composto de etanol (1), fosfato de potássio (2) e água (3) a 25°C

Número	Fase rica em etanol		Fase rica em sulfato de amônio	
	100 $w^{t_1}$	100 $w^{t_2}$	100 $w^{f_1}$	100 $w^{f_2}$
1	67,90	0,160	0,380	47,60
2	62,80	0,330	0,640	45,10
3	54,80	0,780	1,09	41,90
4	48,30	1,46	1,63	39,30
5	41,20	2,67	2,45	36,50
6	34,10	4,91	3,90	32,90
7	31,11	6,05	4,42	31,50
8	26,30	8,65	6,22	28,50
9	23,50	10,87	7,71	26,40

Fonte: Katayama e Miyahara (2006).