UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

PROCESSO INTEGRADO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETANINA A PARTIR DO *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS À BASE DE THF E SAIS DE SÓDIO

ARACAJU, SE - BRASIL

Fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

PROCESSO INTEGRADO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETANINA A PARTIR DO *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS À BASE DE THF E SAIS DE SÓDIO

Autor: Ricardo Porto Santos

Orientadores: Prof. Ranyere Lucena de Souza, D.Sc.

Prof. Álvaro Silva Lima, D.Sc.

ARACAJU, SE - BRASIL

Fevereiro de 2017

PROCESSO INTEGRADO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETANINA A PARTIR DO *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS À BASE DE THF E SAIS DE SÓDIO

Ricardo Porto Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovado por:

_____
Ranyere Lucena de Souza, D.Sc. (Orientador)

_____
Álvaro Silva Lima, D.Sc. (Orientador)

_____
Cleide Mara Faria Soares, D.Sc (Examinador Interno)

_____
Igor Adriano de Oliveira Reis, D.Sc. (Examinador Externo)

ARACAJU, SE - BRASIL
Fevereiro de 2017

S237p

Santos, Ricardo Porto

Processo integrado de extração e purificação de betanina a partir do *opuntia ficus-indica* utilizando sistemas aquosos bifásicos à base de THF e sais de sódio / Ricardo Porto Santos ; orientação [de] Prof.° Dr. Ranyere Lucena de Souza; Prof.° Dr. Álvaro Silva Lima – Aracaju: UNIT, 2017.

90 f.il.: 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2017.

Inclui bibliografia.

1. *Opuntia ficus-indica*. 2. Betanina. 3. Purificação. 4. Sistemas aquosos bifásicos I. Santos, Ricardo Porto. II. Souza, Ranyere Lucena de. (orient.). III. Lima, Álvaro Silva. (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 66. 06: 582.852.2

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

‘Não tenha medo, pois estou com você. Não fique ansioso, pois eu sou o seu Deus. Vou fortalecê-lo, sim, vou ajudá-lo. Vou segurá-lo firmemente com a minha mão direita de justiça.’ (Isaías 41:10)
– Bíblia Sagrada

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças além do normal durante essa trajetória desafiadora (2 Coríntios 4:7-10).

À minha esposa Roseane Porto pelo apoio incondicional e pela paciência nos momentos ausentes. Sem nenhuma dúvida suas palavras de conforto e incentivo me ajudaram muito. Agradeço pelo amor e cuidado (Provérbios 18:22).

À minha filha amada, Lys S. Porto, que por dois anos foi muito gentil e compreensiva quando ouvia por diversas vezes que não poderia brincar porque papai tinha que estudar e trabalhar. Amo muito você (Salmos 127:3).

A meus pais e irmãos, por todo incentivo e apoio, em especial à minha mãe, Nádja M. Porto, minha primeira professora, que sempre acreditou no conhecimento e ajudou seus filhos a sentir prazer em estudar. A meu pai, Ricardo Alves, que com seu trabalho árduo nos permitiu ter o necessário para termos tempo suficiente de nos dedicar aos estudos desde sempre. Muito obrigado meus pais, porque sem dúvida alguma sou um homem respeitado porque tive uma boa criação (Provérbios 17:6).

Aos meus orientadores Ranyere e Álvaro por toda orientação e apoio, em especial nos momentos mais difíceis desse trajeto. Agradeço a paciência em me transmitir o conhecimento por vocês adquirido. Farei o possível para ser grato por isso em ações. Desejo a ambos prosperidade e felicidade. Jamais serão esquecidos (Provérbios 1:5).

À família LPA que tornou os dias mais agradáveis e ao longo desses anos se mostraram tão solícitos, como Acácia, Adriana, Anderson, Danyelle, Gilderlan, Jaci, Juliana, Lays, Mª Vanessa, Milson, Nilmara, Regina e Sílvia Regina.

Alguns se tornaram queridos amigos, em especial Aislan Primo, Filipe Smith, Luciano Melo, Andrea L'Amour, José Ricardo e Acenini Balieiro. Que nossa amizade continue crescendo além das fronteiras da pesquisa ou da instituição (Provérbios 18:24).

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da UNIT pelos ensinamentos e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho, mas em especial à prof. Dra Cleide Mara por ser esta fortaleza em forma de mulher. Seus conselhos oportunos me fizeram muito bem e me ajudaram a chegar até este momento. Jamais esquecerei. Muito obrigado. Um professor não só transmite conhecimento, mas também exemplo. Tentarei seguir seu exemplo ao lidar com meus alunos (Isaías 32:2).

Ao ITP por oferecer toda infraestrutura para realização dos experimentos e à UNIT pelo incentivo através do Programa de Qualificação Docente.

Às alunas de IC Luana de Menezes e Camila D'Anzicourt pelo apoio e dedicação. À Maria Anita S. S. de Mendonça pela incansável ajuda nestes dois anos de Mestrado.

Aos parceiros de trabalho de todos os dias Cláudio, Elayne, Denise, Carlos Gustavo, Igor Conceição, Rubens, Gláucia Regina, Ingrid, Luah Walsh, Marcos Prudente, Flávio, Ronaldo e Sandro Luis pelo incentivo e contribuições ao longo desses anos.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero muito obrigado!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PROCESSO INTEGRADO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BETANINA A PARTIR DO *Opuntia ficus-indica* UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS À BASE DE THF E SAIS DE SÓDIO

Ricardo Porto Santos

A palma forrageira da espécie *Opuntia ficus-indica* destaca-se de modo imponente diante do cenário mundial por suas raras características edafoclimáticas, suscitando assim, sobretudo, o interesse da comunidade científica na busca pela obtenção de maior visibilidade no cenário industrial. Graças aos ricos e importantes compostos bioativos presentes em seu fruto, em especial a betanina, o único corante natural, reconhecidamente aprovado como alimento, julga-se assim a necessidade do aperfeiçoamento de técnicas de extração e purificação.

Neste sentido, a extração seguida de sua purificação, haja vista à instabilidade da biomolécula frente a temperatura, luminosidade, pH, etc. Para superar este intento, a extração líquido-líquido por meio dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) poderia ser uma alternativa eficiente para a separação e purificação deste biocomposto. Portanto, o objetivo primordial deste trabalho foi formar novos SABs constituídos a partir de um solvente orgânico e diferentes sais inorgânicos para a purificação da betanina extraída do fruto da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*). O processo de extração utilizou o solvente tetrahidrofurano (THF), considerado um solvente que não teria impacto adverso sobre a saúde humana e, consequentemente, ao meio ambiente. Em seguida, a purificação se deu através da adição de diferentes sais tendo como finalidade a formação de sistemas aquosos bifásicos (SABs), por ser essa a melhor condição encontrada a 6% de Sal (Tampão Citrato de Sódio) e 43% de THF a uma Temperatura de 25°C. Os resultados demonstram que a betanina foi purificada ≈ 13 vezes, comparada com seu extrato em THF e a capacidade antioxidante da mesma foi verificada com um rendimento de 65%. Desta forma foi claramente possível demonstrar e afirmar que a betanina a partir de sua fonte natural pode ser extraída e purificada em processo integrado com os SABs.

Palavras-chave: *Opuntia ficus-indica*, betanina, purificação, sistemas aquosos bifásicos.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of Universidad Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

INTEGRATED PROCESS OF EXTRACTION AND PURIFICATION OF BETANIN FROM *Opuntia ficus-indica* USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS BASED ON THF AND SODIUM SALTS

Ricardo Porto Santos

The forage palm of the species Opuntia ficus-indica stands out in an imposing way before the world scenario due to its rare edaphoclimatic characteristics, thus raising, above all, the interest of the scientific community in the quest for greater visibility in the industrial scenario. Due to the rich and important bioactive compounds present in its fruit, in particular the betanin, the only natural dye, recognized as food, it is believed that there is a need to improve extraction and purification techniques. In this sense the extraction and in sequence its purification, due to the instability of the biomolecule. To overcome this, liquid-liquid extraction using two-phase aqueous systems (SABs) could be an efficient alternative for the separation and purification of this biocomposite. Therefore, the main objective of this work was to form new SABs constituted from an organic solvent and different inorganic salts for the purification of betanin extracted from the fruit of the forage palm (Opuntia ficus-indica). The extraction process used the solvent tetrahydrofuran (THF), considered a solvent that would not have an adverse impact on human health and, consequently, on the environment. Then, the purification were done by the addition of different salts with the purpose of forming aqueous biphasic systems (SABs), as this was the best condition found at 6% Salt (Sodium Citrate Buffer) and 43% Of THF at a Temperature of 25 ° C. The results demonstrate that bethanin was purified 13 times compared to its extract in THF and the antioxidant capacity thereof was checked in 65% yield. In this way it was clearly possible to demonstrate and affirm that betanin from its natural source can be extracted and purified in an integrated process with the SABs.

Keywords: Opuntia ficus-indica, betanin, purification, aqueous two phase systems.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... *viii*
LISTA DE TABELAS ..... *ix*
1. INTRODUÇÃO *1*
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA *5*
2.1. **PALMA FORRAGEIRA (*OPUNTIA FICUS-INDICA*)** 5
2.2. **COMPOSTOS FENÓLICOS** 7
2.3. **BETALAÍNAS** 12
2.4. **BETANINA** 14
2.5. **PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO** 17
2.5.1. ***PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOATIVOS*** 17
2.5.2. ***SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SABS)*** 20
2.6. **DIAGRAMA DE FASES** 22
3. OBJETIVOS ..... *.31*
3.1. OBJETIVO GERAL 31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
4. PRÓLOGO AO CAPÍTULO 5 ..... *31*
5. ARTIGO CIENTÍFICO *33*
6. CONCLUSÃO *68*
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *70*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Fruto da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*).....6

FIGURA 2: Estrutura química de um fenol simples.....8

FIGURA 3: Estrutura química do ácido fenólico.....11

FIGURA 4: Estrutura química das betalaínas.....13

FIGURA 5: Estrutura química da betanina.....14

FIGURA 6: Diagrama de fases em sistemas ternários..... 23

FIGURA 7: Diagrama de fases para um SAB. (a): ▬, curva binodal; ─, linha de amarração (TL); ● ponto crítico - PC. (b): Três sistemas (tubos em azul) pertencentes à mesma linha de amarração..... 24

FIGURA 8: Diagrama de fases para um SAB, onde se tem a curva binodal (▬), a linha de amarração, TL (─), o ponto limite (▮) e o PC (●)..... 25

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Classe de compostos fenólicos.....9

TABELA 2: Quadro cronológico dos (SABs) do período 1896-2015.....20

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica)* é uma espécie que se sobressai no semiárido, tendo contribuído significativamente para a alimentação dos rebanhos nas secas prolongadas (SALES, 2006). Em seu fruto importantes compostos bioativos são encontrados, tais como betalainas, polifenois e carotenoides;(...) são pigmentos naturais solúveis em água encontrados nos vacúolos de algumas espécies de plantas(...) (REIS, 2012). Uma das principais betalainas encontradas é a betanina, que é a única betalaina aprovada para uso como corante em alimentos e é uma boa doadora de elétrons, devido a presença de um grupo fenólico e uma amina cíclica, atuando como antioxidantes. Estudos sugerem que extratos obtidos a partir da fruta da *Opuntia ficus-indica* apresentam potencial de promoção à saúde, especialmente por apresentar propriedades antioxidantes,(...) anti-inflamatórias e propriedades anticancerígenas(...) (CHAVEZ-SANTOSCOY *et al.,* 2009, LIANG *et al.,* 2008 e ZOU *et al.,* 2005*).*

Atualmente, diferentes métodos de extração e purificação (precipitação, centrifugação, técnicas cromatográficas, extração por ultrassom, micro-ondas, agitação, líquidos iônicos) são utilizados para a obtenção destes compostos a partir de diferentes biomassas (KUJALA *et al.,* 2001). O método ideal de extrair biomoléculas, tais como compostos fenólicos e carotenoides têm sido exaustivamente investigado, devido o interesse nos diversos segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Tipicamente, as estratégias de purificação são responsáveis por 20 a 60% do custo total do produto comercializado, no entanto em alguns casos especiais isso pode representar até 80% (RUIZ-RUIZ *et al.,* 2012). Portanto, o desenvolvimento de um processo eficiente e de baixo custo é de extrema importância.

Afim de determinar métodos eficazes nos processos de purificação de biomoléculas, em especial a betanina, importantes fatores devem ser considerados devido à instabilidade deste composto, tais como pH, efeitos da luminosidade, exposição a altas temperaturas e uso de solventes (STINTZING *et al.,* 2003; REYNOSO *et al.,* 1997).

A aplicação do método líquido-líquido por meio dos sistemas aquosos bifásicos (SABs) pode ser uma alternativa para uma eficiente purificação destes biocompostos de interesse industrial. Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são conhecidos desde o final do século XIX (BEIJERINCK, 1896) e têm sido satisfatoriamente estudados para a separação e purificação de moléculas biológicas, tais como DNA, proteínas, enzimas, alcaloides, antibióticos, drogas entre outros (MATOS *et al.,* 2014), e também compostos de origem não orgânica, como os íons metálicos e antibióticos (MANDAL e MANDAL, 2014).

Diferentes SABs foram formados por solvente orgânico hidrofílico e sais inorgânicos, sendo este um método de baixo custo e fácil reciclagem frente a outros métodos de extração e purificação. A escolha do solvente tetrahidrofurano foi seletiva pois o mesmo possui alta capacidade de solvatação (SU *et al.,* 2002), sendo este um aspecto recentemente observado, bem como a escolha por sais de sódio no processo de purificação que foi cautelosamente realizada a fim de atender à necessidade de otimização, objetivando redução nos custos envolvidos e no tempo empregado na realização dos experimentos, não sendo necessário realizar, também, o ajuste do pH, devido ao tamponamento da solução de sódio, tornando o método apresentado ainda mais interessante e sustentável no processo apresentado.

Como a indústria tem demonstrado interesse em produtos cada vez mais naturais, atendendo à necessidade dos consumidores dentro de uma nova realidade

mundial, depara-se com um desafio que é a aplicação em ampla escala dos processos de purificação devido ao alto custo de alguns solventes, a degradação natural de determinadas biomoléculas, bem como manter a temperatura adequada para a efetiva utilização em escala industrial.

A espécie *Opuntia ficus-indica* da palma forrageira é muito utilizada como alimento na região nordeste não só em rebanhos como também na alimentação humana. Nessa perspectiva e a partir da comprovação do uso da betalaina como corante natural, visto sua utilização em ampla escala como um fator motivador através do processo integrado de extração e purificação utilizando os SABs, potencializando os possíveis benefícios à saúde que a betanina purificada pode proporcionar.

Portanto, de forma a otimizar o uso deste composto, foi proposto um processo de purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos integrado à extração. Desta forma, foi realizado um planejamento de experimentos para se obter o melhor conteúdo de betanina, em seguida foi adicionado diferentes sais de sódio, para induzir a formação dos sistemas aquosos bifásicos. Todos os diagramas de fases foram determinados experimentalmente e em seguida aplicados para a purificação da betanina. Condições como, tipo de sal, concentração de THF e sal, pH e temperatura de equilíbrio do sistema foram avaliados.

Capítulo 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica*)

Opuntia é uma planta xerófila que compreende cerca de 200-300 espécies e cresce principalmente em zonas áridas e semiáridas. No entanto, apenas 10 a 12 espécies são utilizadas pelo homem, para produção de alimentos e corantes (STINTZING e CARLE, 2005). Esta planta pertence ao Reino Plantae, Classe *Dycotyledonea*, Subclasse *Dialipetalas*, Ordem *Caryophylales*, Família *Cactaceae*, Gênero *Opuntia*. O seu nome científico foi atribuído por Tourneford em 1700, devido à sua semelhança com uma planta espinhosa que crescia em uma cidade da Grécia, Opus (SÁENZ *et al.,* 2006).

Existe um enorme interesse nas cactáceas do gênero Opuntia, mais especificamente na *Opuntia ficus-indica*, por sua facilidade em sobreviver em zonas áridas e semiáridas (BARBERA *et al.,* 2001). Em função da sua variabilidade genética esta planta possui uma grande adaptabilidade podendo ser encontrada em locais com climas diferentes, como o continente de África, América e Austrália. Em diferentes países são atribuídas denominações comuns diferentes a *Opuntia ficus indica*: na Espanha denomina-se *higo de Índicas*, em Portugal *Figo da Índia*, *Figueira da Índia, Piteira* ou *Figo do Diabo*, na Itália *Fico d'India*, França *Figue de Barbarie*, no EUA e África do Sul *Prickly pear* ou *Cactus pear* e no Brasil *Palma Forrageira* (SÁENZ *et al.,* 2006).

Plantas do gênero *Opuntia* constituem importante recurso forrageiro, contribuindo para suprir a oferta de alimento aos animais no período de estiagem, devido ao alto valor nutritivo, com alta disponibilidade de água, quando comparada com a vegetação nativa (ARAÚJO FILHO *et al.,* 2002). Contudo, alimentos naturais que apresentem grande fonte compostos bioativo, têm recebido recentemente imensa atenção dos profissionais de saúde, bem como dos consumidores, devido a descoberta de seu potencial na promoção à saúde. Neste contexto, os compostos presentes na *Opuntia ficus-indica* surgiram como candidatos promissores contra várias doenças atualmente diagnosticadas em seres humanos (ANDRADE *et al.,* 2006)

A palma, nome popular dado à cactácea pertencente à família *Opuntia*, cresce e se desenvolve, produzindo forragem e frutos, mesmo que as condições climáticas sejam desfavoráveis. Este cultivo tem sido de extrema importância na região do nordeste brasileiro, uma vez que a exploração dos chamados "raquetes" como complemento alimentar para os animais, bem como para os humanos, tem contribuído para a subsistência em muitas localidades do semiárido nordestino (GRANGEIRO *et al.,* 2007).

Até a década de 1980, esta cactácea foi vista apenas como complemento alimentar. Porém, a partir deste período o foco de utilização da palma passou da forragem para a obtenção de biomoléculas de valor agregado. Assim, houve um crescente interesse por parte dos pesquisadores, em especial no fruto desta forrageira, a qual é apresentada na Figura 1, abaixo (PIGA *et al.,* 2004).

Figura 1: Aspecto do fruto da palma (*Opuntia ficus-indica*).

Vários são os benefícios de sua ingestão, entre os quais destacamos a riqueza em açúcar e a considerável quantidade de potássio, magnésio, cálcio e vitaminas A, B_1, B_2 e C, esta cactácea ainda não conquistou espaço no mercado brasileiro, talvez por conta do desconhecimento da fruta (EL-RAZEK e HASSAN, 2011). Como exemplo de seu potencial tecnológico, pesquisadores testaram a produção de adoçante natural à base do fruto da Palma Forrageira e compararam sua eficácia ao mel e à geleia, sendo apresentada maior estabilidade ao ataque de bactérias durante o período de estocagem (SAÉNZ *et al.,* 1998).

Pesquisas relatam o potencial dos frutos de Opuntia como fonte de antioxidantes naturais, levando a crer que seu consumo ou de seus produtos pode contribuir com quantidades significativas de antioxidantes na dieta (SAÉNZ *et al.,* 2009). A capacidade antioxidante dos frutos pode ser atribuída aos flavonoides, ácido ascórbico e carotenoides presentes, além de compostos fenólicos. Estudos demonstraram a atividade protetora do suco de Opuntia fólico contra úlcera e câncer (GALATI *et al*., 2002). Além disto, o fruto apresenta alto conteúdo de açúcar, principalmente frutose e glicose (11-12%), baixa acidez (0,02%) e considerável conteúdo (31-38 mg 100 g^{-1}) de vitamina C (GURRIERI *et al.,* 2000).

2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de substâncias mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 10.000 estruturas quimicamente heterogêneas. A estrutura química destes compostos é caracterizada pela presença de hidroxilas e anéis aromáticos que confere poder antioxidante, conforme é observado na figura 2. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (ANGELO *et al.,* 2007).

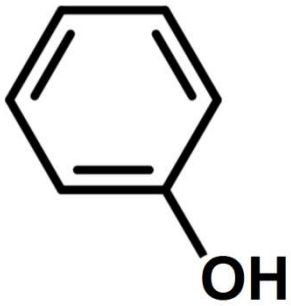

Figura 2: Estrutura química do fenol simples.

Neste aspecto, antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às reações de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres. Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos (ZHENG e WANG, *et al.,* 2001).

O consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no

organismo (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ *et al.,* 2004). Isto ocorre por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, por meio da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (RAMALHO e JORGE, 2006).

Os antioxidantes fenólicos funcionam sequestrando radicais e algumas vezes como agente utilizado para capturar, transportar e/ou eliminar substâncias (principalmente metais) do organismo, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente à sua toxicidade (SOARES, 2002).

Com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, a fim de diminuir sua quantidade nos alimentos, uma vez que há indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos é que diversas pesquisas têm sido realizadas e centralizam-se nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois eles agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes, além de atuarem também nos processos oxidativos catalisados por metais, uma vez que são largamente utilizados na conservação de alimentos, podendo aumentar a vida útil de muitos produtos entre 15 e 200% (DURÁN e PADILLA *et al.,* 1993; HO *et al.,* 1992).

As várias estruturas dos compostos fenólicos devem-se, principalmente, às combinações que acontecem na natureza (HARBORNE JB *et al.,* 1999).

Os compostos fenólicos compõem a grande classe dos fitoquímicos alimentares, segundo apresentado na Tabela 1. Conforme já mencionado, existe uma grande variedade de compostos fenólicos, devido à sua diversidade estrutural, que são classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo, diferenciam-se em flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides. Encontram-se geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos (KARAKAYA *et al.*, 2004).

Tabela 1: Classe de compostos fenólicos (HARBORNE *et al*., 1989).

Classe	**Estrutura**
Fenólicos Simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6 – C_1$
Acetofenol, Ácidos fenilacéticos	$C_6 – C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6 – C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 – C_4$
Xantonas	$C_6 – C_1 – C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 – C_2 – C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6 – C_3 – C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6 – C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6 – C_3 – C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 – C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 – C_3 – C_6)_n$

Os não flavonóides são chamados de ácidos fenólicos, que contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais, conforme apresentado na figura 3. Outros compostos de natureza fenólica são os

estilbenos, lignanos e, de forma polimerizada, os taninos e ligninas (MANACH *et al.*, 2004).

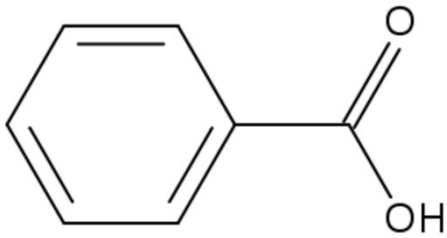

Figura 3: Estrutura química do ácido fenólico.

De modo geral, os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado por meio do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio; reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, *et al.*, 2007).

Os compostos polifenólicos atuam por mecanismos variados, dependendo da sua concentração e do tipo de composto presente no alimento, podendo existir sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos (HASSIMOTTO *et al.,* 2005).

O grau de hidroxilação e a posição dos grupos hidroxila na molécula dos compostos fenólicos estão entre os mais importantes fatores que determinam sua atividade antioxidante. Os compostos fenólicos são abundantemente distribuídos entre as diferentes partes das plantas, porém sua maior concentração está nas frutas, nas hortaliças e em seus derivados (LIU, 2005). Também em cereais e leguminosas são encontrados em concentrações consideráveis. Os diferentes alimentos de origem vegetal

contêm diferentes tipos de compostos fenólicos, em concentrações muito variáveis (SOARES, *et al.*, 2008).

Nos vegetais, os compostos fenólicos estão presentes na forma de glicosídeos. A ação de enzimas pode, no entanto, liberar as correspondentes agliconas, às quais se atribui maior capacidade antioxidante que aos glicosídeos correspondentes (RICE-EVANS *et al.,* 1996).

Tendo em vista diversas funções relacionadas aos compostos fenólicos no organismo animal, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar e purificar tais compostos a partir de fontes naturais (AHMAD-QASEM, M. *et al.,* 2013; WANG e ZUO, 2011), visando à prevenção da deterioração oxidativa de nutrientes, com o objetivo de evitar o uso de antioxidantes sintéticos, uma vez que sua utilização tem trazido prejuízos à saúde humana, como câncer e envelhecimento precoce das células (MELO e GUERRA, *et al.,* 2002).

2.3 Betalaínas

Por se tratar de um corante natural não tóxico, as betalaínas são pigmentos nitrogenados solúveis em água utilizadas como fonte de corantes naturais alimentares. Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse industrial em produtos com potenciais benefícios à saúde e com características não tóxicas, uma vez que alguns pigmentos sintéticos são considerados tóxicos e nocivos. Por isso há uma demanda por equivalentes naturais (WYBRANIEC, *et al.,* 2005).

Betalaínas aplicam-se a duas classes de compostos pigmentares encontrados mais abundantemente na beterraba, definidas quimicamente como derivadas do ácido betalâmico (CHETANA *et al.*, 2007).

O ácido betalâmico é o precursor comum destes compostos fenólicos que podem ser divididos em dois grupos estruturais: as betacianinas (do latim *beta*, beterraba vermelha e *kyanos*, cor azul, pigmento vermelho-púrpura) e as betaxantinas (do latim *beta*, beterraba vermelha e do grego *xanthos* amarelo, pigmento amarelo) cuja estrutura é apresentada na Figura 4 (CAI *et al.,* 2005).

As betalaínas são mais solúveis em água do que as antocianinas e possuem uma força tintorial, ou seja, força dos pigmentos e corantes, até três vezes maior do que as antocianinas. As betalaínas são particularmente interessantes pela sua estabilidade que varia de pH 3 a 7, tornando-as adequadas para a aplicação em uma ampla variedade de alimentos neutros e de baixa acidez. Apesar de serem mais solúveis em água, estáveis em uma ampla faixa de pH e adequadas para colorir alimentos de baixa acidez, as betalainas são menos comumente usadas no processamento de alimentos (STRACK *et al.,* 2003).

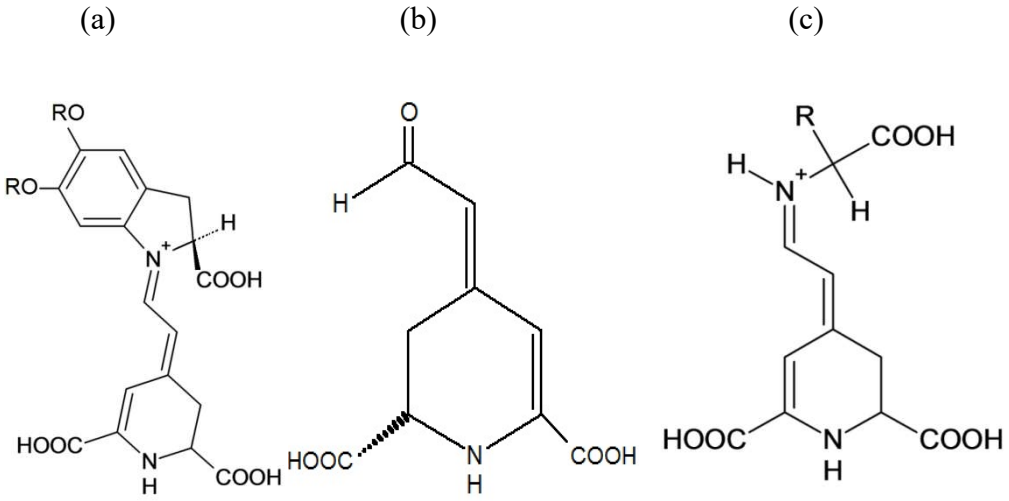

Figura 4: Estrutura química das betalaínas: (a) Betacianinas; (b) Ácido Betalâmico e (c) Betaxantinas (Fonte: DELGADO-VARGAS e PAREDÉZ-LOPEZ *et al.,* 2002)Dentre suas propriedades funcionais, as betalaínas caracterizam-se por apresentar propriedades

antioxidantes, anti-flamatórias, anticancerígenas e antimicrobianas (HARLEV *et al.,* 2013)

Uma das principais betalaínas encontradas é a betanina, que é uma betanidina 5-O- glicosídeo contendo um grupo fenólico e uma amina cíclico, ambos bons doadores de elétrons que atuam como antioxidantes, conforme apresentado na Figura 5 (KANNER *et al.,* 2001).

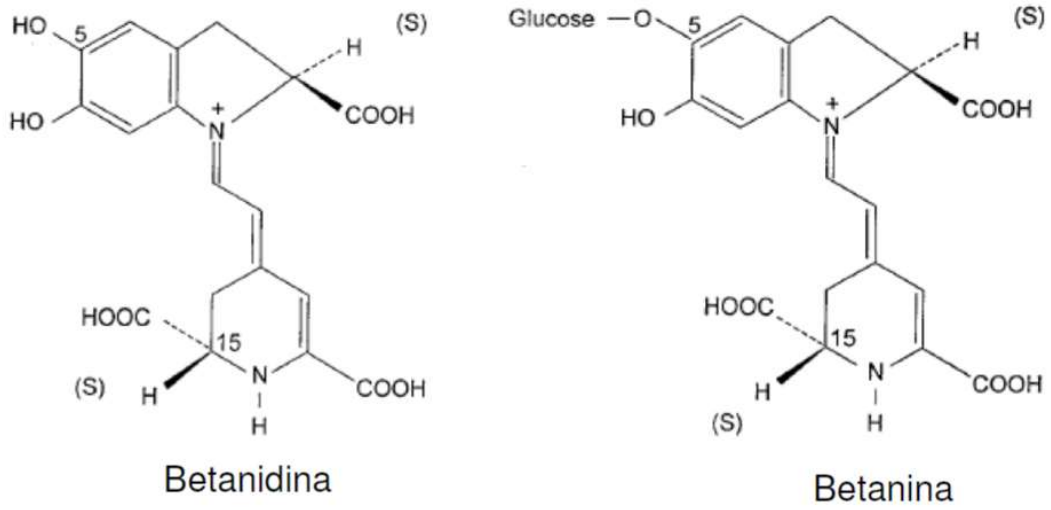

Figura 5: Estrutura química da betanina (Fonte: CHIARELLO; LUCAS, 2013).

2.4 Betanina

A betanina (CI Natural Red 33, E-number E162, betanidin 5-Ob-glucoside) é a única betalaína aprovada para utilização em alimentos (DELGADO-VARGAS *et al.,* 2000). Entretanto, a purificação de grandes quantidades de qualquer betalaína se torma um processo dificiltoso devido à sua instabilidade. A saber, a estabilidade das betaninas é fortemente influenciada por açúcares, luminosidade, oxigênio, atividade de água, pH e temperatura (NAYAK *et al.,* 2006).

Ainda a respeito da sua estabilidade, a betanina depende do pH (excelente estabilidade entre pH 4 e 5 e razoável entre pH 3 e 4 e pH 5 e 7). Seu espectro de cor encontra-se de pink a vermelho. Torna-se instável em presença de luz e oxigênio, sendo destruída quando submetida a altas temperaturas (VOLP *et al.,* 2009).

Acima de pH 10, a cor apresentada é amarela, devido à liberação de ácido betalâmico resultante da hidrólise alcalina da betanina ao ácido betalâmico e glicosídeo. A intensidade da absorção na região de 540-550 nm continua a diminuir. O espectro das soluções de betanina a pH 2,0, 5,0 e 9,0 mostram que o espectro de absorção no visível de vulgaxantina (responsável pela coloração amarelada) na gama de pH 4,5 a 8,5 é idêntico a um máximo de absorção a 476 nm de pico. Abaixo de pH 4,5, o pico máximo de absorção varia em direção a um comprimento de onda mais curto (460 nm) (NILSSON, *et al.,* 1970).

Temperatura: A estabilidade das soluções de betaninas e dos alimentos contendo betanina, depende também do pH, conforme amplamente mencionado anteriormente e da temperatura, fator este que restringe seu uso como corante alimentício. Estudos realizados em modelos de soluções de betalaínas, indicam que a categoria ao qual a betanina se degrada segue uma reação cinética de primeira ordem. Isto se dá em condições aeróbias, mas o desvio ocorre em condições anaeróbias. Quando as soluções de pigmentos de betanina são expostos a diferentes temperaturas e em tempos diferentes, a intensidade da sua cor diminui gradualmente, apresentando-se em coloração marrom claro. Esta mudança de cor é produzida pela diminuição da quantidade de betanina após o aquecimento (STINTZING *et al.,* 2003).

Luz: As betalaínas são sensíveis a diferentes radiações como por exemplo: a luz visível, UV e irradiação gama. Existe evidencia de que a destruição de foto-oxidação

destes pigmentos é devido ao oxigênio molecular. Estudos mostraram que a degradação de foto oxidação dependia de o pH ser superior a um valor de 3 a 5. Foi possível descobrir que betanina exposto a luz sofreu degradação de 15,6 ± 0,5% e a exposição à luz e oxigênio de 28,6 ± 0,5% (HERBACH *et al.,* 2006).

Antioxidantes: uma propriedade funcional importante, exercida pelas betalainas, é a atividade antioxidante. Um antioxidante é uma molécula que evita a formação de radicais livres descontrolada ou inibe as suas reações com as estruturas celulares. Como parte do envelhecimento normal do organismo humano um número considerável de substâncias quimicamente instáveis são produzidas, conhecidas principalmente como radicais livres, (CHIHUAILAF *et al.,* 2002).

Atualmente o uso de betanina como corante é indicado para alimentos que durante o processamento não sejam submetidos a temperaturas muito altas e que tenham tempo curto de armazenamento. Devido à sua cor vermelho-azulada, misturas de betanina com outros pigmentos dão melhores resultados quanto à aparência dos alimentos. Para a aplicação como corante de alimentos para confeitarias, é feito um suco que primeiro é fermentado com leveduras a fim de eliminar a alta concentração de açúcares e, depois, seco até que se obtenha um pó com 6 a 7% de betacianinas (COULTATE *et al.,* 2004).

Encontrar um método de isolamento eficaz para betalaínas e seus derivados é muitas vezes problemático, normalmente a purificação por HPLC apresenta uma ação catalítica da fase estacionária sólida causando a degradação do pigmento (SPÓRNA-KUCAB *et al.,* 2013). Portanto, a escolha de uma técnica adequada para a purificação de betalaínas é um desafio, prinicpalmente em função da sua baixa estabilidade

(GONÇALVES *et al.,* 2013; STINTZING e CARLE *et al.,* 2007; WYBRANIEC *et al.,* 2005).

A pesquisa sobre técnicas de estabilização de corantes naturais busca melhorar sua estabilidade ampliando seu uso e, consequentemente, diminuindo seu custo. Portanto, a aplicação de modelos para predizer e interpretar parâmetros cinéticos como a ordem de reação, a taxa de reação e a energia de ativação são essenciais. Ainda, modelos cinéticos de destruição térmica são essenciais para desenvolver novos processos, assumindo um produto alimentício seguro e com permanência da qualidade (ÁVILA e SILVA *et al.,*1999).

A betanina, em sua estrutura, apresenta três grupos carboxílicos ionizáveis. Isto faz com que este composto varie facilmente as alterações de pH (PETERSON e JOSLYN *et al.,* 1960). Em uma faixa de pH que varia entre 3 e 7, os espectros visíveis das soluções de betaninas são idênticos e apresentam uma máxima absorbância entre 537 a 538 nm, não ocorrendo mudança alguma de cor para estes valores de pH. Abaixo de pH 3 ocorre uma alteração de cor para violeta e a máxima absorção varia para um comprimento de onda mais curto (534-536 nm).

Acima de pH 7, ocorrem mudanças de absorção para quanto maior for o comprimento de onda (543-544 nm a pH 9). Essas mudanças são acompanhadas por uma marcada alteração de cor do vermelho ao violeta (JACKMAN e SMITH *et al.,* 1992).

Acima de pH 10, a cor apresentada é amarela, devido à liberação de ácido betalâmico resultante da hidrólise alcalina da betanina ao ácido betalâmico e glicosídeo. A intensidade da absorção na região de 540-550 nm continua a diminuir. O espectro das soluções de betanina a pH 2,0, 5,0 e 9,0 mostram que o espectro de absorção no visível

de vulgaxantina (responsável pela coloração amarelada) na gama de pH 4,5 a 8,5 é idêntico a um máximo de absorção a 476 nm de pico. Abaixo de pH 4,5, o pico máximo de absorção varia em direção a um comprimento de onda mais curto (460 nm) (NILSSON, *et al.,* 1970).

2.5 Processos de extração e purificação

Para a aplicação de biomoléculas em setores industriais faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de extração e, dependendo do grau de pureza exigido da aplicação, um procedimento de purificação adequado deve ser desenvolvido.

2.5.1 Processos de extração e purificação de bioativos

Conhecida como extração por solvente ou partição, este método visa separar um ou mais componentes de uma mistura heterogênea de líquidos tomando como base suas diferentes solubilidades em dois líquidos diferentes que não se misturam, sendo normalmente utilizados água e um solvente orgânico (KNEZ *et al*., 2014; FACCHIN E PASQUINI, 1998).

Adequação e rigorosidade são duas características fundamentais se tratando de um procedimento de extração e purificação de biomoléculas (HATTI-KAUL *et al.,* 2001). A idealidade no que diz respeito à extração deve ser obtido através de quantificação e não destruição da biomolécula. Encontra-se na literatura, relatos de métodos de extração, separação e identificação de biomoléculas a partir da biomassa utilizando solventes orgânicos (ZHANG *et al.,* 2013), além de outras técnicas, como a extração supercrítica (DIMITRIESKA-STOJKOVIC e ZDRAVKOVSKI *et al.,* 2003), extração assistida por micro-ondas (ZHANG *et al.,* 2009) e extração assistida por ultrassom (YANG e ZHANG *et al.,* 2008).

A utilização de solventes orgânicos é comumente associada à purificação de biomoléculas, tendo como vantagens a obtenção de maior grau de pureza, seletividade adequada e baixo custo. Importante ressaltar que o método de extração por solventes favorece uma boa combinação entre os passos de recuperação e purificação (MARINOVA e YANICHLIEVA *et al.,*1997). Diversos fatores influenciam diretamente o funcionamento da utilização de solventes orgânicos, a saber o tipo de solvente utilizado, a agitação empregada para melhorar a solubilidade e eficiência do processo de transferência de massa (PEDERSEN-BJERGAARD *et al.,* 2000).

Outra técnica alternativamente empregada é conhecida como extração supercrítica, quando o líquido e o gás utilizados são impossíveis de serem distinguidos entre si, apresentando assim características tanto de um gás como de um líquido. A extração realizada com fluido supercrítico utiliza um fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico modificando propriedades como a densidade, tornando-a similar a dos líquidos; e a viscosidade, a qual passa a apresentar valores próximos aos determinados para os gases (HERRERO *et al.,* 2006).

Um fluido bastante utilizado em meio pressurizado, devido à sua baixa temperatura, de 31,3 °C e pressão crítica, de 72,9 atm é o dióxido de carbono (CO_2). Porém, o CO_2 supercrítico possui um menor efeito nas extrações de biomoléculas de alta polaridade. Por esta razão a adição de outros solventes como metanol e etanol nos processos pode ser uma alternativa (RAVENTÓS *et al.,* 2002).

O uso de processos de extração assistida por micro-ondas para biomoléculas é uma alternativa viável apesar do alto custo para determinação de contaminantes orgânicos em amostras ambientais (ZHANG *et al.,* 2013). A utilização do ultrassom em processos de extração tem apresentado um rápido desenvolvimento, com diversas

aplicações para a extração de metabólitos de plantas, polissacarídeos, dentre outros, (YANG *et al.,* 2008). Este método utiliza-se dos fenômenos físicos e químicos, apresentando vantagens em termos de rendimento, produtividade e seletividade. As ondas ultrassônicas de alta potência produzidas causam mudanças físicas e químicas devido à variação de pressão, produzindo bolhas de vapor ou de gás e micro fluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás (CHEMAT *et al.,* 2011).

Técnicas alternativas de extração e separação de biocompostos como a extração realizada com fluido supercrítico e ultrassom, requerem temperaturas e pressões elevadas, além de sofisticação e modernidade de equipamentos, onerando o processo de extração além de torna-lo complexo. Contudo, a escolha da técnica de separação e purificação de biomoléculas a ser utilizada deve ser feita levando em consideração o grau de purificação necessário para sua aplicação em escala industrial (ZUÑIGA et al., 2003).

Ao escolher a técnica de extração e purificação, então, deve-se levar em consideração o custo-benefício das alternativas disponíveis. O objetivo, deve ser encontrar métodos eficazes, com alta eficiência, porém simples e de baixo custo.

Ao compararmos as técnicas supracitadas, a partição em sistema aquoso bifásico (SAB) apresenta-se como uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de biomoléculas. As vantagens oferecidas por este tipo de sistema são: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua, alta sensibilidade no reconhecimento das interações das biomoléculas (SELVAKUMARA *et al.,* 2010) e muitas vezes ambientalmente

corretas pois suas fases são predominantemente formadas por água (60-95%) (SILVA e LOH *et al.,* 2006).

2.5.2 Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs)

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) foram relatados inicialmente no final do século XIX, por volta de 1896, quando Martinus Beijerinck observou a separação espontânea em duas fases líquidas e límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel (BEIJERINK *et al.,* 1896). Beijerinck notou que a fase inferior se tornou rica em ágar e na fase superior rica em gelatina. Ostwald e Hertel, em estudos posteriores, no ano de 1929, verificaram que para variadas fontes de amido, diferentes concentrações eram necessárias para a separação das fases.

Tabela 2 - Quadro cronológico dos (SABs) do período 1896-2015.

Ano	Estudo	Autores
1896	Observou a separação espontânea em duas fases líquidas e límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amidosolúvel	Martinus Beijerinck
1947	Estudaram a miscibilidade de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos, e a ocorrência ou não de separação de fases.	Dobry e Boyer-Kawenoki
1958	O primeiro a observar uma proteína quando introduzida em um sistema aquoso bifásico, e a percebe que essa biomolécula repartiu se em duas fases desiguais.	Albertsson
1971	Realizaram a primeira publicação com relatos de resultados referentes a tensão interfacial de SABs em sistemas constituídos por PEG e Dextrana.	Ryden e Albertsson
1984	Perscrutaram o sistema PEG e propuseram uma relação exponencial entre a tensão interfacial e a diferença de composição entre as duas faces.	Broocks e colaboradores
2003	Iniciadores a mostrar que as soluções aquosas de líquidos iônicos à base de	Roger e colaboradores

	imidazólio podem formar SAB.	
2007	Observaram a participação de biomoléculas em sistemas acetonitrila e água à baixa temperatura.	Gu e Zhang
2010	Utilização de líquidos iônicos como adjuvantes na formação de sistemas bifásicos por PEG/sulfato.	Pereira e colaboradores
2012	Utilização dos SABs formados por K_2HPO_4/H_2O/NaCl e sais de fosfato em uma das fases coexistentes com o objetivo de avaliar a capacidade de SABs.	Reis e colaboradores
2015	Utilizaram líquidos iônicos a fim de purificar lipases.	Souza e colaboradores

Fonte: autoria própria.

De forma geral, a formação dos SABs ocorre quando são misturados acima de certa concentração crítica resultando em duas fases imiscíveis, onde o maior constituinte é água (GARZA-MADRID *et al.,* 2010). Acima deste ponto, as composições e temperaturas dividem-se em composições diferentes, porém em equilíbrio termodinâmico (VENTURA *et al.,* 2011). A aplicação do SAB na separação de vários biocompostos tem sido estudada por diversos pesquisadores, conforme amplamente explicitado anteriormente. A quantidade de reagentes químicos consumidos, como sais e polímeros, determina a competitividade entre a extração com SAB e as outras técnicas de biosseparação (COIMBRA *et al.,* 2003).

Os SABs apresentam vantagens como elevada biocompatibilidade com os solutos, baixo custo, processamento rápido e que permitem a partição de biomoléculas e partículas celulares de diversas origens em condições não-desnaturantes (SOUZA *et al.,* 2010). Nos últimos anos tem-se diversificado os constituintes dos SABs com o uso de carboidratos, líquidos iônicos e solventes orgânicos hidrofílicos. SABs formados por solventes orgânicos hidrofílicos e sais inorgânicos têm sido propostos e utilizados para

o estudo de partição de diferentes biomoléculas, como proteínas, aminoácidos e outros produtos naturais (CARDOSO *et al.,* 2014; REIS *et al.,* 2014).

A principal característica da utilização desta técnica é o elevado conteúdo de água nas fases (entre 85% e 95%), permitindo a partição de biomoléculas e partículas celulares de diversas origens em condições não-desnaturantes. Além disso, os SABs apresentam vantagens que incluem a rápida separação de fases, alta eficiência de extração, baixa viscosidade, alta polaridade, baixo custo e fácil reciclagem (OOI *et al*., 2009)

2.6 Diagrama de Fases

Diagramas de fases expressam a concentração dos componentes de um sistema. Em sistemas chamados ternários (três componentes), as fases são representadas por diagramas de fase triangulares, ou ternários, onde a composição é indicada por um ponto em um triângulo equilátero como mostrado na Figura 6.

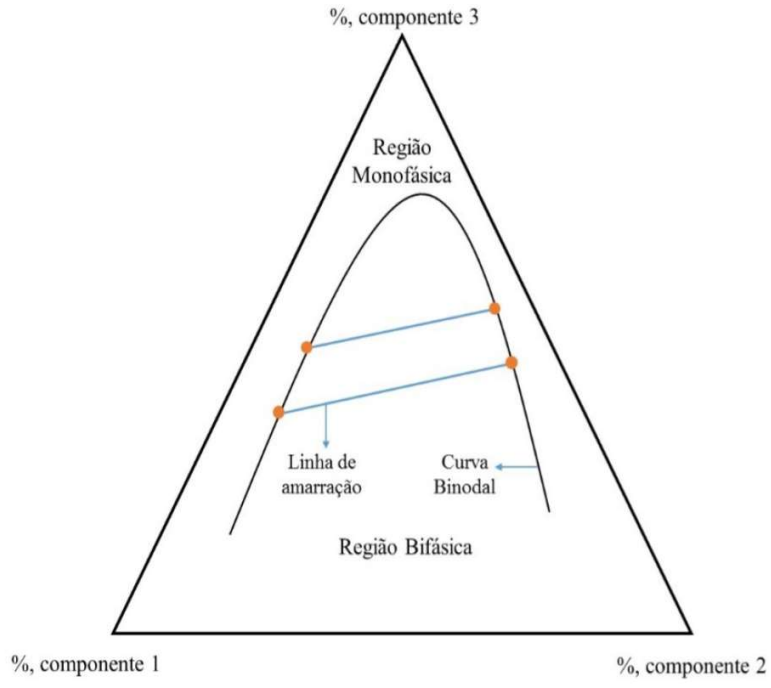

Figura 6: Diagrama de Fases em Sistemas Ternários.

Para sistemas aquosos bifásicos, a concentração de água é bastante elevada (40 – 80%, m/m). Costuma-se utilizar a forma de eixo cartesiano para representá-lo (Figura 7 (a)), excluindo-se a composição de água (ZASLAVSKY, 1995). Observa-se a composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico, os quais são expressos em diferentes unidades correspondentes às frações molares ou mássicas.

Normalmente unidades de concentração em mol (mol.Kg^{-1}) são utilizados para evitar altas diferenças ocasionadas pelas diferentes massas moleculares dos solutos envolvidos na formação do SAB. Entretanto, para fins de extração ou purificação a maioria dos dados da literatura correspondem à unidade de fração mássica (%, m/m). Geralmente compara-se a eficiência ou os rendimentos de extração em função das composições de mistura (em termos mássicos) entre os SABs (FREIRE *et al.,* 2012).

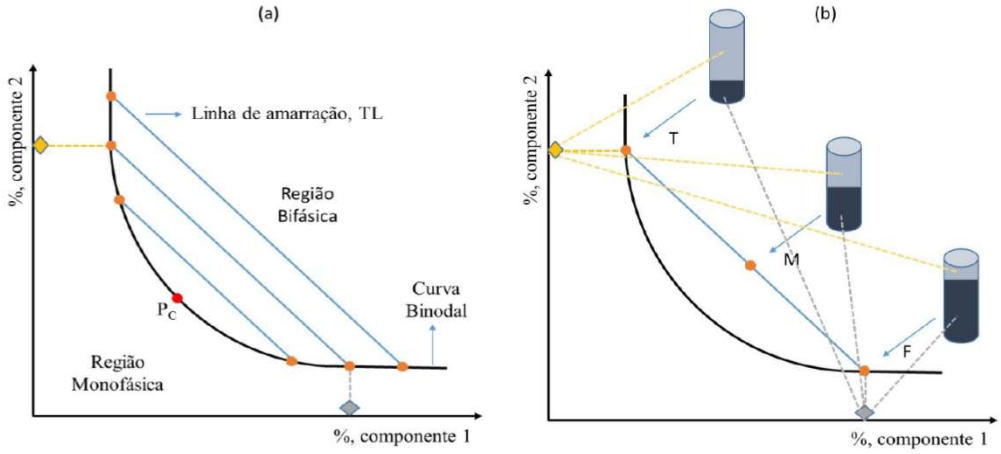

Figura 7: Diagrama de fases para um SAB. (a): ▬, curva binodal; ─, linha de amarração (TL); ●, ponto crítico - PC. Acima da curva binodal o sistema é bifásico abaixo dela o sistema é monofásico; (b): Três sistemas (tubos em azul) pertencentes à mesma linha de amarração. As composições das fases superiores e inferiores são representadas. (Fonte: SOUZA, R. L., 2014)

Em sistemas bifásicos, a composição total da mistura dos componentes é representada pelo ponto de mistura (M) (Figura 7 (b)). A mistura então é separada em duas fases, que contêm as frações dos constituintes formadores. As composições destas duas fases são representadas pelos pontos da fase de topo (T) e da fase de fundo (F). A união destes pontos forma a linha de amarração, ou tie-lines (TL). A partir da união dos pontos extremos de cada linha de amarração forma-se a curva binodal, a qual separa o diagrama em duas regiões. Acima da curva binodal tem-se a região bifásica e abaixo a monofásica. O ponto PC é definido como ponto crítico, neste ponto a composição e o volume das fases coexistentes são iguais e podem fornecer coeficientes de partição igual a 1 (KULA *et al.,* 1982; ZASLAVSKY, 1995; GLYK *et al.,* 2014). O ponto crítico pode ser obtido pela intersecção de uma linha que passa pelo ponto médio de várias TL com a binodal. O ponto médio é representado pelo ponto limite, que é o ponto onde a binodal é tangente à linha que une os segmentos iguais nos eixos do diagrama (Figura 8). A posição relativa do ponto limite e do PC define a simetria do diagrama de fases (YU *et al.,* 2011; GLYK *et al.,* 2014).

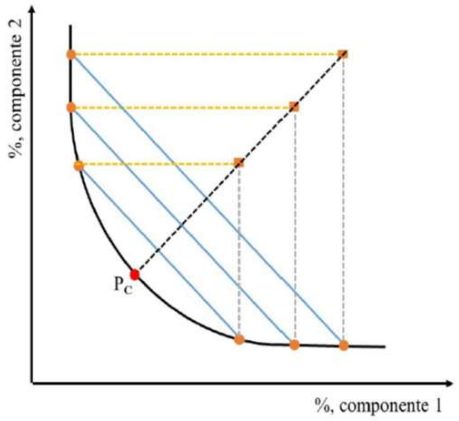

Figura 8: Diagrama de fases para um SAB, onde se tem a curva binodal (▬), a linha de amarração, TL (─), o ponto limite (■) e o PC (●). Fonte: Tese de Doutorado, SOUZA, R. L., 2014.

As curvas binodais podem ser determinadas por diferentes métodos. A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o mecanismo mais preciso para a determinação da composição das fases que formam o SAB (ALBERTSSON, 1986; PLANAS *et al.,* 1997). Por outro lado, um método bastante utilizado devido à simplicidade e rapidez baseia-se em um processo de titulação entre os componentes que formam os sistemas, porém o método alicerçar-se na observação visual de mudança das fases, o que pode aumentar o grau de incerteza da determinação. Este método é extensivamente o mais utilizado e comumente chamado "cloud-point tritation" (CAO *et al.,* 2008; CLAUDIO *et al.,* 2011; VENTURA *et al.,* 2012; CARDOSO *et al.,* 2014; GLYK *et al.,* 2014). O procedimento experimental consiste em duas etapas principais: (i) adição gota a gota de uma solução aquosa contendo o componente 1 (agente salting-out) em uma solução aquosa contendo o componente 2 (ou o componente em seu estado puro) até que uma solução turva e bifásica ou vice-versa seja observada (Figura 7 (a)); (ii) adição gota a gota de água, até a formação de uma solução transparente e límpida que corresponde ao regime monofásico (Figura 7 (b)). As composições dos sistemas são determinadas pela quantificação da massa (g).

Para correlacionar os pontos experimentais que descrevem os sistemas à base de polímeros, Merchuk *et al.,* (1998) propôs um modelo matemático com três parâmetros ajustáveis (Equação 1). Além deste, outros modelos empíricos (Equação 2) também são utilizados para correlacionar os dados binodais de sistemas polímero-sal (REGUPATHI *et al.,* 2009; RAJA *et al.,* 2013). Para o ajuste de curvas binodais formadas por solventes orgânicos como etanol e metanol com a presença de sais, geralmente são considerados os ajustes descritos pela Equação 3 (KATAYAMA *et al.,* 2008; WANG *et al.,* 2010).

$$w_1 = A\, e^{[(Bw_2^{0,5})-(Cw_2^3)]} \quad (1)$$

$$w_1 = A + Bw_2^{0,5} + Cw_2 \quad (2)$$

$$w_1 = A + Bw_2^{0,5} + Cw_2 + Dw_2^2 \quad (3)$$

onde: w1 e w2 são as percentagens em fração de massa do componente 1 e do componente 2, respectivamente. Os parâmetros de ajuste A, B, C e D são obtidos pela regressão dos mínimos quadrados.

As tie-lines (TL) são comumente determinadas pelo método de Merchuck e colaboradores (1998), que consiste na seleção de um ponto dentro da região bifásica (ponto M, na Figura 7, b). A mistura é pesada e misturada cuidadosamente, após atingir o equilíbrio as fases de topo e fundo são separadas e pesadas. Cada TL individual será determinada pela aplicação de regra da alavanca na relação entre a composição mássica da fase de topo e do sistema global. A determinação da TL é acompanhada pela resolução das seguintes Equações 4 a 7 (MERCHUK,1998).

$$Y_T = \left(\frac{Y_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{(1-\alpha)}{\alpha}\right) Y_B \quad (4)$$

$$X_T = \left(\frac{X_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{(1-\alpha)}{\alpha}\right) X_B \quad (5)$$

$$Y_T = f(X_T) \quad (6)$$

$$Y_F = f(X_F) \quad (7)$$

onde: f (X) é a função que representa a binodal, o subscrito M, T e F denotam a mistura, fase de topo e fase de fundo, respectivamente. O valor de α é a razão entre a massa de topo e da massa total da mistura.

O comprimento da linha de amarração (usualmente referido como TLL, do inglês Tie Line Length) é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição (SARAVANAN *et al.,* 2008; SOUZA *et al.,* 2010; PEREZ *et al.,* 2013). O comprimento da linha de amarração pode ser calculado aplicando a Equação 8 (SILVA, 2006).

$$TLL=[(\Delta w_1)^2+(\Delta w_2)^2]0{,}5 \quad (8)$$

onde: Δw1 e Δw2 são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente.

A determinação do ponto crítico (PC) para sistemas ternários é estimada aplicando a Equação 9 (FREIRE *et al.,* 2012).

$$Y=f+gX \quad (9)$$

onde: Y e X são as composições do componente 1 e 2, respectivamente. f e g são parâmetros de ajuste.

Os parâmetros termodinâmicos como calor específico (C_P), entalpia (H), entropia (S) e energia livre de Gibbs (G), também são importantes para descrever as propriedades de qualquer sistema em equilíbrio (COOPER, 1999). A determinação da partição de uma biomolécula em SAB é determinada pela teoria de Flory-Huggins, que descreve a energia necessária para a obtenção da energia livre de Gibbs (ΔG_m^0). Para este propósito, a variação do calor específico (ΔC_P) é o principal parâmetro termodinâmico utilizado para se obter as variações da entalpia (ΔH_m^0) e da entropia (ΔS_m^0) (Equações 10 e 11, respectivamente) (COOPER, 1999; PESSOA *et al.,* 2004; JOHANSSON *et al.,* 2011).

$$\Delta H_m^0 = \int_0^T \Delta C_P \, dT + \Delta H \, (0) \quad (10)$$

$$\Delta S_m^0 = \int_0^T \left(\frac{\Delta CP}{T}\right) dT \quad (11)$$

onde: ΔH_m^0 é a variação da entalpia (máxima energia de um sistema termodinâmico) e o ΔS_m^0 é a variação da entropia (grau de irreversibilidade de um sistema termodinâmico).

A energia livre de Gibbs é o parâmetro que expressa o equilíbrio molecular, ela indica a direção dos processos, bem como a quantidade de trabalho necessária para que ele ocorra (JOHANSSON *et al.,* 2000; SOUSA *et al.,* 2009; LU *et al.,* 2011). Pode ser expressa em função da energia livre à pressão constante (Equação 12) ou a nível molecular (equação 13).

$$\Delta G_m^0 = \Delta H_m^0 - T\Delta S_m^0 \quad (12)$$

$$\Delta G_m^0 = -RT \ln K \quad (13)$$

onde: R é a constante dos gases e K é a constante de equilíbrio.

Geralmente, estes parâmetros são obtidos pelo ajuste linear da equação que correlaciona o coeficiente de partição (K) e o inverso da temperatura (em Kelvin) (JOHANSSON, 1985).

O coeficiente de partição (K) é uma grandeza adimensional que descreve a migração das biomoléculas entres as fases coexistentes de um SAB, no qual assume o valor numérico da proporção entre as concentrações das biomoléculas na fase superior (topo) e fase inferior (fundo) (Equação 14). A determinação das recuperações dos solutos (também associado à eficiência de extração – EE, %) nas fases de topo (R_T) e fundo (R_F), também são comumente utilizados para avaliar a eficiência dos SABs

(Equação 15 e 16). Já o fator de purificação (P_F) dos solutos é calculado pela razão da atividade específica depois (S_A) e antes (S_{Ai}) do procedimento de extração (Equação 17). Estes parâmetros são os principais mecanismos para avaliar a capacidade em particionar, recuperar ou purificar os solutos em SABs (JOHANSSON, 1985; BASSANI *et al.,* 2007; SOUZA *et al.,* 2010; VENTURA *et al.,* 2012; ZHOU *et. al.,* 2013; PRINZ *et. al.,* 2014).

$$K_{B\ ou\ F} = \frac{[C_T]}{[C_F]} \tag{14}$$

$$R_{BF} = \frac{100}{1 + R_V K} \tag{15}$$

$$R_{FT} = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{R_V K}\right)} \tag{16}$$

$$FP = \frac{[BS]}{[BS]_i} \tag{17}$$

onde: R_V é a razão volumétrica entre as fases (V_T é o volume da fase de topo – mL e V_F é o volume da fase de fundo – mL); C_T e C_F são as concentrações de um determinado bioativo nas fases de topo e fundo (mg/L); A razão da concentração da betanina pela concentração de fenóis totais depois [*BS*] e antes $[BS]_i$ do procedimento de purificação corresponde ao fator de purificação.

Capítulo 3

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Extrair betanina do fruto da palma forrageira do gênero *Opuntia ficus-indica* utilizando métodos de extração convencional, seguida de purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a extração líquido-líquido de betanina a partir do fruto da palma do gênero *Opuntia ficus-indica*;
- Construir diagramas de fases à base de tetrahidrofurano + tampão citrato, citrato de sódio e carbonato de sódio;
- Ajustar o modelo matemático para as curvas binodais dos sistemas propostos;
- Determinar as *tie-lines*, comprimento das *tie-lines* e o ponto crítico dos diagramas propostos;
- Estudar as condições ótimas de purificação da betanina utilizando os sistemas aquosos bifásicos;
- Quantificar a capacidade antioxidante presente no fruto da palma forrageira do gênero *Opuntia ficus-indica* após aplicação dos sistemas aquosos bifásicos.

Capítulo 4

4. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO 5

O capítulo 5 será apresentado em forma de artigo científico, e está organizado conforme as normas propostas pelo periódico a que será submetido a sua publicação. Este capítulo é composto por uma breve introdução, o material e métodos utilizados no desenvolvimento do artigo, os resultados obtidos e suas discussões, bem como as conclusões observadas.

Capítulo 5: Artigo – "**Integrated process of extraction and purification of betanin from *Opuntia ficus-indica* using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts**". Artigo submetido no periódico *Separation Science and Technology*.

Capítulo 5

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Integrated process of extraction and purification of betanin from *Opuntia ficus-indica* using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts

Ricardo P. Santos [1], Luana M. Souza [1], Acenini L. Balieiro [2], Cleide M. F. Soares [1,2], Álvaro S. Lima [1,2], Ranyere L. Souza [1,2].

[1] Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

[2] ITP, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

Abstract

Betanin is a natural pigment of the subclass of betalains with antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. This research present an integrated process for the extraction and purification of betanin from fruit of *Opuntia ficus-indica.* The extraction process was optimized using the tetrahydrofuran (THF), a solvent considered to not have an adverse impact to human health and the environment. Therefore, the extract was purified with the addiction of different salts to induce the formation of aqueous two-phase systems (ATPS). The result show that the betanin was purified ≈ 13 fold, and the antioxidant capacity was increased ≈ 65%.

Keywords: *Opuntia ficus-indica*, betanin, extraction, purification, aqueous two-phase systems.

1. Introduction

Due to adverse environment stress conditions (lack of water, strong radiation, temperature differences and poor soil) plants from the *Cactaceas* family, such as *Opuntia ficus-indica*, are conceived to have highly efficient defense systems, which allows them to face dry environments successfully [1]. These defense systems become possible by phytochemicals, including betalains, polyphenols, and carotenoids [2]. Betalains are natural pigments, soluble in water, found in vacuoles of some plant species. They are divided into two classes: Red-violet betacyanins and yellow betaxanthins. Among its functional properties, betalains are known to present antioxidant properties, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial [3,4]. Furthermore, betanin (CI Natural Red 33, E-number E162, betanidin 5-Ob-glucoside) are the only betalains approved for use in food. However, purification of great quantities of any type of betalains if difficult on account of its instability [5]; about 40-200 mg of betanin are normally obtained from every 100 g of beetroots [6]. In consonance, betalains stability is strongly influenced by sugar, luminosity, oxygen, water activity, pH, and temperature.

The liquid-liquid application method using aqueous two-phase systems (ATPS) can be an alternative for efficient purification of these biocompounds of industrial interest, such as DNA, proteins, enzymes, alkaloids, antibiotics, drugs, among others [7-11], and also compounds of nonorganic origin, such as metallic ions [12]. ATPS are composed of two immiscible aqueous phases that coexist in balance by the addition of soluble compounds in water [13]. One of the compounds enriches each phase of the system, originating two aqueous phases of different chemical and physical nature, thereby conducting the migration of the biomolecules to one of the phases thorough affinity [14]. One of the main characteristic of the system is the elevated amount of

water in the phases, allowing the separation of biomolecules from various origins in nondenaturing conditions [14,15].

The first ATPS used polymer-polymer and the possibility of forming ATPS using a polymer and an inorganic salt was only reported in 1986. These systems offer advantages, such as elevated biocompatibility with solutes, low cost and fast processing [16]. In the past years, the components of ATPS have become more diverse with the use of carbohydrates, ionic liquids, and hydrophilic organic solvents. ATPS formed by hydrophilic organic solvents and inorganic salts have been proposed for having advantages over ATPS based on polymers due to their low viscosity and fast separation of the phases. Additionally, they can easily be reused when the objective is to amplify the scale. These systems have been studied regarding the partition of different biomolecules, such as proteins, amino acids, and other natural compounds [17-22]. In addition, it has been shown that ATPS are an efficient extraction technique for a wide variety of solutes and that the comprehension of interacting phenomena among the components of the phases and biomolecules of interest are the main challenges for good purification.

Therefore, the objective of this work was to perform and integrated process of extraction and purification of betanin from fruit of *Opuntia ficus-indica*. The extraction process was performed using the organic solvent Tetrahydrofuran, which is a low cost hydrophilic solvent, low rate of toxicity, and that has already been used for the purification of enzymes [23, 24]. Moreover, the purification process was integrated to the extraction process using ATPS though the addition of inorganic salts (sodium carbonate, sodium citrate, and sodium citrate buffer). To these ATPS, the equilibrium curves were defined with their respective tie-line (TL) and tie-line length (TLL), as well as the model parameters of curve adjustments. The purification conditions using ATPS

such as salt nature, THF and salt composition, and system temperature equilibrium. The antioxidant activity (radical DPPH) was determined in order to verify the antioxidant capacity of these purified bioactives.

2. Material e Methods

2.1 Materials

The materials used to perform the process were tetrahydrofuran, C_4H_40, (THF, ≥ 99%), inorganic salts such as sodium carbonate (Na_2CO_3, ≥ 99%), sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7$, ≥ 99%), citric acid ($C_6H_8O_7$, ≥ 99%), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), and gallic acid ($(HO)_3C_6H_2CO_2H$, ≥ 99%). All of them were purchased from Sigma-Aldrich. Deionized water was prepared using a Milli-Q Water Purification system (Millipore Corporation).

2.2 Sample acquisition

The fruits from *Opuntia ficus-indica* were acquired at a local market in Propriá, semi-arid region of Sergipe, Brazil. The samples were collected at a maturation stage, conditioned, and transported in thermic isolated recipients to the Food Research Laboratory of Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP at University Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil.

2.3 Bioactive extraction

The optimal condition to extract betanin from fruit of *Opuntia ficus-indica* was determined by a Central Composite Design (CCD) of (2^3) where there are six axial points and three repetitions in center point, at a total of 17 trials (Table 1). The

independent variables of the design experiment were: the ratio of the mass of the fruit to the volume of the solvent (THF, temperature (°C), and time (min). The response variable of the experiments was the ratio of the content of betanin to the concentration of the total content of phenols in the samples. The software STATISTICA® 8.0 was used to generate the data.

Table 1: Codified values of the parameters used for the extraction of betanin from the Barbary fig fruit.

Variables	Code	Level				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Ratio (g/mL)	x_1	0.66	0.8	1	1.5	1.84
Temperature (°C)	x_2	21.55	27	35	45	51.82
Time (min)	x_3	1.32	2	3	5	6.36

During the extraction process in samples were kept closed and in thermostatic bath (MA 127 MARCONI), then filtered for further analysis. The humidity content of the samples was determined using the Karl-Fisher method (Karl Fischer Titrator - 870 KF Titrino plus).

2.4 Quantification of bioactives

2.4.1 Betanin and Betaxanthins

The quantification of betalains (betanin and betaxanthins) was performed using the method described by Cardoso-Ugarte [25]. The absorbance of the extracts was performed using a UV/Vis at wavelengths of 537 nm, 476 nm, and 600 nm. The percentage of betanin and betaxanthins was calculated using the following equations:

$$x = 1.095\ (A_{537}\text{-}A_{600}) \quad (1)$$

$$y = \text{-}0.258\ A_{537} + A_{476}\text{-}0.742\ A_{600} \quad (2)$$

where: "*x*" is the absorption of betanin and "*y*" is the Absorption of vulgaxanthin-I. Subsequently, the concentration of betalains was calculated in mg/L applying Beer-Lambert law, using $E^{1\ cm}_{1\%} = 1120$ for betanin and $E^{1\ cm}_{1\%} = 750$ para vulgaxanthin-I.

2.4.2 Phenolic compounds

The determination of the total content of phenols was performed applying Folin–Ciocalteu reagent, using gallic acid with a few modifications [26, 27]. An aliquot of 140 µL of extract was mixed with the same amount of Folin–Ciocalteu reagent in a test tube protected from light and it reacted for 5 min. Afterwards, 140 µL sodium carbonate solution at 2% (w/v) was added. Five minutes later, 875 µL of deionized water was also added. The absorbance was then read using a UV/Vis at a wavelength of 790 nm and the results were expressed in gallic acid equivalents (GAE g/100 g).

2.4.3 Determining the pH value

The pH quantification was measured using a Potentiometer.

2.5 Betanin purification

2.5.1 Phase diagrams

Aqueous solutions of THF at 60 wt% + inorganic salts at 40 wt%, were used to determine the phase diagrams. The inorganic salts used were sodium carbonate, sodium citrate and citrate buffer (citric acid/sodium citrate at a ratio of 3.2705 wt%, pH 5.5).

The phase diagrams were determine by the cloud-point titration method at 25 ± 1ºC at atmospheric pressure [17, 24, 28]. The mass of each point generated was quantified with a precision of 10^{-5} g using the scale Shimadzu, model AUW220D.

Merchuk model [29] was used in order to correlate the experimented points that describe the systems (Eq. 3).

$$Y_1 = A\, e^{[(B X_2^{0,5}) - (C X_2^3)]} \tag{3}$$

Where: Y_1 and X_2 represent mass portions percentages of components 1 and 2, respectively. The adjustment parameters A, B, and C were obtained by least squares regression.

The determination of the tie-lines (TLs) was then accomplished by solving the following system of four equations ((Eqs. (4)-(7)) for the four unknown values of $[Y]_T$, $[Y]_B$, $[X]_T$ and $[X]_B$,

$$Y_T = A\, e^{[(B X_T^{0,5}) - (C X_T^3)]} \tag{4}$$

$$Y_B = A\, e^{[(B X_B^{0,5}) - (C X_B^3)]} \tag{5}$$

$$Y_T = \left(\frac{Y_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{(1-\alpha)}{\alpha}\right) Y_B \tag{6}$$

$$X_T = \left(\frac{X_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{(1-\alpha)}{\alpha}\right) X_B \tag{7}$$

where: the subscript M, T, and B denote the mixture, the top phase and the bottom phase, respectively. The value of α is the ratio of the top mass to the total mass of the mixture. The tie-line length (TLL) was determined by the equation:

$$TLL = \sqrt{\left(X_T\text{-}X_B\right)^2\text{-}\left(Y_T\text{-}Y_B\right)^2} \quad (8)$$

2.5.2 Optimization

The mixture points for the formation of ATPS were chosen through analysis of the phase diagrams. For these systems, the purification process was integrated to the extraction process, that is, the components were dissolved in the extract, rich in THF. The systems were prepared in graduated centrifuge tubes (15 mL) by weighing the appropriate amounts of THF extract (35-50 wt%) and salts (6-10 wt%). Different sodium salts (carbonate, citrate, and citrate buffer) were used in order to verify the pH (pH 3.5 – 8.0) influence on the purification and stability of betanin.

The systems were prepared gravimetrically within $\pm 10^{-5}$ g, vigorously stirred and then centrifuged 3,000 *g* for 20 minutes at 25°C. Subsequently, the phases were carefully separated, the volume and weights were determined in graduated test tubes (the total mass of the extraction systems prepared is 12.0g). All of the systems had a triplicate.

Partition coefficients were evaluated for betaine concentration (K_B) and total phenolic compounds (K_P), in the top and bottom phases of system, and were determined using Equation 9. The recovery of betanin in the bottom phase (R_B) and total phenolic compound in the top phase (R_P) were determined using Eqs. 10 and 11, respectively. The purification factor (PF) was determined by Eq. 12.

$$K_{B\text{ or }P} = \frac{[C_T]}{[C_F]} \quad (9)$$

$$R_B = \frac{100}{1 + R_V K} \quad (10)$$

$$R_P = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{R_V K}\right)} \quad (11)$$

$$FP = \frac{[BS]}{[BS]_i} \quad (12)$$

where: R_V is volumetric ratio between the phases (V_T is the volume of the top phase – mL and V_F is the volume of bottom phase – mL); C_T and C_F are the concentration of a determined bioactive at the bottom and top phases (mg/L); The ratio of the concentration of betaine to the concentration of total phenols after [BS] and before $[BS]_i$ the purification procedure corresponding to the purification factor.

2.6 Antioxidant Activity

The procedure for the determination of the antioxidant activity was performed according to method described by Cai *et al.* [30] with modifications. The antioxidant capacity of betalains in the samples was determined using a solution of 60 μM of DPPH dissolved in THF at 100%. The reaction for scavenging DPPH radicals was with 200 μL of betalains samples (extraction and purification samples) with 2.8 mL of DPPH solution at room temperature (25 °C). The decrease in absorbance of DPPH at 515 nm was measured at different time intervals (1-120 min) by a UV-Vis spectrophotometer until the reaction reached a plateau. THF (100%) was used as a blank solution, and DPPH solution without test samples served as the control. All tests were performed in triplicate. The reduction of the free radical DPPH was measured in percentage (% DPPH) using Eq. 13:

$$\%\text{DPPH} = \left[\frac{(A_0 - A_e)}{A_0} \text{x} 100\right] \quad (13)$$

where: A_0 is the sample absorbance at time zero and A_e represents the absorbance of the examined sample at each time [31]. The absorbance at time zero (A_0) was obtained by agitating of blank solution.

3. Results e Discussion

3.1 Extraction of betanin

The extraction process of betanin from fruit of *Opuntia ficus-indica* was optimized using an experiment design of type DCCR 2^3, including 6 axis points and 3 repetitions in the central point, at 17 trials. The codified and real values of the parameters that were used are shown in Table 2. The response variable was related to the ratio between the content of betanin and the content of phenolic compounds extracted at each trial of experiment design. In order to develop more effective processes and less costly processes for the purification of betanin, the extraction was performed using the THF solvent. Although this organic solvent has a toxicity rate, recent studies have shown that THF is a polar solvent with low to moderate toxicity. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies have shown that THF is not mutagenic, as well as having low bioaccumulation potential [23]. Thus, the solvation power of THF for organic substances has been shown in the extraction of luteins, beta-carotenes, neoxathins, and for enzyme purification [24, 32]. Su *et al.* [33] used THF for the extraction of pigment compounds such as carotenoids and lycopenes. Chen *et al.* [34], compared the solvents THF and ethanol in the extraction of luteins from seaweed, and the best results were using THF with 99.5% of efficiency.

Table 2: Codified, real, and answer variable values of the parameters used for the extraction of betanin from the Barbary fig fruit.

Experiment	Codified variables			Real variables			Answer Variable
	Ratio (w/v)	Temperature (ºC)	Time (min)	Ratio (w/v)	Temperature (ºC)	Time (min)	Betanin/Phenols Total (w/w)
1	-1	-1	-1	0.8	27	120	0.059
2	-1	-1	1	0.8	27	300	0.061
3	-1	1	-1	0.8	45	120	0.026

4	-1	1	1	0.8	45	300	0.014
5	1	-1	-1	1.5	27	120	0.065
6	1	-1	1	1.5	27	300	0.059
7	1	1	-1	1.5	45	120	0.036
8	1	1	1	1.5	45	300	0.022
9	-1.68	0	0	0.6	35	180	0.030
10	1.68	0	0	1.84	35	180	0.044
11	0	-1.68	0	1	21.5	180	0.050
12	0	1.68	0	1	51.8	180	0.019
13	0	0	-1.68	1	35	79	0.081
14	0	0	1.68	1	35	382	0.028
15	0	0	0	1	35	180	0.048
16	0	0	0	1	35	180	0.055
17	0	0	0	1	35	180	0.062

The extraction results that conduct the analysis of the independent variables in the process are shown in the Pareto chart (Fig. 1). The studied variables (ratio fruit mass/solvent volume (X_1)Q, temperature (X_2)QL, and the extraction time (X_3)QL revealed to be significant for the control of the analyzed parameter. The temperature was the variable with biggest statistic relevance on the extraction process of betanin from its natural source, followed by the combination of the variables ratio (w/v) (L) and time (L). The bar lengths in the chart are proportional to their estimated effect absolute value, and the vertical line represents the confidence interval of 90%. Therefore, the factors that have a significant effect on the answer are the ones beyond the line. The table with effect estimates of the design experiments can be seen in the support material (Table S.1).

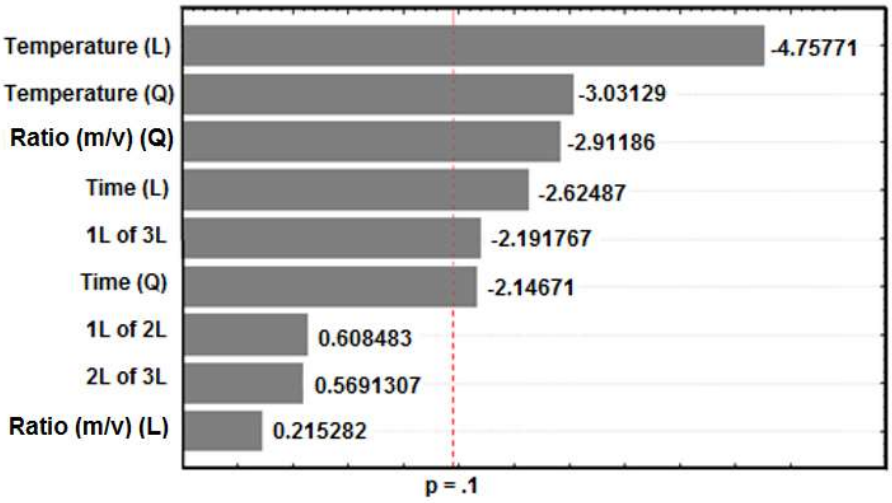

Figure 1: Pareto chart results in the design experiments of DCCR 2^3 type, using the software Statistica® 8.0.

The response surface for the dependent variable is shown in Fig. 2. The three surface parts were generated shows the relationship between the response and the independent variables [35]. The second order model obtained for the betanin extraction process is shown in Eq. 14. The statistic significant parameters were not eliminated from the model and added to the residuals. The values found for each parameter, such as the ratio (fruit mass/solvent volume), temperature, and extraction time are described in Table 3. In this condition, 20.0 ± 0.2 mg/L of betanin and 224.1 ± 2.7 mg/L of total phenolic compounds were obtained. Our model is consistent, considering that the predicted values and the experimental values of the dependent variable (betanin concentration/total phenolic compounds concentration) are close (Table 3).

$$Y = 0.0609 - 0.0214X_2 - 0.0118X_3 - 0.0159X_1^2 - 0.0165X_2^2 - 0.0117X_3^2 + 0.0129X_1X_3 \quad (14)$$

Table 3: Experimental and codified values of the independent variables found for the applied model, as well as the predicted and experimental results of the dependent variable.

Independent variable	**Experimental condition**	**Codified value**
Ratio (X_1)	0.99 (w/w)	- 0.02623
Temperature (X_2)	30 ºC	- 0.64630
Time (X_3)	2.93 h	- 0.06476
Dependent variable	**Predicted result**	**Experimental result**
Betanin/Total Phenols	0.0829	0.0891

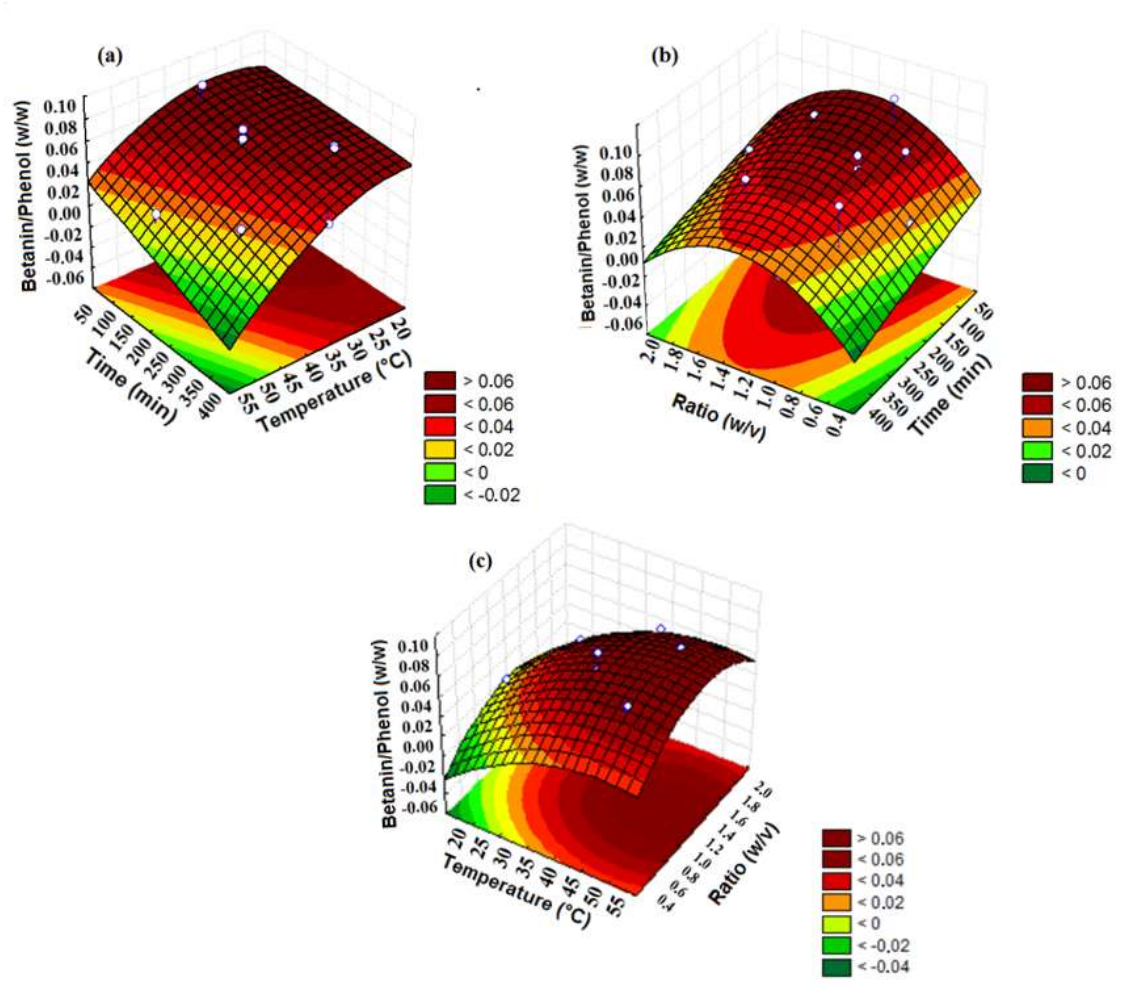

Figure 2: Surface response of the experiments performed for the extraction of betanin. a) betanin/phenol in relation to time and temperature; b) betanin/phenol in relation to the molar ratio and temperature; c) betanin/phenol in relation to the temperature and molar ratio.

3.2 Phases diagram

Aqueous two-phase systems (ATPS) possess an important set of compounds that allow the manipulation in formation of systems separately. Thus, the ternary systems addressed in this work constituted of solvent + salt (sodium citrate – pH 3.5, sodium citrate buffer – pH 5.5, or sodium carbonate – pH 8.0) + water are shown in Fig. 3. The development of low cost ATPS, with low viscosity, and high polarity difference between the phases of recovery and purification of biomolecules is primary question; In this regard, the choice of alternative and low cost organic solvents such as THF was used to evaluate the capacity to form ATPS with different sodium salts. Aqueous solutions of each component were initially prepared and used to determine the binodal curves at 25 °C. The results shown in Fig. 3 are in molar fractions units, and the equilibrium data in mass fractions are shown in Table S.1 (in Supplementary Information). Normally, concentration units in mol are used to avoid big differences caused by different molecular masses of the solvents involved in the formation of ATPS.

The THF capacity to form two phases is dependent on the salt used to induce the phases. All salts used possess cation $[Na]^{+}$, and therefore, the capacity to form two phases will be determined by the nature of the anion. In this regard, the $[citrate]^{3-}$ is a trivalent anion with a charge density superior to $[CO_3]^{2-}$, which is a divalent anion. Thus, the salting-out effect is greater for the $[citrate]^{3-}$ conducting to a greater capacity in forming two phases. The sodium citrate buffer is formed for both the sodium citrate salt as well as the citric acid. The citric acid when in pH 5.5 is partially charged, which

can interfere with the equilibrium of the phases, as observed when comparing it to the equilibrium curve of the system with sodium citrate. Therefore, the capacity of the salts, tested in this work, in forming two phases with the THF follows this tendency: sodium citrate > sodium citrate buffer > sodium carbonate. For extraction and purification purposes, comparisons regarding the composition of the systems is preferable [36], thus, the following stages will be performed using the mass fraction units (wt%).

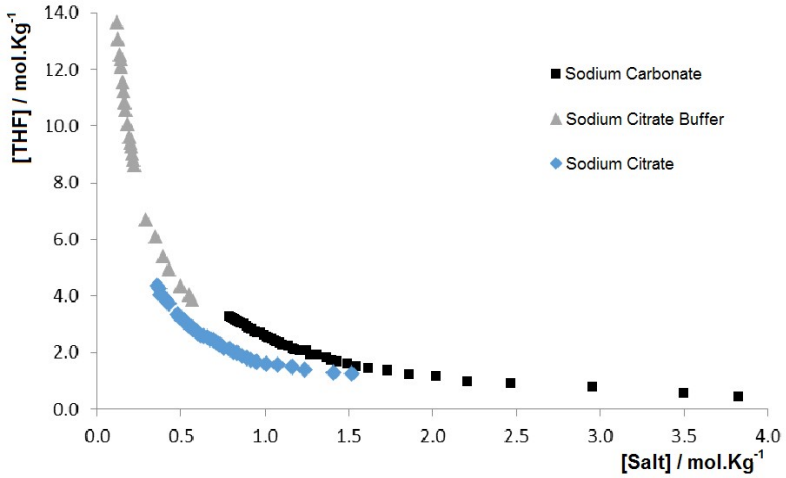

Figure 3: Binodal curves for the ternary systems composed of THF + salts + water at 25 °C and atmospheric pressure.

These system parameters were estimated through least squares regression using Eq. 3, and their values with the respective standard deviation and correlation factors (R^2). Based on the obtained R^2 (Table 4), in general, a good correlation was obtained for the experimental data using the proposed equation, indicating that this set of equations can be used to foresee the data of a determined region of the phase diagram in which there are not any experimental results available.

Table 3: The obtained parameters through Equation 1 with the respective standard deviation (std) and the correlation factors (R^2) for the proposed systems.

Solvent	**Salt**	**Adjustment parameters**			**R²**
		A	**B**	**C**	

THF	Sodium carbonate	111.4±3.281	-0.703±0.011	6.57E-06±3.19E-06	0.9982
	Sodium citrate	101.3±3.583	-0.470±0.011	5.57E-16±1.38E-06	0.9969
	Sodium citrate buffer	97.7±0.8	-0.545±0.004	9.9E-06±1.1E-06	0.9997

Furthermore, Fig. S.1, shows the symmetry of the phase diagram [37] determined by the critical point of the THF system + sodium citrate buffer. The data were estimated by the intersection of a line that goes through the central point of various TL with equilibrium curve and that are shown in Table S.3.

These equilibrium data are important not only for extraction and purification processes that involve betanin, but also for a series of compounds of different sources. These phase diagrams proportionate relevant information about: (i) the necessary concentration of the components to form aqueous two-phase systems (total mixture over the binodal curve – two-phase scheme, whereas the mixture compositions below the solubility curve are homogeneous – single-phase scheme); (ii) the concentration of components in the top and bottom phases; and (iii) the relationship of volumes of the phases.

3.3 Purification

Purification is a crucial stage in the obtention of compound interests with high purity level. The betanin purification step after the extraction process occurred in an integrated form, where the extract with organic solvent was used as one of the ATPS components, in other words, salt + water was added to the THF extract.

The ATPS formed by different salts (sodium carbonate, sodium citrate, or sodium citrate buffer) were used in order to verify the pH influence in the purification and stability of betanin. For this purpose, citrate and carbonate salts associated with the cation $[Na]^+$ were used in this investigation. Analyzing the effect of pH in the phase that

is rich in salt is especially important due to migration preference of betanin to the lower phase of the system (phase rich in salt, K_B << 1, Table S.1). Different pH values were investigated (pH 3.5-8.0) which revealed betanin instability (degradation) in more acid medium (pH 3.5) and more alkaline medium (pH >5.5). Betanin concentration was reduced from 23.2 ± 1.3 mg/L to 20.0 ± 1.5 mg/L in systems with a pH of 3.5 and significantly reduced to 0.24 ± 0.06 mg/L in systems at pH 8.0 in comparison to systems at pH 5.5 (Table 4). Betanin is a compound that is strongly dependent on pH; our results show that with values farther away from pH 5.5 its stability is strongly affected. These results are in agreement with what was observed in the speciation curve of betanin, shown in Fig. S.2 in the Supporting Information. According to Cuchinski *et al.* [38], betalains are stable at pH 4 and 5, and reasonably stable at pH 5 to 7. Additionally, a reduction in the migration of betanin to the bottom phase was observed in systems where the pH was far from 5.5 (Table 5). Thus, the ATPS were conducted and optimized using sodium citrate buffer at pH 5.5.

Table 4: Partition (K_B) and concentration (*C, mg/L)* data of betanin in ATPS formed by THF (43%, w/w) and salts of sodium (8%, w/w), at 25 ºC and atmospheric pressure with their respective pH values in the bottom phase.

Comp.1	**Comp.2**	**pH ± *σ***	**K_B ± *σ***	***C (mg/L)* ± *σ***
THF	**Sodium citrate buffer**	5.5 ± 0.2	0.027 ± 0.004	23.2 ± 1.25
	Sodium citrate	3.5 ± 0.1	0.048 ± 0.003	20.0 ± 1.51
	Sodium carbonate	8.0 ± 0.3	0.117 ± 0.009	0.24 ± 0.06

In order to evaluate the effect of the concentration of THF in ATPS for the purification of betanin, the sodium citrate buffer concentration was set at 8 wt% and THF varied

between 35 – 50 wt%, as shown in Fig. 4. In the studied systems, K_B was always < 0.025 ± 0.002 with over 99% performance in the bottom phase. Shahla *et al.* [39], using PEG + sodium sulfate ATPS was able to recover commercial betanin by up to 76%. Therefore, the purification factor was determined by the migration of total phenolic compounds to the top phase, considered contaminants in the system. The value of K_P increased from 0.955 ± 0.02 to 1.33 ± 0.07 indicating that THF concentration increase, and consequently the hydrophobic character of the top phase in the ATPS (phase rich in THF, log K_{ow}= 0.94) induced a greater selectivity in the separation of betanin. In this case, it is clearly observed an inversion in the migration of total phenolic compounds (from the bottom to the top phase), which conducts better purification of betanin in the opposite phase, in other words, its isolation in the bottom phase of the system.

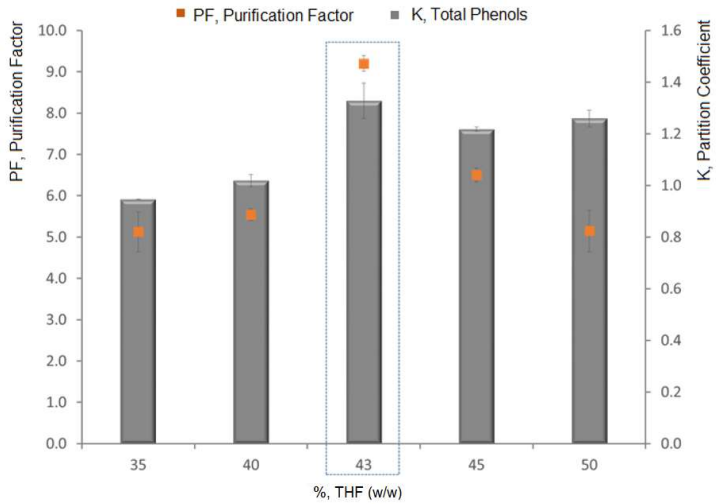

Figure 4: Effect of the concentration of THF in the purification factor of betanin and on the partition coefficient (K_P) of the total phenolic compounds, respectively, for systems based on THF extract + sodium citrate buffer (pH 5.5) at 25 °C and at atmospheric pressure.

The effect of the concentration of sodium citrate buffer on ATPS was also evaluated (set at 43 wt% of THF and sodium citrate buffer varying between 5 – 18 wt%) as shown in Fig. 5. The increase of salt concentration in the system (above of 6 wt%) reduces the capacity of the system to purify betanin. This can be due to the

increase of the hydrophilic character, cause by the capacity of salt to attract the molecule of water to itself, and consequently reduce the migration of polar compounds to the top phase. Thus, betanin purification factor increased 3.80 ± 0.32 to 13.7 ± 0.53 fold, compared to initial extraction step. Chethana *et al.* [40] using multiple partitioning of betalains from beetroot (*Beta vulgaris*) with PEG and ammonium wherein 70– 75% of betalains partitions to the top phase (PEG rich phase) with purification factor of 3.4 fold. The increase of the purification factor is related to the selectivity of the phases that constitute the system, which results, mainly, in the removal of contaminants. The results show a selectivity of total phenolic compounds to the top phase in comparison to betanin. Therefore, the capacity to isolate betanin in one of the phases is directly associated with the sensitive capacity of the components in controlling the hydrophilicity between the phases.

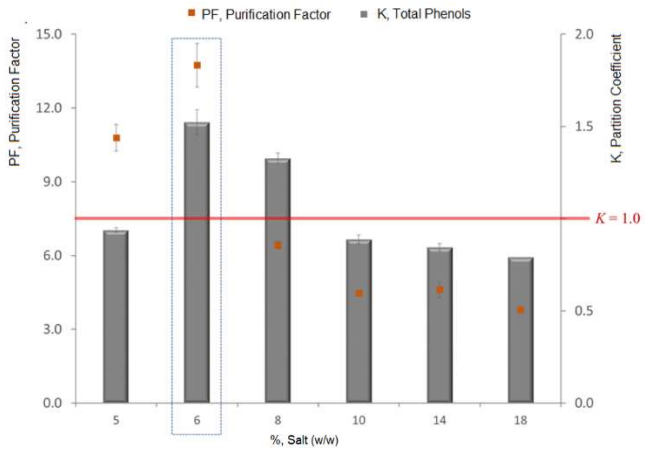

Figure 5: Effect of the concentration of sodium citrate buffer on the purification factor (PF) of betanin and on the partition coefficient (K_P) of total phenolic compounds, respectively, for systems based on THF extract + sodium citrate buffer (pH 5.5), at 25 °C and at atmospheric pressure.

Furthermore, the effect of the temperature on the partition of betanin was also evaluated (Fig. 6), in this case the optimal temperature for purification, and consequently, for a better partition of betanin using ATPS was at 25ºC. These results

show that in addition to the components and their concentration, the temperature also performs an important part in the purification of betanin, as it was foreseen in the extraction process, being a significant parameter. In contrast to what was obtained for the extraction process, which foresees better extraction at 30 ºC, during the purification process the process must ideally be done at 25ºC. On the whole, purification processes tend to be more sensitive that extraction processes, hence a reduction of the entropy of the system is expected. Although changes in temperature may be necessary for better purification in the integrated system, and with an amplified scale in mind, this proposed process shows to be more promising, considering the results obtained.

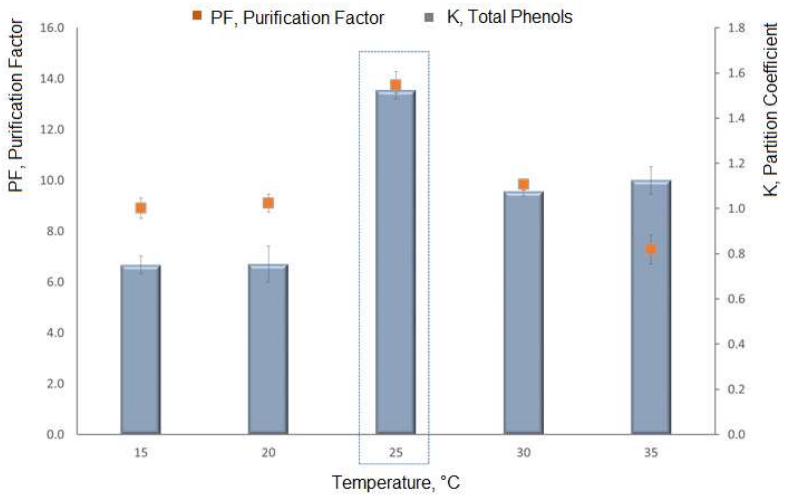

Figure 6: Effect of the temperature in the partition (K_P) and purification (PF) of betanin in systems based on THF extract + sodium citrate buffer (pH 5.5) + water.

3.4 Antioxidant capacity

One of the main characteristics of betanin is its capacity to sequester free radicals acting as powerful antioxidants. In order to preserve this property after the processes of extraction and purification, both the extraction and purification samples of betanin were evaluated. The antioxidant activity of the samples were expressed as a function of the percentage of DPPH [30]. In this work, it is possible to observe that the

purified betanin, not only preserves its antioxidant capacity, but also presented a performance rate of nearly 65.79 ± 1.55 %, corresponding to double the capacity of antioxidant present in the optimized extract (33.44 ± 0.79 %), where its behavior as a function of time can be observed in Fig. 7.

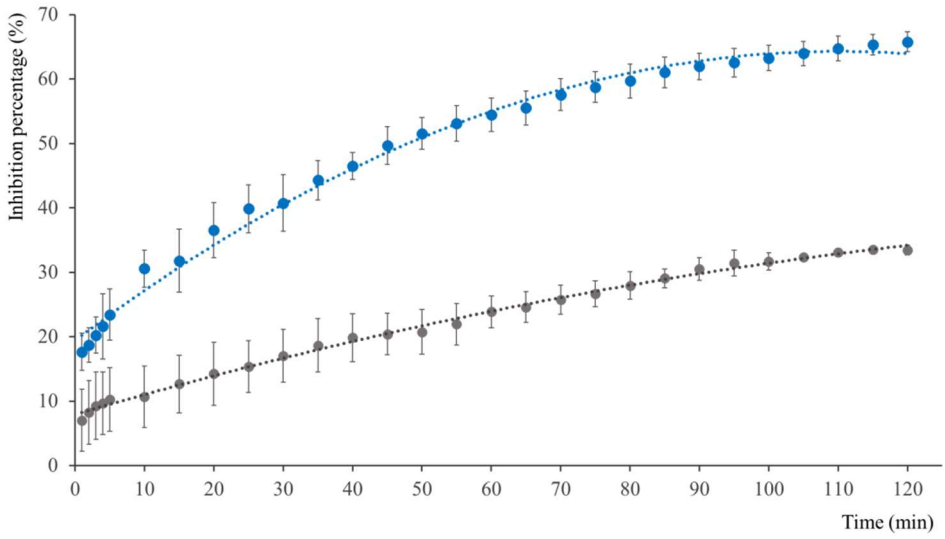

Figure 7: DPPH inhibition percentage of betanin: extract (●) and betanin purify in ATPS (●), as a function of time.

4. Conclusion

This work used an integrated process of extraction and purification of betanin from the *Opuntia ficus-indica* fruit, The extraction using THF was optimized through a design experiment in the condition of 0.99 (w/v) of the ratio (fruit mass/volume of solvent used), at 30°C for 2.93h. In this extraction condition, 20.0 ± 0.2 mg/L of betanin and 224.1 ± 2.7 mg/L of total phenolic compounds were obtained.

The purification process was initially composed by the obtention of new ATPS and, subsequently, it was evaluated according to its capacity to induce two phases, and the purification of betanin from its natural source. These new ATPS using THF +

different salts + water were characterized in relation to the equilibrium curves, tie-lines, and critical point. The experimental data of the curves were correlated and the parameters were estimated by the model proposed by Merchuk *et al.* [29]. The best purification system was, mainly, the result of the manipulation of contaminant phenolic compounds for the top phase of the system. Therefore, a concentration of 38.65 ± 1.37 mg/L with a PF of 13.74 ± 0.53 was obtained for betanin, through the use of ATPS at 43 wt% of THF and 6 wt% of sodium citrate buffer (pH 5.5) at 25°C. In addition, the capacity inhibition of radical DPPH of the purify betanin was preserved and increased with a performance of 65.79 ± 1.55 %.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support the BNB/FUNDECI (Ref. 2016.0006) and support of FAPITEC/SE, CAPES and CNPq. The authors also thank financial support through the grant PROBIC/UNIT for the scholarship of Souza, L.M.

References

1. Harlev, E., Nevo, E., Solowey, E., Bishayee, A. (2013) Cancer preventive and curative attributes of plants of the cactaceae family: a review. *Planta Med*, 79(09): 713-722.
2. El-Mostafa, K.; El Kharrassi, Y.; Badreddine, A.; Andreoletti, P.; Vamecq, P.; El-Kebbaj, M.S.; Latruffe, N.; Lizard, G.; Nasser , B.; Cherkaoui-Malki, M. (2014) Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19: 14879-14901.
3. Brewer, M.S. (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf, 10: 221-247

4. Harlev, E., Nevo, E., Mirsky, N., Ofir, R. (2013) Antidiabetic attributes of desert and steppic plants: a Review. *Planta Med*, 79(6): 425-436.

5. Gonçalves, L.C.P.; Di Genova, B.M.; Dörr, F.A.; Pinto, E.; Bastos, E.L. (2013) Effect of dielectric microwave heating on the color and antiradical capacity of betanin. *J Food Eng*, 118(1): 49-55.

6. Herbach, K. M.; Stintzing, F. C.; Elss, S.; Preston, C.; Schreier, P.; Carle, R. (2006) Isotope ratio mass spectrometrical analysis of betanin and isobetanin isolates for authenticity evaluation of purple pitaya-based products. Food Chem, 99: 204-209.

7. Asenjo, J.A.; Andrews, B.A. (2012) Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. *J Chromatogr A*, 1238: 1-10.

8. Kessel, D. (1981) Some determinants of partitioning behavior of lymphoblasts in aqueous biphasic systems. *Biochim Biophys Acta*, 678(2): 245-249.

9. Matos, T.; Johansson, H.O.; Queiroz, J.A.; Bulow, L. (2014) Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol*, 122: 144-148.

10. Mohamed Ali, S.; Ling, T.C.; Muniandy, S.; Tan, Y.S.; Raman, J.; Sabaratnam, V. (2014) Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Sep Purif Technol,* 122(0): 359-366.

11. Rosa, P.A.J.; Azevedo, A.M.; Sommerfeld, S.; Backer, W.; Aires-Barros, M.R. (2011) Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. *Biotechnol Adv*, 29(6): 559-567.

12. Mandal, S., Mandal, A. (2014) Separation of no-carrier-added (TcO4-)-Tc-99m from Mo-99-Tc-99m equilibrium mixture by PEG based aqueous biphasic separation technique using sodium/potassium salts of citric and tartaric acid. *J Radioanal Nucl Ch*, 299(3): 1225-1230.

13. Albertsson, P. A. (1986) *Partitioning of Cell Particles and Macromolecules*.

14. Albertsson, P. A. J., G.; Tjerneld, F. (1990) *Aqueous two-phase separations*. In: ASENJO, J. A. (Ed.). Separation Processes in Biotechnology cap., New York: Marcell Dekker.

15. Johansson, G. (1989) *Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems*. In: Janson, J. G. R., L (Ed.). Protein purification, principles high-resolution methods and applications cap., VCH Publishers.

16. Souza, R. L.; Barbosa, J. M. P.; Zanin, G. M.; Lobao, M. W. N.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. (2010) Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Appl Biochem Biotech*, 161: 288-300.

17. Cardoso, G.B.; Souza, I.N.; Mourão, T.; Freire, M.G.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. (2014) Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: Phase diagrams and extractive performance. *Sep Purif Technol*, 124(0): 54-60.

18. Louwrier, A. (1998) Model phase separations of proteins using aqueous/ethanol components. *Biotechnol Tech*, 12(5): 363-365.

19. Ooi, C.; Tey, B.; Hii, S.; Ariff, A.; Wu, H.; Lan, J.; Juang, R.; Kamal, S.; Ling, T. (2009) Direct purification of *Burkholderia Pseudomallei* lipase from fermentation broth using aqueous two-phase systems. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 14 (6): 811-818.

20. Reis, I. A. O.; Santos, S. B.; Pereira, F. D. S.; Sobral, C. R. S.; Freire, M. G.; Freitas, L. S.; Soares, C. M. F.; Lima, A. S. (2013) Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. *Sep Sci Technol*, 49 (5): 656-663.

21. Tan, Z.J.; Li, F.F.; Xu, X.L. (2013) Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36 (8): 1105-1113.

22. Zhi, W.; Deng, Q. (2006) Purification of salvianolic acid B from the crude extract of Salvia miltiorrhiza with hydrophilic organic/salt-containing aqueous two-phase system by counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 1116, (1–2): 149-152.

23. Fowles, J.; Boatman, R.; Bootman, J.; Lewis, C.; Morgott, D.; Rushton, E.; van Rooij, J.; Banton, M. (2013) A review of the toxicological and environmental hazards and risks of tetrahydrofuran. *Crit Rev Toxicol*. 43: 811–828.

24. Souza, R. L.; Lima, R.A.; Coutinho, J.A.P.; Soares, C.M.F.; Lima, A.S. (2015) Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Sep Purif Technol*, 155: 118-126.

25. Cardoso-Ugarte, G.A.; Sosa-Morales, M.E.; Ballard, T.; Liceaga, A.; San Martín-González, M.F. (2014) Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *Food Sci. Technol*, 59: 276-282.

26. Swain, T., Hillis, W.E. (1959) The phenolic constituents of Prunus domestica. I.—The quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agr*, 10(1): 63-68.

27. Aguirre, J. J.; De La Garza, T. H; Zugaste, C.A.; Belmares, C. R.; Aguilar, C. N. (2013) The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (Opuntia ficus-indica) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pac J Trop Biomed*; 3(6): 436-442.

28. Souza, R. L.; Campos, V. C.; Ventura, S.P.M.; Soares, C.M.F.; Coutinho, J.A.P. ; Lima, A.S. (2014) Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes. *Fluid Phase Equilib*, 1: 1-24.

29. Merchuk, J. C.; Andrews, B. A.; Asenjo, J. A. (1998) Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *J Chromatogr B*, 711, (1–2): 285-293.

30. Cai Y.; Sun M.; Corke, H. (2003) Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem*. 51: 2288-2294.

31. Liu Q.; Yao, H. (2007) Antioxidant activities of barley seeds extracts. *Food Chem*. 102:732-737.

32. Khachik, F. (2001) Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. U.S Patents 7173145 B2, February 06, 2007.

33. Su, Q.; Rowley, K.G.; Balazs, N.D.H. (2002) Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *J Chromatogr B*, 781 (1–2): 393-418.

34. Chen, C.Y.; Cen, J.; Hsieh, C.Y.; Lee, D.J.; Chang, C.H.; Chang, J.S. (2016) Production, extraction and stabilization of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresource Technol,* 200: 500-505.

35. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. (2005) Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüêncial de planejamentos, 1 ed. Campinas, SP, Casa do Pão Editora.

36. Freire, M.G.; Claudio, A.F. M.; Araujo, J.M.M.; Coutinho, J.A.P.; Marrucho, I. M.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N. (2012) Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. *Chem Soc Ver*, 41 (14): 4966-4995.

37. Glyk, A.; Scheper, T.; Beutel. (2014) S. Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several peg–salt aqueous two-phase systems. *J Chem Eng Data*, 59 (3): 850-859.

38. Cuchinski, A. S.; Caetano, J; Dragunski, D. C. (2010) Extraction of beet dye (*Beta vulgaris*) for use as acid-base indicator. *Eclet Quim*, 35(4): 133-138.

39. Ebrahimi, T.; Shahriari, S. (2016) Extraction of betanin using aqueous two-phase systems. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 89, 565–572.

40. Chethana, S.; Nayak, C.A.; Raghavarao, K.S.M.S. (2007) Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. *J Food Eng,* 81, 679-687

Integrated process of extraction and purification of betanin from *Opuntia ficus-indica* using aqueous two-phase systems based on THF and sodium salts

Ricardo P. Santos [1], Luana M. Souza [1], Acenini L. Balieiro [2], Cleide M. F. Soares [1,2], Álvaro S. Lima [1,2], Ranyere L. Souza [1,2].

[1] Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil

[2] ITP, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 - Prédio do ITP, Farolândia, 49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

Supplementary Information

Table S.1: Results of the estimated effect on the design experiment of type DCCR 2^3, using software Statistica 8.0.

Factors	**Effects**	**Error**	**t(6)**	**p**	**-90%**	**+90%**
Average	0.060970	0.005856	10.41173	0.000046	0.049591	0.072349
Ratio (w/v) (L)	0.000968	0.004495	0.21528	0.836679	-0.007767	0.009702
Ratio (w/v) (Q)	-0.015892	0.005458	-2.91186	0.026915	-0.026498	-0.005287
Temperature (L)	-0.021386	0.004495	-4.75771	0.003134	-0.030121	-0.012652
Temperature (Q)	-0.016544	0.005458	-3.03129	0.023060	-0.027149	-0.005939
Time (L)	-0.011799	0.004495	-2.62487	0.039329	-0.020534	-0.003064
Time (Q)	-0.011716	0.005458	-2.14671	0.075448	-0.022322	-0.001111
1L of 2L	0.003574	0.005873	0.60848	0.565176	-0.007839	0.014986
1L of 3L	0.012873	0.005873	2.19177	0.070902	0.001460	0.024285
2L of 3L	0.003343	0.005873	0.56913	0.589921	-0.008070	0.014755

Table S.2: Solubility data in mass fraction of systems composed of THF (1) + sodium salts (2) + water, at 25 ºC.

Sodium citrate		**Sodium citrate buffer**		**Sodium carbonate**	
100 *w*1	**100 *w*2**	**100 *w*1**	**100 *w*2**	**100 *w*1**	**100 *w*2**
23.91	9.59	68.08	2.27	19.27	6.21
23.49	9.81	53.02	2.59	18.99	6.28
22.65	10.05	49.64	2.78	18.89	6.36
22.34	10.35	48.56	2.96	18.68	6.42
22.08	10.55	47.43	3.16	18.52	6.48
21.76	10.79	47.17	3.27	18.31	6.55
21.36	11.03	46.59	3.36	18.21	6.65
21.22	11.16	45.46	3.56	18.00	6.72
19.50	12.33	44.74	3.71	17.94	6.82
18.97	12.58	43.86	3.87	17.60	6.96
18.72	12.98	43.22	4.01	17.24	7.05
18.24	13.32	42.13	4.23	17.00	7.17
18.03	13.51	40.98	4.47	16.57	7.27
17.58	13.81	40.47	4.58	16.44	7.35
17.38	14.01	40.09	4.68	16.32	7.42
17.22	14.22	39.46	4.82	16.26	7.54
16.99	14.39	38.86	4.94	15.93	7.71
16.74	14.67	38.35	5.07	15.51	7.82
16.50	14.86	30.60	7.79	15.34	7.90
16.25	15.07	28.09	8.77	15.17	8.04
15.92	15.38	32.60	6.63	14.79	8.15
15.71	15.77	26.37	9.45	14.61	8.24
15.46	16.17	23.98	10.82	14.52	8.37
15.17	16.56	21.76	12.07	14.17	8.47
14.90	16.97	22.55	11.73	14.02	8.72
14.58	17.26	68.08	2.27	13.47	8.92
14.15	17.58			13.23	9.02
13.77	17.96			13.10	9.20
13.57	18.22			12.96	9.46
13.32	18.85			12.32	9.62
12.81	19.30			12.26	9.91
12.49	19.78			11.75	10.30
12.04	20.29			11.09	10.50
11.61	20.80			10.90	10.72
11.12	21.25			10.44	11.15
10.73	21.82			9.77	11.50
10.41	22.90			9.51	11.94
10.09	24.07			8.96	12.68
9.73	25.49			8.23	13.51
9.08	26.67			7.70	14.52
8.47	29.32			6.69	15.62
8.35	30.91			6.20	17.15
23.91				5.35	19.88
23.49				3.92	22.71
22.65				3.15	24.32

Table S.3. Experimental data of TL, TLL, and critical point of coexisting phases in the system THF + sodium citrate buffer, at pH 5.5, at 25 ºC.

Mass fraction/(wt%)						TLL	$[Y]_{Crítical}$	$[X]_{Critical}$
$[THF]_M$	$[Salt]_M$	$[THF]_T$	$[Salt]_T$	$[THF]_F$	$[Salt]_F$			
30.04	9.99	70.92	0.84	22.58	11.66	49.54	57.09	1.93
30.10	11.97	75.68	0.60	18.42	14.88	59.01		
30.69	14.80	79.58	0.44	14.14	19.66	68.20		
30.20	19.93	91.78	0.13	10.27	26.33	85.62		

** at critical point: $f = 54.42$; $g = 4.38$; $R^2 = 0.9881$.*

Table S.4: Recovery of total phenolic compounds in the bottom phase (R_P), bethanin in the top phase (R_P), partition coefficient of total phenolic compounds (K_F), and betanin (K_B), plus betanin purification factor in (PF) with the respective standard deviation (σ). All the ATPS were formed from the extract with THF + citrate buffer (pH 5.5) at 25 °C and atmospheric pressure.

SAB		$R_P \pm \sigma$	$R_B \pm \sigma$	$K_F \pm \sigma$	$K_B \pm \sigma$	PF $\pm \sigma$
THF (wt%)	**Salt (wt%)**					
35		77.66 ± 0.05	99.27 ± 0.63	0.95 ± 0.02	0.025 ± 0.002	5.13 ± 0.49
40		83.28 ± 2.11	99.66 ± 0.79	1.02 ± 0.02	0.014 ± 0.009	5.54 ± 0.14
43	8	68.76 ± 3.27	99.22 ± 0.15	1.33 ± 0.07	0.024 ± 0.006	9.20 ± 0.19
45		64.72 ± 0.37	99.35 ± 0.05	1.22 ± 0.04	0.015 ± 0.002	6.50 ± 0.17
50		68.43 ± 1.68	99.63 ± 0.12	1.26 ± 0.03	0.010 ± 0.003	5.15 ± 0.50
43	5	72.49 ± 0.05	97.55 ± 0.12	0.94 ± 0.02	0.062 ± 0.004	10.79 ± 0.09
	6	70.32 ± 0.08	98.97 ± 3.0	1.52 ± 0.01	0.034 ± 0.002	13.74 ± 0.53
	8	68.76 ± 3.27	99.22 ± 2.22	1.33 ± 0.07	0.024 ± 0.009	6.43 ± 0.88
	10	69.24 ± 0.71	99.27± 0.05	0.89 ± 0.03	0.015 ± 0.002	4.47 ± 0.16
	14	66.58 ± 0.32	99.68 ± 0.83	0.84 ± 0.02	0.006 ± 0.001	4.62 ± 0.03
	18	66.72 ± 0.21	99.68 ± 1.97	0.79 ± 0.02	0.005 ± 0.001	3.80 ± 0.32

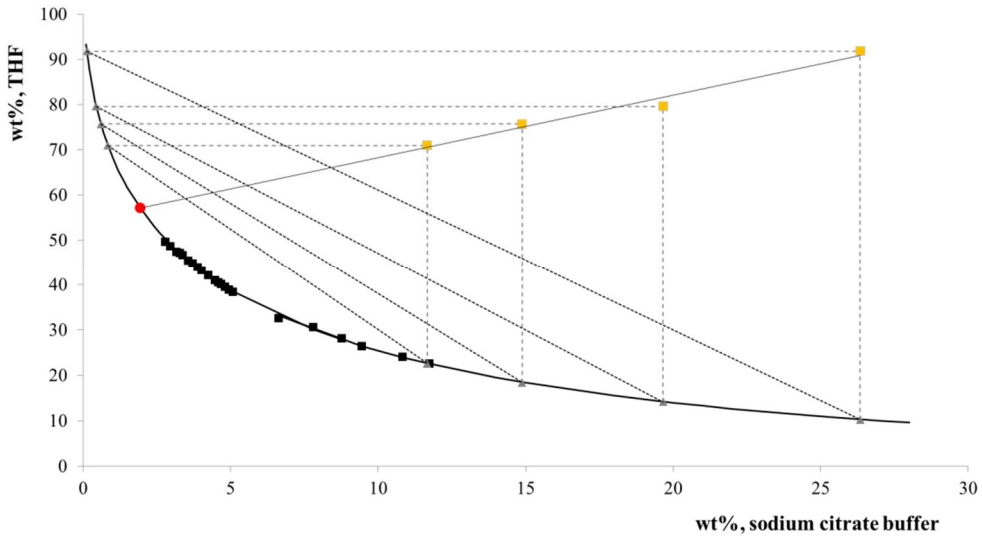

Figure S.1: Phase diagram for ternary systems composed of THF + sodium citrate buffer + water, at 25 ± 1 ºC and at atmospheric pressure. ▬ calculated binodal from Eq. 1; ■, data of experimental solubility; ▬, tie-lines; ■, auxiliary data curve; ●, critical point.

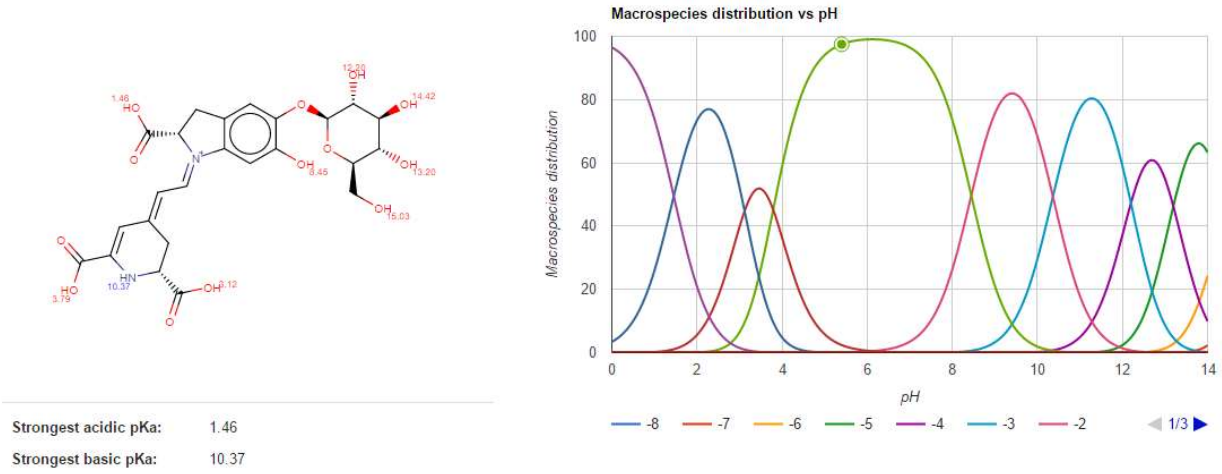

Figure S.2: Betanin speciation curve. (Source: Chemical Spider, accessed on 25/01/2017).

Capítulo 6

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A palma forrageira da espécie *Opuntia ficus-indica* se destaca mundialmente por suas características edafoclimáticas e tem despertado o interesse científico, ganhando visibilidade no cenário industrial, devido a importantes compostos bioativos, presentes em seu fruto, em especial a betanina, qual único corante natural aprovado como alimento e, é por isso, que é necessário que técnicas de extração e purificação sejam aperfeiçoadas.

Conforme pode ser constatado no corpo desse instrumento de estudo concluímos que é possível a otimização da extração líquido-líquido e por conseguinte a purificação da betanina, substância essa, presente no fruto da palma forrageira *(Opuntia ficus-indica),* utilizando sistemas aquosos bifásicos (SABs) baseados em tetrahidrofurano (THF) associado a sais de sódio.

Na perspectiva da obtenção de valores otimizados de extração e purificação da betanina, obtivemos elementos que proporcionaram a construção de um diagrama de fases à base de tetrahidrofurano + tampão citrato, alicerçado assim, na variação da porcentagem de sais de sódio na solução, que nos cederam informações precisas e de grande relevância acerca da concentração que se faz necessária nos componentes para formar sistemas aquosos de duas fases. A construção da curva de solubilidade homogênea possibilitou o ajuste matemático dos dados experimentais das curvas, correlacionando-os aos parâmetros estimados pelo modelo proposto por Merchuk et al.

O presente método de extração fez-se otimizado por meio de um planejamento experimental (DCCR 2^3), avaliando a capacidade do THF em extrair o maior teor de betanina/compostos fenólicos. As condições ótimas de extração foram de 0,99 da razão massa do fruto/volume de THF durante 2,93 h a 29,8°C. Portanto, é assertivo afirmar que nesta condição de extração foi possível obter 20,0 ± 0,2 mg/L de betanina e 224,1 ± 2,7 mg/L de compostos fenólicos totais.

Nestas condições, a purificação da substância betanina a partir do fruto da *Opuntia ficus-indica* determina de modo preciso que só foi possível devido principalmente à partição dos compostos fenólicos, que aturaram como contaminantes no processo para a fase oposta das betaninas (fase de topo, rica em THF). O processo de purificação foi concluído com êxito principalmente por manter as principais características da betanina que é a sua capacidade de sequestrar radicais livres atuando assim, como poderosos antioxidantes. Portanto, com o intuito de preservar esta propriedade após a extração e consequentemente a purificação uma avaliação das amostras foi expressa em função da porcentagem de DPPH, onde foi possível possibilitar a observação da purificação da betanina, que não só preservou sua capacidade antioxidante, mas também apresentou uma taxa de desempenho acima de 65,79 ± 1,55%, correspondendo ao dobro da capacidade antioxidante presente no extrato otimizado a (33,44 ± 0,79 %).

Diante do exposto, concluímos assim que a associação entre método de extração com o SAB se deu de modo primordial para o sucesso na purificação da substância betanina e, desta forma, o sistema desenvolvido apresenta-se como excelente alternativa para purificar a betanina a partir de sua fonte natural de forma menos onerosa e otimizada.

Capítulo 7

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.T.S.; MARQUES, J.G.W.; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.36-42, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AHMAD-QASEM, M., H.; CÁNOVAS, J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉRE, J. V. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 17, p.120-129, 2013.

ÁVILA, I. M. L. B.; SILVA, C. L. M. Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. Journal of Food Engineering, v. 39, p. 161-166, 1999.

BAMBERG, S.; GEOFFREY, V.; SEAMAN, F.; SHARP, K. A.; BROOKS, D. E. J. Colloid Interface Science, v. 99, p. 194, 1984.

BARBERA, Guiseppe; INGLESE, Paolo (Eds.). Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira. Paraíba: SEBRAE/PB, p. 1-11, 2001.

CAI, Y.Z., SUN, M., CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, **16**(9), p. 370-376, 2005.

CARDOSO, G. D. B.; SOUZA, I. N.; PEREIRA, M. M.; FREIRE, M. G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S. Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile. Separation and Purification Technology, 136, n. 0, p. 74-80, 2014.

CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTWER, F.G. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. Veterinária México, México, v.33, p. 265-283, 2002.

CHITEVA, R., WAIRAGU, N. Chemical and nutritional content of Opuntia ficus-indica (L.). *African Journal of Biotechnology*, 12(21), p. 3309-3312, 2013.

COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. Cadernos Didáticos, p.43, Viçosa: UFV, 2003.

COULTATE, T.P. Alimentos: a química de seus componentes. Trad. FRAZZON, J. et al., 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, p.368, 2004.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. Visão Acadêmica. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A.R., PAREDES-LÓPEZ, O. NATURAL Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**(3), p. 173-289, 2000.

DELGADO-VARGAS, F.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Washington: CRC Press, 2002.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. Advances in Biochemistry Engineering, v. 47, n. 135, p. 89-135, 1992.

DOBRY, A.; BOYER-KAWENOKI, F. Journal of Polymer Science, v. 2, p. 90-100, 1947.

DRUNKLER, D.A.; FALCÃO, L.D.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Influência dos ácidos tânico e gálico na estabilidade de betacianinas do extrato bruto de beterraba vermelha (Beta vulgaris L.). Alim. Nutr. v.15, p. 35-41, 2004.

DURÁN, R.M., PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites,* Sevilla, v.44, n.2, p. 101-106, 1993.

EL, S. N.; KARAKAYA, S. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. International Journal of Food Science Nutrition, v. 55, n. 1, p. 67-74, 2004.

EL-MOSTAFA, K., EL KHARRASSI, Y., BADREDDINE, A., ANDREOLETTI, P., VAMECQ, P., EL-KEBBAJ, M.S., LATRUFFE, N., LIZARD, G., NASSER , B., CHERKAOUI-MALKI, M. Nopal Cactus (Opuntia ficus-indica) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, v.19, p. 14879-14901, 2014.

El–SAMAHY, K.S.; YOUSSEF, K.M.; MOUSSA-AYOUB, A. S. Producing ice cream with concentrated cactus pear pulp: A preliminary study. Journal of the Professional Association for Cactus Development, v.11, p. 1–12, 2009.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. Química Nova, v. 21(1), p. 60-68, 1998.

GALATI, E.M., MONFORTE, M.T., TRIPODO, M.M., D'AQUINO, A., MONDELLO, M.R. Antiulcer activity of Opuntia ficus indica (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), p. 1-9, 2001.

GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. Process Biochemistry, v.45, p. 1082-1087, 2010.

GONÇALVES, L.C.P., DI GENOVA, B.M., DÖRR, F.A., PINTO, E., BASTOS, E.L. Effect of dielectric microwave heating on the color and antiradical capacity of betanin. *Journal of Food Engineering*, 118(1), p. 49-55, 2013.

GRANGEIRO, A. A.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; MATA, M. E. R. M. C. Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-índia. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.13, n. 2, p. 219-224, 2007.

GU, T.; ZHANG, L. Partition coefficients of some antibiotics, peptides and amino acids in liquid-liquid partitioning of the acetonitrila-water system at subzero temperatures, Chemical Engineering Communications, v.194, p. 828-834, 2007.

GURRIERI, S.; MICELI, L.; LANZA, C. M.; TOMASELLI, F.; BONOMO, R. P., RIZZARELLI, E. Chemical characterization of Sicilian prickly pear (Opuntia ficus indica) and perspectives for the storage of its juice. Journal of Agricultural Food Chemisty, v.48, n.11, p. 5424-5431, 2000.

GUTOWSKI, K. E.; BROKER, G.A.; WILLAUER, H.D.; HUDDLESTON, J.G.; SWATLOSKI, R.P.; HOLBREY, J.D.; ROGERS,R.D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. Journal American Chemical Society, v.125, p. 6632-6633, 2003.

HARBONE JB and Baxter H, Eds: The handbook of natural flavonoids. John Wiley and sons. Chichester, 1 and 2. p. 24-44, 1999.

HARLEV, E.; NEVO, E.; SOLOWEY, E.; BISHAYEE, A. Cacer preventive and curative attributes of plants of the Cactaceae family: A review. Planta Med, v.79, p. 713-722, 2013.

HERBACH, K. M., STINTZING, F. C. E CARLE, R. Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. Journal of Food Science 71 (4): p.41-50, 2006.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.53, n.8, p. 2928-2935, 2005.

HO, C.T. Phenolic compounds in food-an overview. In: HO, C.T., LEE, C.Y., HUANG, M.T.*Phenolic compounds in food and their effects on health.* Washington: American Chemical Society, p. 2-7, 1992.

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

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.11, p. 5178-5185, 2001.

KNEZ, Ž.; Markočič, E.; Leitgeb, M.; Primožič, M.; Knez Hrnčič, M.; Škerget, M. Industrial applications of supercritical fluids: A review. Energy, v. 77, p. 235- 243, 2014

KUJALA T, LOPONEN J, PIHLAJA K. Betalains and phenolics in red beetroot (Beta vulgaris) peel extracts: extraction and characterisation. Z Naturforsch C/ Biosci 56:343–8, 2001.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. Life Sciences, v.77, p.230-240, 2005.

MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, v.79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANDAL, S., MANDAL, A. Separation of no-carrier-added (TcO4-)-Tc-99m from Mo-99-Tc-99m equilibrium mixture by PEG based aqueous biphasic separation technique using sodium/potassium salts of citric and tartaric acid. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299(3), p. 1225-1230, 2014.

MATOS, T., JOHANSSON, H.O., QUEIROZ, J.A., BULOW, L. Isolation of PCR DNA fragments using aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 122, p. 144-148, 2014.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Bol. SBCTA. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MERCHUK, J.C., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711(1–2), p. 285-293, 1998.

MILES, E. A.; ZOOUBOULI, P.; CALDER, P. C.; PHIL, D. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. Nutrition, Burbank, v.21, p. 389-394, 2005.

NAYAK, C.A., CHETHANA, S., RASTOGI, N.K., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Enhanced mass transfer during solid–liquid extraction of gamma-irradiated red beetroot. Radiation Physics and Chemistry, 75(1), p. 173-178, 2006.

OOI CW, TEY BT, HII SL, MAZLINA S, KAMAL M, LAN JCW, ARIFF A, LING TC. Purification of lipase derived from Burkholderia pseudomallei with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. Process Biochem, v.44, 1083-1087, 2009.

NILSSON T. Studies into to pigments in Beetroot (Beta Vulgaris L. ssp. Vulgaris var. rubra L). Lant-brukshogskolans anneler, v.36, p. 179-219, 1970.

PASCH, J.H. & VON ELBE, J.H. Betanin stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. Journal of Food Science, v.44, p. 72–74, 1979.

PEREIRA, J.F.B.; LIMA, A.S.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems, Green Chemistry, v.12, p. 1661-1669, 2010.

PIGA, A. Cactus pear: A fruits of nutaceutical and functional importance. J. Profess. Assoc. Cactus Develop., v.6, p. 9-22, 2004.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A review. LWT-Food Sci. Technol., v.40, p. 1-11, 2007.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Química Nova, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

REIS, I.A.O.; SANTOS, S. B.; SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. Food Chemistry, v.135, p. 2453-2461, 2012.

REIS, I.A.O., SANTOS, S.B, PEREIRA, F.D.S., SOBRAL, C.R.S., FREIRE, M.G., FREITAS, L.S., SOARES, C.M.F., LIMA, A.S., Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-sal-based aqueous two-phase systems. Separ. Sci. Technol. v. 49, p. 656-663, 2014.

RICE-EVANS C. A., MILLER J. M., and PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. v.20, p. 933-956, 1996.

ROSA, P.A.J., AZEVEDO, A.M., SOMMERFELD, S., BACKER, W., AIRES-BARROS, M.R. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. *Biotechnology Advances*, 29(6), p. 559-567, 2011.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. Journal of Chromatography A, 1244, n. 0, p. 1-13, 2012.

RYDEN, J.; ALBERTSSON, P. A.; *J. Colloid Interface Sci.* 1971, 37, 219.

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

SÁENZ, C.; TAPIA, C.; CHAVÉZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food chemistry*, v. 114, n.2, p. 616-622, 2009.

SÁENZ, C. Utilización agroindustrial del nopal. 1ra. Edición. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 162, Roma, p. 170, 2006.

SAÉNZ, C.; ESTÉVEZ, A. M.; SEPÚLVEDA, E.; MECKLENBURG, P. Cactus pear fruit: A new source for a natural sweetener. Plant foods for human nutrition, v.52, n.2, p. 141-149, 1998.

SAÉNZ, C.; SEPÚLDEVA, E. Cactus pear juices. Journal of the Professional Association for Cactus, v.4, p. 3-10, 2001.

SOARES, S. E., Ácidos fenólicos como antioxidantes, Revista de Nutrição. Vol. 15, N° 1. Campinas: 2002.

SHEINVAR, L. Taxonomiadas opuntias utilizadas. BARBERA, Guiseppe; INGLESE, Paolo (Eds.). Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira. Paraíba: SEBRAE/PB, p. 20-27, 2001.

SOARES. M.; WELTER. L.; GONZAGA. L.; LIMA. A.; MANCINI-FILHO. J.; FETT. R.; Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(3), p. 727-732, 2008.

SOUSA, R. L.; BARBOSA, J. M. P.; ZANIN, G. M.; LOBÃO, M. W. N.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethyleneglycol/potassium phosphate aqueous. Applied Biochemical Biotechnomogy, v.16, p. 288, 2010.

SOUZA, R. L.; VENTURA, S. P.; SOARES, C. M.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems, Biotechnology and Bioengineering, Green Chem., v.17, p. 3026–3034, 2015.

SPÓRNA-KUCAB, A., IGNATOVA, S., GARRARD, I., WYBRANIEC, S. Versatile solvent systems for the separation of betalains from processed Beta vulgaris L. juice using counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, v.941(0), p. 54-61, 2013.

STINTZING, F.C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. European Food Research and Technology, v.216, p.303-311, 2003.

STINTIZING, F. C. & CARLE, R (Cactus Stems (Opuntia spp.)): review on their chemistry, technology, and uses. Mol. Nutr. Food Res., v.49, p. 175 - 194, 2005.

STINTZING, F.C., CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, v.18(10), p. 514-525, 2007.

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

QING SU, KEVIN G. ROWLEY, NICHOLAS D.H. BALAZS Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, v.781, p. 393–418, 2002.

TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIC M AND MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 160, p. 1-40, 2006.

VENTURA, S. P. M.; SOUZA, S. G.; SERAFIN, L. S.; LIMA, A. S.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquid based aqueous biphasic systems with controlled ph:

the ionic liquid cation effect. Journal of Chemical Engineering, v.56, p. 4253 - 4260, 2011.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using in aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. Journal of Chromatography A, v.668, n. 1, p. 237-240, 1994.

VOLP. RENHE, et al. Pigmentos Naturais Bioativos. Alim. Nutr., Araraquara v.20, n.1, p. 157-166, 2009.

VON ELBE, J.H. & ATTOE, E.L. Oxygen involvement in betanin degradation – Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. Food Chemistry, v.16, p. 49 - 67, 1985.

WANG, C,. ZUO, Y. Ultrasound- assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounda in cranberry products. Food Chemistry, v.128, n.2, p. 562-568, 2011.

WYBRANIEC, S. Formation of Decarboxylated Betacyanins in Heated Purified Betacyanin Fractions from Red Beet Root (Beta vulgaris L.) Monitored by LC−MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), p. 3483-3487, 2005.

ZUÑIGA, A. D. G.ROJAS, E. E. G.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. ; PEREIRA, J. A. M.; Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos.Vol. 21, No 1,2003.

ZHENG, W., & WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, p. 5165–5170, 2001.