

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

**PROCESSO INTEGRATIVO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus
officinalis*)**

Autor: Paula Gabrielle Campos Gomes

Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof. Dr^a Cleide Mara Faria Soares

Dr. Matheus Mendonça Pereira

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2019

PROCESSO INTEGRATIVO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus
officinalis*)

Paula Gabrielle Campos Gomes

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

Aprovada por:

Dr. Álvaro Silva Lima
UNIT/PEP

Dr^a. Cleide Mara Faria Soares
UNIT/PEP

Dr. Matheus Mendonça Pereira
UNIT/PEP

Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana
UFC/PGEQ

Dr^a. Isadora Monteiro A. Barreto
UNIT/PEP

ARACAJU, SE - BRASIL
FEVEREIRO DE 2019

G633p Gomes, Paula Gabrielle Campos
 Processo integrativo de extração e purificação de compostos bioativos presentes
 no alecrim (*Rosmarinus officinalis*) / Paula Gabrielle Campos Gomes; orientação [de]
 Prof. Dr. Álvaro Silva Lima – Aracaju: UNIT, 2019.

77 f. il ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes,
2019

Inclui bibliografia.

1. Sistema aquoso bifásico. 2. Surfactante. 3. *Rosmarinus officinalis* 4. Extrato sólido-líquido 5. Clorofila. 6. Ácido rosmarínico I. Gomes, Paula Gabrielle Campos. II. Lima, Álvaro Silva. (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 664.014.061.6

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”
Chico Xavier

Agradecimentos

Primeiramente expressarei minha gratidão a Deus, por cada oportunidade concedida, por todos obstáculos presentes, que me fez tornar um ser humano e mostrando que nada na vida é por um acaso. Agradeço a minha mãe/pai Shirley por estar presente na minha vida, incentivando e não me deixando perder as esperanças. Por me lembrar que tudo na vida é um aprendizado e que não podemos desistir de nossos sonhos. Te amo de forma incondicional por diversos motivos, e o mais importante deles é por você ser esse humano de coração puro e lindo. Agradeço a toda minha família pela confiança, força, compreensão, incentivo e por acreditar no meu potencial.

Agradeço aos meus orientadores por me acompanharem e me passar todos os conhecimentos adquiridos, saibam que tenho um imenso respeito e admiração por vocês e agradeço pela oportunidade que me foi concedida. Obrigada por TUDO!

Agradeço a equipe que vocês formam, o LPA/LEB que permitiu criar relações de amizade e profissional, obrigada pelo convívio diário, por todo apoio e torcida, pela preocupação, por todas as conversas e momentos compartilhados.

À CAPES pela bolsa concedida, à UNIT e ao ITP pela infraestrutura disponibilizada para realização desta Dissertação de Mestrado. Agradeço também aos professores que fazem parte do Programa em Engenharia de Processos (PEP).

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 INTEGRATIVO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)

Paula Gabrielle Campos Gomes

O alecrim é uma planta encontrada na região Mediterrânea com elevada quantidade de compostos bioativos de alto valor agregado, dentre eles destacam-se o ácido rosmarínico e a clorofila. Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo realizar a extração seletiva, concentração e purificação desses bioativos de folhas frescas de alecrim, utilizando um processo integrado baseado na extração sólido líquido para obtenção da biomolécula alvo e extração líquido-líquido para concentração ou purificação dessas biomoléculas. Inicialmente foi otimizada a extração da clorofila utilizando como solvente uma solução aquosa de Triton X-100 (HBL 13,5) em termos do tempo, concentração do surfactante, temperatura e relação sólido-líquido. O Triton X-100 (4 – 26 %) foi utilizado para a construção do diagrama de fases baseado em tampão fosfato (50 – 250 mM). O sistema aquoso bifásico micelar foi utilizado para a concentração da clorofila. O rendimento máximo de extração da clorofila (34,39 µg/g) foi obtida utilizando 5% de Triton X-100 na razão sólido-líquido de 1:10, à 50 °C, por 60 minutos. O extrato obtido foi levado à temperatura de 67 °C de modo a obter duas fases, concentrando desta forma a clorofila na fase rica em micelas até 88,99 µg/g (2,59 vezes). Posteriormente, a biomassa foi reutilizada para a extração sólido-líquido do ácido rosmarínico utilizando diferentes solventes (acetonitrila, metanol, etanol). O metanol apresentou a melhor extração (7,84 mg/L) na razão sólido-líquido (1:10, m/v), à 50 °C. Sistema aquoso bifásico baseado em solvente orgânico e K₃PO₄ foram empregados na purificação do ácido rosmarínico. O ácido rosmarínico migrou integralmente para a fase rica em solvente orgânico, obtendo um melhor desempenho no sistema formado por acetonitrila e K₃PO₄, enquanto que os compostos fenólicos (contaminantes) apresentaram eficiência de extração de 44,21%, portanto promovendo a purificação do ácido rosmarínico.

Palavras-chave: Sistema aquoso bifásico, surfactante, *rosmarinus officinalis*, extração sólido-líquido, clorofila, ácido rosmarínico.

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

INTEGRATIVE PROCESS TO EXTRACT AND PURIFY BIOACTIVE COMPOUNDS
FROM ROSEMARY LEAVES (*Rosmarinus officinalis*)

Paula Gabrielle Campos Gomes

Rosemary is a plant found in the Mediterranean region with a high amount of bioactive compounds with high added value, among which stand out rosmarinic acid and chlorophyll. In this context, the objective of this work is to perform the selective extraction, concentration and purification of these bioactive fresh rosemary leaves using an integrated process based on liquid solid extraction to obtain the target biomolecule and liquid-liquid extraction for concentration or purification of these biomolecules. Initially, chlorophyll extraction was optimized using an aqueous solution of Triton X-100 (HBL 13.5) as the solvent in terms of time, surfactant concentration, temperature and solid-liquid ratio. Triton X-100 (4-26%) was used for the construction of the phase diagram based on phosphate buffer (50-250 mM). The aqueous micellar two-phase system was used for the concentration of chlorophyll. The maximum extraction yield of chlorophyll ($34.39 \mu\text{g.g}^{-1}$) was obtained using 5% Triton X-100 at the solid-liquid ratio of 1:10 to 50 °C for 60 minutes. The extract obtained was brought to a temperature of 65 °C to obtain two phases, thereby concentrating chlorophyll in the micelle rich phase up to $88.99 \mu\text{g.g}^{-1}$ (2.59 times). Subsequently, the biomass was reused for solid / liquid extraction of rosmarinic acid using different solvents (acetonitrile, methanol, ethanol). Methanol showed the best extraction (7.84 mg/L) at the solid/liquid ratio (1:10) at 50 °C. Aqueous two-phase system based on organic solvent and K_3PO_4 were used in the purification of rosmarinic acid. The rosmarinic acid migrated integrally to the organic solvent rich phase, obtaining a better performance in the system formed by acetonitrile and K_3PO_4 , while the phenolic compounds (contaminants) presented extraction efficiency of 44.21 %, thus promoting the purification of rosmarinic acid.

Keywords: Biphasic aqueous system, surfactant, *rosmarinus officnalis*, solid-liquid extraction, chlorophyll, rosmarinic acid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivo Específico	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	5
3.1.1. Flavonóides	8
3.1.2. Terpenóides	9
3.1.3. Fenólicos	9
3.2. Biomoléculas	12
3.2.1. Clorofila	12
3.2.2. Ácido Rosmarínico	14
3.3. Processos de extração e purificação	17
3.3.1 Processos de extração	17
3.3.2. Processo de purificação.....	18
3.3.2.1 Sistema Aquoso Bifásico	18
3.3.2.2 Sistema Aquoso Bifásico Micelar	20
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	25
5. CAPÍTULO V- ARTIGO	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto do alecrim (<i>Rosmarinus Officinalis</i>). Fonte:Google Imagens	6
Figura 2. Estrutura química do Flavonóide e subgrupos	8
Figura 3. Estrutura química de alguns terpenóides presente no alecrim	11
Figura 4. Estrutura química de alguns compostos fenólicos presentes no extrato do alecrim	11
Figura 5. Estrutura molecular das clorofilas, para clorofila ‘a’ o R representa o radical metil (CH ₃) e para a clorofila ‘b’ o R representa o grupo aldeído (CHO).....	14
Figura 6. Estrutura molecular do ácido rosmarínico.....	14
Figura 7. Representação gráfica do diagrama de fases para um SAB. —, curva binodal; —, linha de amarração (TL);●, ponto crítico - PC. Acima da curva binodal encontra-se a região bifásica e abaixo dela a região é monofásico	23
Figura 8. Estrutura de uma molécula surfactante	21
Figura 9. Aspecto dos tipos de molécula surfactante.....	21
Figura 10. Esquema pra formação de aglomerados de molécula surfactante	21
Figura 11. Representação esquemática de um SABM, em que a concentração do surfactante é maior do que o CMC para permitir a formação de duas fases após ser submetida ao aumento de temperatura.....	24
Figura 12. Representação gráfica da curva de coexistência para um SABM. S1 – S4 representa a concentração de surfactante. Acima da curva binodal exhibe duas fases macroscópicas e abaixo apenas uma única fase.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. Fonte: (BOZIN *et al.*, 2007- Adaptado)

Tabela 2: Classes dos fenóis. Fonte: (GIADA, 2013- Adaptado)

Tabela 3: Propriedades do ácido rosmarínico. Fonte: PubChem.

Tabela 4: Mecanismo de ação e atividade do ácido rosmarínico. Fonte: (ALAGAWANY, M. *et al.*, 2017- Adaptado)

LISTA DE SIGLAS

SAB	Sistema aquoso bifásico
SABM	Sistema aquoso bifásico micelar
Chl	Clorofila
AR	Ácido Rosmarínico
CMC	Concentração micelar crítica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
K	Coeficiente de partição (adimensional)
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
TX-100	Triton X-100

ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A abordagem da Dissertação cujo o título é PROCESSO INTEGRATIVO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*), será dividida em 5 Capítulos. Nos três primeiros capítulos são apresentados a Introdução, Objetivos da Pesquisa, Revisão Bibliográfica e Referência Bibliográfica.

No Capítulo seguinte será apresentado os resultados referente ao processo estudado e relacionado à concentração e/ou purificação das biomoléculas de alto valor agregado provenientes de biomassa (clorofila e ácido rosmarínico). Os dados obtidos da pesquisa serão submetidos na forma de artigo a uma revista científica internacional de alta qualificação na Plataforma Qualis CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). O artigo “Integrative process to extract and purify bioactives compounds from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*) ” é apresentado no Capítulo V.

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

Os diferentes biomas do Brasil apresentam uma ampla biodiversidade, a qual é constituída por mais de 45 mil espécies de plantas (DUTRA et al., 2016). Na Mata Atlântica, no Agreste e na Caatinga da região Nordeste do país, pode ser encontrada uma ampla variedade de biomassas ricas em diversos princípios ativos. Como resultado, as plantas medicinais são fontes de compostos naturais, os quais possuem bioativos com propriedades benéficas à saúde humana. Portanto, nas últimas décadas ocorreu um aumento significativo na demanda por estudos principalmente relacionados às propriedades destes compostos (CARNEIRO et al., 2014; GUSMAN et al., 2015).

Rosmarinus officinalis, conhecido popularmente como alecrim é pertencente à família Labitae, é cultivado em regiões de clima temperado, sendo originário da região Mediterrânea (ARSLAN & MUSA ÖZCAN, 2008). A planta possui diversas aplicações industriais, tais como em alimentos e cosméticos, havendo também um grande interesse na área farmacêutica, em razão da grande variedade de efeitos benéficos à saúde humana (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015), como antidiurético, antiinflamatório, anticâncer, antioxidante, hepatoprotetores, antibacteriano, dentre outros (TAKAYAMA et al., 2016; MENA et al., 2016).

No alecrim são encontrados vários compostos que compreendem as classes terpenóides, flavonóides, fenólicos e iridóides. No óleo essencial do alecrim tem-se os terpenos de cadeia curta, os quais possuem características odoríferas e olfativas. Alguns compostos presentes no óleo essencial são: 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato de bornila, canfeno, α -pineno, p -cimeno, mirceno, sabineno, β -felandreno, dentre outros. Já os compostos flavonoides, fenólicos e terpenóides são detectados no extrato do caule, folha e flor. Os compostos constituídos no extrato possuem grandes propriedades antioxidantes, destacando-se os ácidos carnósico, caféico, p -cumárico, carnosólico, rosmarínico, o carnosol e a clorofila (SEDIGHI et al., 2015; ZHANG et al., 2012; BARNES et al., 2007). Dentre estes compostos destacam-se a clorofila e o ácido rosmarínico.

A obtenção de compostos bioativos a partir de fontes naturais, tornou-se atrativa em razão do seu potencial para as indústrias químicas. Isto se dá, especialmente, pelas

propriedades biológicas dos biocompostos. Esses compostos encontram-se nos extratos associados a outras moléculas, tornando o isolamento e a purificação extremamente complexos. Os processos utilizados para extração desses compostos bioativos, constituem um problema tecnológico tais como: a degradação de diversas biomoléculas; uso de elevadas quantidades de solventes orgânicos, que podem ser prejudiciais para o consumo humano; e, também existe a necessidade de inserir etapas adicionais para tratamento dos efluentes gerados no processo.

Assim, o impacto ambiental causado pela utilização de solventes voláteis, despertou a necessidade de desenvolver tecnologias sustentáveis, aplicando os princípios da química verde em diferentes procedimentos de conversão da biomassa. Para destacar esta nova vertente, surge o conceito de biorrefinaria, que abrange uma grande variedade de tecnologias para a utilização total da biomassa, de forma a obter produtos de alto valor agregado com menor impacto ambiental. Associado a este fator, além da necessidade de conceber novas tecnologias que possuam vantagens expressivas em relação às existentes, permitindo a aquisição de biocompostos de diferentes fontes, de forma eficiente, seletiva, sustentável e com alto rendimento, é fundamental a aplicação de técnicas que atendam a este ideal de extração. Uma alternativa promissora utilizada na extração de biomolécula, que atende a essas condições é a extração por sistemas aquosos bifásicos (SAB).

A extração líquido-líquido por meio dos SABs é conhecido desde o século XIX, mas vem se consolidando na última década devido às suas vantagens. Citam-se, baixo custo, facilidade de ampliar escala e a elevada biocompatibilidade com os solutos (IQBAL *et al.*, 2016). Além disso, a elevada quantidade de água presente nas fases do sistema, permite a partição de biomoléculas de distintas origens preservando suas características biológicas. Esses sistemas são tradicionalmente constituído por dois compostos que, a partir de determinada concentração em água, se separam espontaneamente em duas fases, cada uma rica em um dos constituintes formadores do sistema. Estes componentes podem ser polímeros, sais, líquidos iônicos, solventes orgânicos e solventes eutéticos profundos (FREIRE *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2015).

Além desses constituintes, os surfactantes podem ser aplicados na extração líquido-líquido, podendo gerar os sistemas aquosos bifásicos micelares (SABM). Estes apresentam algumas características únicas, como baixo custo e alto fator de recuperação, além de possuir a capacidade de permitir uma diferença significativa de polaridade entre as fases, ou seja, na sua composição, encontra-se uma fase hidrofílica e outra hidrofóbica

bem definidas (AURÉLIO *et al.*, 2017; CORDISCO *et al.*, 2016; MALPIEDI *et al.*, 2014; RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012). A descrição do equilíbrio de fases em SABM pode ser feita por meio de diagramas de fases, os quais são definidos como uma relação entre concentrações dos surfactantes e temperaturas, em que a curva binodal separa a região monofásica e bifásica (WATANABE & TANAKA, 1978; TANI *et al.*, 1998; SAITOH & HINZE, 1995; BORDIER, 1981). A agregação do surfactante em meio aquoso promove um meio distinto, que é completamente diferente do ambiente circundante, criando a base para uma extração e purificação eficiente de várias biomoléculas (LIU *et al.*, 1996).

Em virtude dessas características, estes SABs podem ser empregados nos estudos de particionamento de diversas biomoléculas, tendo como força motriz a característica hidrofílica-hidrofóbica da biomolécula alvo. O potencial pouco explorado do processo integrado para obtenção de biocompostos, de forma seletiva, gera uma necessidade premente de estudos mais aprofundados sobre o mesmo. Por esta razão, o objetivo deste estudo é o desenvolvimento de um método alternativo e sustentável para extração seletiva de biomolécula de alto valor agregado, e que possam ser aplicadas a diferentes áreas industriais, baseado no conceito de biorrefinaria, através das técnicas de extração líquido-líquido por meio do SABs, para extração seletiva, purificação, concentração de compostos nomeadamente clorofila e do ácido rosmarínico oriundos do alecrim.

Capítulo II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um procedimento alternativo e sustentável para a extração seletiva, concentração e purificação de compostos de alto valor agregado, nomeadamente clorofila e ácido rosmarínico, provenientes do alecrim, mediante a aplicação de uma sequência de processos integrados baseados na extração sólido-líquido e extração líquido-líquido por meio de sistemas aquosos bifásicos.

2.2. Objetivo Específico

A dissertação apresenta como objetivos específicos:

- Desenvolver diagramas de fases para sistemas formados por surfactante não iônico e iônico e tampão fosfato de sódio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), variando a molaridade e pH.
- Otimizar a extração da clorofila do alecrim utilizando solução aquosa de surfactante (Triton X-100) e tampão fosfato.
- Concentrar e purificar a clorofila utilizando sistemas aquosos bifásicos micelares baseado em Triton X-100) e tampão fosfato.
- Extrair o composto fenólico ácido rosmarínico utilizando diferentes soluções aquosas de solvente orgânico e água.
- Purificar o ácido rosmarínico utilizando sistemas aquosos bifásicos baseados em solvente orgânico e sal K_3PO_4 .

Capítulo III

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão descritas informações relativas a biomassa estudada, nomeadamente o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), bem como sua constituição e biomoléculas que se destacam e suas propriedades medicinais. Posteriormente, serão contextualizados os processos tradicionalmente aplicado para extração sólido-líquido destes compostos. E por fim, definições e características dos processos de purificação baseados na extração líquido-líquido por meio dos sistemas aquosos bifásicos serão apresentados.

3.1. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

A família Lamiaceae é uma das maiores e mais distintas famílias de plantas, que compreende cerca de 236 gêneros e mais de 7 mil plantas com flores. Uma grande variedade de gêneros é especialmente encontrada na região Mediterrânea. No entanto apenas *Rosmarinus officinalis* cresce naturalmente nessa região. Esta espécie é bastante explorada em razão da presença de óleos essenciais valiosos e compostos com extensa propriedade biológica. As plantas pertencentes a esta família destacam-se por possuírem grande potencial antioxidante e atividade antibacteriana, devido à sua composição em compostos fenólicos, flavonoides e outros componentes bioativos (ŠTEFAN *et al.*, 2014; RAJA, 2012).

Segundo Raja (2012), o nome original da família é Labitae por causa das suas flores, cuja pétalas estão fundidas no lábio superior e inferior, ainda que os botânicos prefiram utilizar Lamiaceae para referenciar esta família. As principais plantas aromáticas pertencentes à família *Lamiaceae*, as mais populares e frequentemente utilizadas são: *Melissa officinalis* L., *Lavandula officinalis* Chaix, *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Salvia pratensis* L. (APROTOSOAIE *et al.*, 2013).

Esta planta tem como característica a produção de flores com tonalidades que variam do azul ao violeta (Figura 1). Outra característica desta biomassa são as suas folhas lineares, estreitas e opostas, possuem entre 1 a 2,5 cm de comprimento e 4 cm de largura (BARNES *et al.*, 2007; BEGUM *et al.*, 2013). Na parte superior da superfície da folha observa-se uma coloração verde, e na parte inferior uma coloração mais clara com pelos

bem finos. Para obtenção de compostos, através do método de extração podem ser utilizadas diferentes partes da planta como caule, folha, flor e semente (MELO *et al.*, 2014; IBÁÑEZ *et al.*, 2003; HERRERO *et al.*, 2009).



Figura 1. Aspecto do alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Fonte:Google Imagens

Segundo Baroni *et al.* (2012), o óleo essencial é metabólico secundário, no qual a maioria dos compostos presentes são voláteis, de baixo peso molecular e rico em aroma. A sua composição química pode sofrer variações, que estão ligadas a diversos fatores endógenos tais como: parte da planta utilizada, condições ambientais, forma de cultivo, tipo de material (fresco, seco ou congelado), método de secagem, origem geográfica, além do método de extração (SVOBODA *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 2015).

O óleo essencial produzido pelo alecrim é uma complexa mistura de compostos, provenientes do seu metabolismo secundário. Sendo constituído por diversos compostos químicos, dentre esses se destacam: 1-8 cineol (majoritário), canfeno, pineno, verbonona, cânfora, lineol, dentre outros. No entanto, o óleo essencial representa apenas uma fração da composição da planta, assim outros compostos são encontrados no alecrim como compostos fenólicos, monoterpênicos e seus derivados, além dos sesquiterpênicos (BEGUN

et al., 2013; ZAOUALI *et al.*, 2010). Esses compostos podem ser obtidos a partir da extração de vários órgãos das plantas, nomeadamente, raízes, caules, folhas, flores e sementes. A Tabela 1 mostra a composição química do óleo essencial contido no alecrim e seus respectivos valores.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*

Compostos	Porcentagem (%)
Hidrocarbonetos de monoterpreno	44,7
Alfa-pineno	13,5
Canfeno	3,9
Limoneno	21,7
Hidrocarbonetos aromáticos de monoterpreno	2,0
o-Cymene	2,0
Monoterpreno oxigenado	46,9
Cânfora	21,6
Borneol	6,2
1,8- Cineol	2,1
Monoterpenos Aromáticos Oxigenados	0,4
Carvacol	0,3
Metil eugenol	0,1
Hidrocarbonetos Sesquiterpeno	2,2
e-Cariofileno	1,0
α -Humulene	0,9
α -Muurolene	0,1
Sesquiterpenos oxigenados	0,3
Cariofilenol	0,2
Óxido de cariofileno	0,1
Compostos alifáticos	1,9
3-Octenol	1,3
Octadecano	0,2
Nonadecano	0,3

Fonte: (BOZIN *et al.*, 2007- Adaptado)

Sabe-se que, além dos compostos voláteis, o alecrim é constituído por compostos não voláteis. Estes abrangem as classes dos: flavonóides, fenol e terpenóides. Dentre os compostos destacam-se os fenólicos, em razão do seu elevado potencial antioxidante, como o ácido rosmarínico, carnósico, carnasólico, caféico, ferúlico, p-cumárico, carnosol, rosmanol (MENA *et al.*, 2016; RIBEIRO-SANTOS *et al.*, 2015).

3.1.1. Flavonóides

Os flavonóides são metabólicos secundários sintetizados pelas plantas, pertencente à classe dos polifenóis. Encontram-se em diferentes tipos de plantas e frutos, que podem estar localizados em sementes, cascas e flores de plantas (BALENTINE *et al.*, 2015; HEIM *et al.*, 2002).

A estrutura básica dos flavonóides é constituída pela presença de anel fenólico e pirano; podendo ter classificação diferentemente, dependendo exclusivamente das substituições realizadas (Figura 2). Os flavonoides podem ser subdividido em outros subgrupos, os principais são: flavonas, flavonóis, catequinas ou flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas (KASPRZAK *et al.*, 2015; BEHLING *et al.*, 2004).

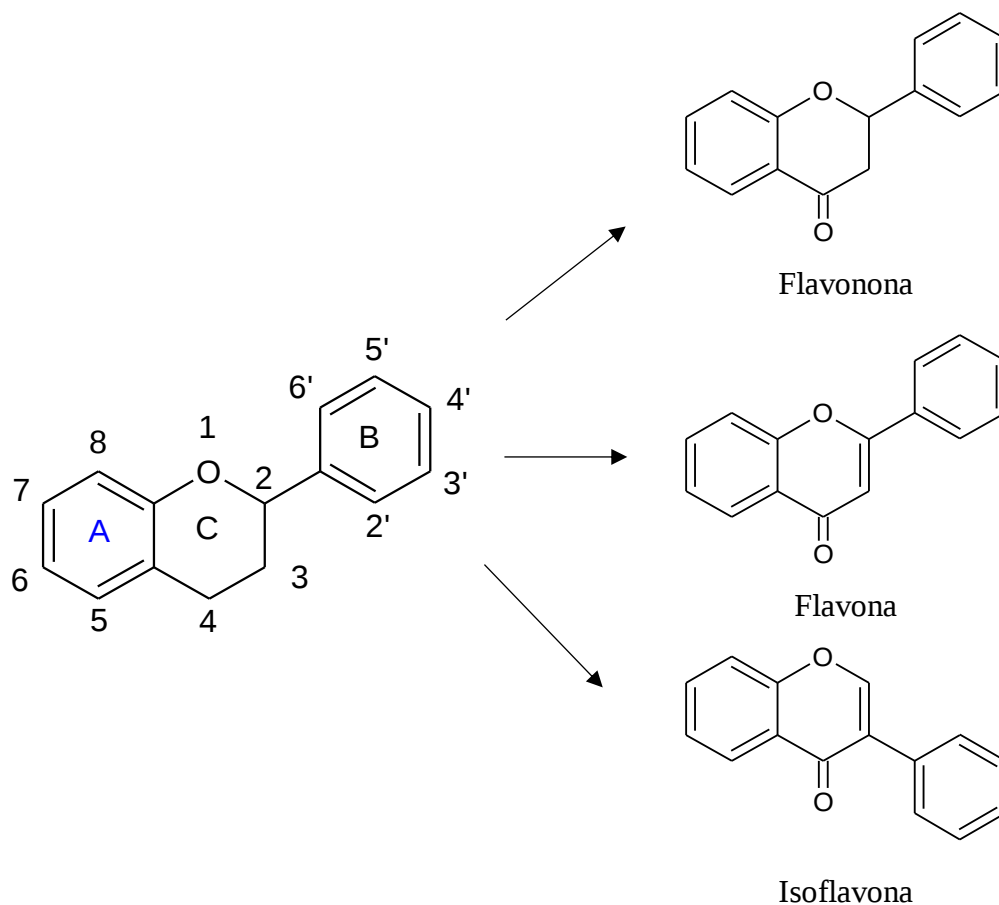


Figura 2. Estrutura química do Flavonóide e seus subgrupos

3.1.2. Terpenóides

Os terpenóides, também conhecidos como isoprenóides, representam a maior e mais diversificada classe de compostos, os quais possuem mais de 40 mil compostos químicos, que podem ser encontrados em todo reino vegetal, sejam sementes, folhas, raízes (THOLL, 2015).

A classificação dos terpenóides é baseada no número e na organização estrutural do carbono, que seria por meio do rompimento de ligação do carbono com unidades isoprenóides, em uma ligação regular ou irregular. Esta classe de compostos pode ser subdividida em grupos de acordo com o número de unidades de isopreno: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20 – C40), triterpenos (C30) (LANGENHEIM, 1994; NES & ZHOU, 2001).

Os compostos pertencentes a essa classe estão presentes principalmente nos óleos essenciais, tais como: limoneno, cânfora, α -pineno, além destes também são encontrados compostos não voláteis, por exemplo luteína e carnosol. Essas biomoléculas possuem propriedades biológicas importantes, as mais estudadas são: atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antisséptica, antiviral e anticâncer (LUDWICZUK *et al.*, 2017). A Figura 3 mostra exemplo de terpenóides presente na planta *R. officinalis*.

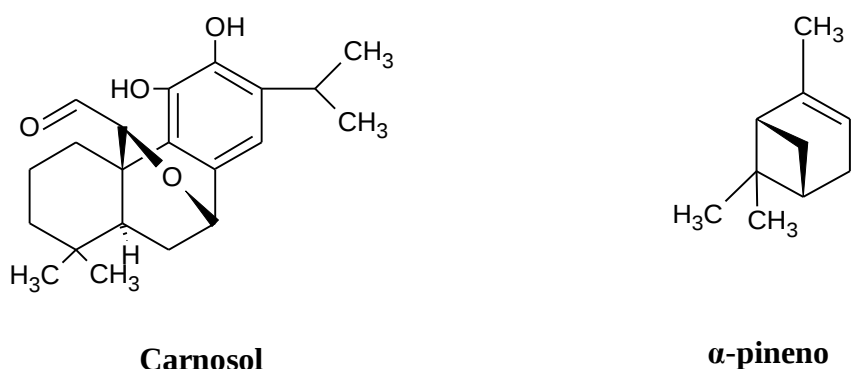


Figura 3. Estrutura química de alguns terpenóides presente no alecrim

3.1.3. Fenólicos

Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários em plantas, que tem como principal característica o potencial antioxidante, comumente encontrados em diferentes matrizes, principalmente em vegetais e frutas

(SOOB RATTEE *et al.*, 2005; TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008; LI *et al.*, 2014). Esses compostos possuem diversas atributos como, auxílio no desenvolvimento da cor e sabor dos alimentos, na proteção contra micro-organismos, além de ajudar no processo de amadurecimento dos frutos (PAZ *et al.*, 2015).

Quanto a estrutura, os compostos fenólicos são constituídos por um anel aromático, possuindo um ou mais grupos hidroxilas. Dessa forma, a classificação desses compostos é extremamente diversificada. Isso ocorre devido às estruturas heterogêneas que podem variar de uma molécula simples a compostos altamente polimerizados. A subdivisão dos compostos fenólicos podem estar de acordo com a quantidade de átomos de carbonos presente em sua estrutura, sendo as principais classes apresentadas na Tabela 2. (GIADA, 2013).

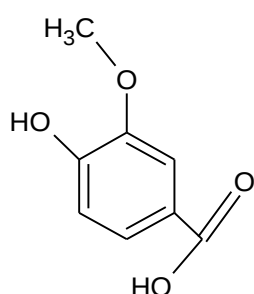
Tabela 2. Classes dos fenóis quanto a estrutura básica da cadeia carbônica.

Classes	Estrutura básica
Fenóis simples	C ₆
Benzoquinones	C ₆
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₃
Acetophenones	C ₆ -C ₂
Ácido Fenilacético	C ₆ -C ₂
Ácidos hidrocinâmicos	C ₆ -C ₃
Phenylpropenes	C ₆ -C ₃
Coumarins, isocoumarins	C ₆ -C ₃
Chromones	C ₆ -C ₃
Naphthoquinones	C ₆ -C ₄
Xanthonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbenes	C ₆ -C ₂ -C ₆
Anthraquinones	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignans e neolignans	(C ₆ -C ₃) ₂
Lignina	(C ₆ -C ₃) _n

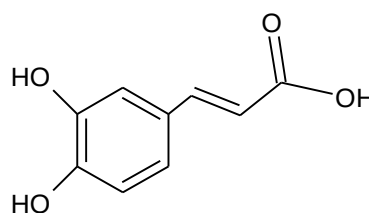
Fonte: (GIADA, 2013- Adaptado)

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na

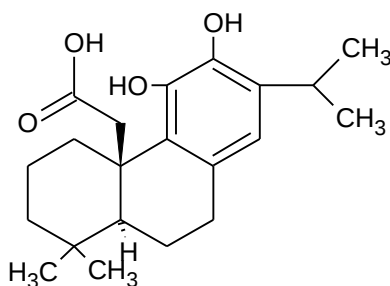
molécula (SOARES, 2002). Estes compostos podem ser divididos em dois grupos, nomeadamente ácidos hidroxibenzoico e ácidos hidroxicinâmicos, os quais são derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico, respectivamente (KING & YOUNG, 1999). Estes ácidos diferenciam-se pela quantidade de carbono na estrutura, o ácido benzóico possui C₆-C₁ e o ácido cinâmico C₆-C₃. Os principais derivados dos ácidos benzóicos são o gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecúico, vanílico e sirínico, enquanto aqueles mais comuns derivados dos ácidos cinâmicos são: caféico, ferúlico, ácidos p-cumárico, ácido rosmarínico e sinápico (BRAVO, 1998; BALASUNDRAM *et al.*, 2006; GIADA, 2013). A Figura 4 mostra alguns dos compostos presente no extrato do alecrim.



Ácido vanílico



Ácido caféico



Ácido carnósico

Figura 4. Estrutura de alguns compostos fenólicos presentes no extrato do alecrim.

Das classes químicas dos compostos presentes no alecrim, destacam-se os fenólicos, em razão do seu elevado potencial antioxidante, além desses, os pigmentos naturais também contém essa propriedade, por isso as biomoléculas clorofila e ácido rosmarínico são relevantes para o presente estudo.

3.2. Biomoléculas

3.2.1. Clorofila

O nome designado a este pigmento foi proposto em 1818 por Pelletier e Caventou, para mencionar a substância verde que se podia extrair das folhas com o auxílio de um solvente. Posteriormente, Berzelius investigou a composição química e estrutural desse composto, sendo verificado por Stokes utilizando análises de espectrofotometria a mistura de dois pigmentos que originavam a clorofila. No entanto, foi apenas no século XX que Willstatter elucidou os diferentes métodos para o isolamento desses pigmentos (BANNARI *et al.*, 2016; HUMPHREY, 1980).

A clorofila (Chl) é o pigmento natural mais abundante na natureza, identificado em diversos tipos de matrizes, tais como: plantas, frutas e algas. Nas plantas estes pigmentos encontram-se no cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Pode-se observar que a coloração pode variar, dependendo da presença associada de outros pigmentos, como os carotenóides (LEWIS & FLEMING, 2016).

A clorofila é a molécula responsável pela fotossíntese, pois absorve a luz solar e a converte em energia química que é armazenada nas ligações de fosfato do ADP e ATP, e como elétrons no NADH e FADH₂, que a conduzem para a cadeia transportadora de elétrons e posteriormente a energia do processo é também armazenada no ADP e ATP. Nas plantas verdes são encontradas os dois tipos de clorofila, 'a' e 'b', sendo a clorofila 'a' encontrada em todos os organismos que realizam a fotossíntese e a clorofila 'b' um pigmento suplementar que apenas auxilia a absorção a luz (PAPAGEORGIOU & GOVINDJEE, 2014).

As moléculas de clorofilas são estruturas formadas por derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio, como mostra a Figura 5. A estrutura desse composto é macrocíclica assimétrica constituída por quatro anéis de pirrol. Na clorofila 'a', o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no C3 e a clorofila 'b' contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil -CH₃ (AMIN *et al.*, 2018). A clorofila 'b' é sintetizada por meio da oxidação do grupo metil da clorofila 'a' a um grupo aldeído, por meio da ação de uma enzima denominada clorofila 'a' oxigenase (CAO) (XU *et al.*, 2001). Considerando que a biossíntese da clorofila 'b' é a mais estudada (TANAKA *et al.*, 1998). Contudo, não foram elucidados os co-fatores necessários para promover essa reação (OSTER *et al.*, 2000). No entanto, algumas pesquisas foram realizadas e foi

possível constatar que a utilização de proteínas viabilizam a estabilidade da CAO, a reação reversa pode ocorrer por meio do mesmo intermediário que envolve duas enzimas: a redutase de Chl b (CBR) e 7-hidroximetil redutase de Chl a (HCAR) (SAWICKI *et al.*, 2019).

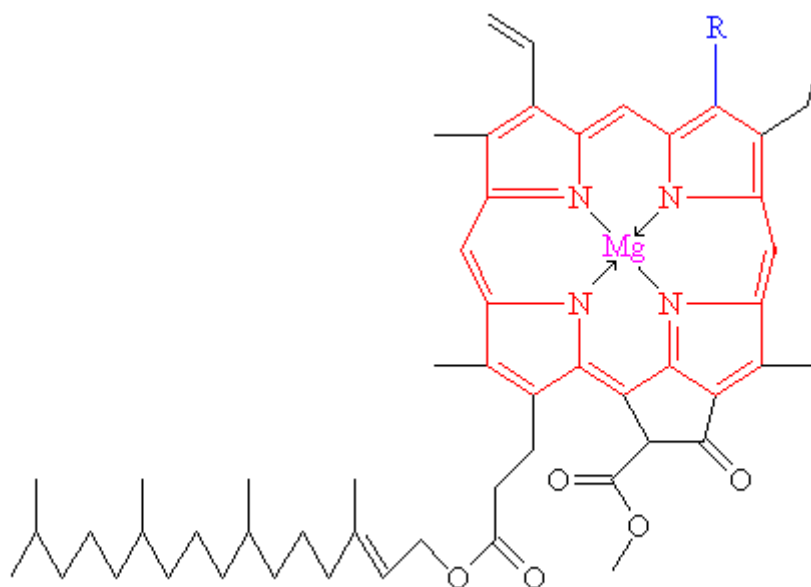


Figura 5. Estrutura molecular das clorofilas, para clorofila 'a' o R representa o radical metil (CH_3) e para a clorofila 'b' o R representa o grupo aldeído (CHO).

As clorofila 'a' e 'b' absorvem luz que podem variar a coloração, em azul, vermelho e violeta e a cor obtida refletir o comprimento de onda no tom verde. As plantas possuem uma absorção elevada na região visível que compreende a 390 nm e 750 nm, portanto sua concentração pode ser utilizada como indicador de suscetibilidade da planta à intensidade da luz (SYAFINAR *et al.*, 2015).

No ciclo de vida das plantas, estas passam pelo processo de degradação, isto ocorre quando a planta entra na senescência celular, que está associada a fatores endógenos, como diminuição da luz, déficit hídrico, mudança de temperatura, variação do pH, dentre outros fatores. Estes interferem no processo natural, podendo aumentar ou adiar a degradação da clorofila. O início desse processo dá-se, por meio da remoção da cauda de fitol, tanto da clorofila 'a' como da 'b', promovida pela enzima clorofilase, formando a feofitina. Um novo produto também pode ser formado, denominado feoforbídeo, este ocorre apenas com a remoção do átomo central (Magnésio) (STEINMAN *et al.*, 2017).

3.2.2. Ácido Rosmarínico

O ácido rosmarínico (AR) é um composto fenólico natural, produzido no metabólico secundário de plantas. Esse composto foi isolado primeiramente a partir da matriz vegetal *Rosmarinus officinalis* no ano de 1958, por dois italianos Scarpatti e Oriente (PERTENSEN & SIMMONDS, 2003). A estrutura química desse bioativo foi elucidada como um derivado do éster dos ácidos cafeico e 3,4-di-hidroxifenilático, com fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_8$ (TOPAL & GULÇIN, 2014). Algumas propriedades químicas do ácido estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do ácido rosmarínico

Massa molecular	360.318 g/mol
Ponto de fusão	171 - 175 °C
Log P	1,82
Log D (pH 5,5)	-1,14
Log D (pH 7,4)	-2,11
Solubilidade	Etanol/Metanol

Fonte: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

O ácido rosmarínico pode ser encontrado em plantas de diversas famílias, sendo comumente encontrados na Blechnaceae, Zosteraceae, Potamogetonaceae, Cannaceae e Lamiaceae. No entanto, nem todas as plantas pertencentes a esta família possuem esse composto (CORRAL-LUGO *et al.*, 2016; PERTENSEN & SIMMONDS 2003). A Figura 6 apresenta a estrutura molecular do ácido rosmarínico.

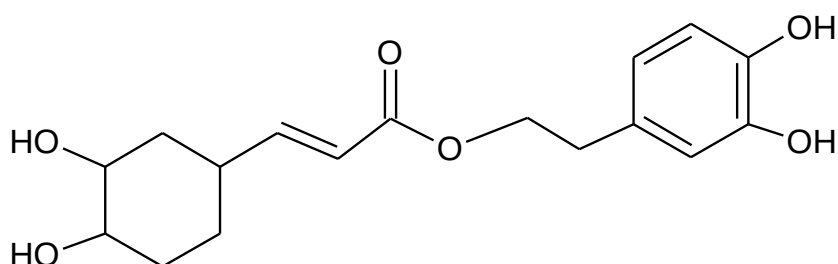


Figura 6. Estrutura molecular do ácido rosmarínico.

Várias propriedades biológicas vêm sendo descritas para o ácido rosmarínico, dentre as quais podemos destacar: neuroprotetora, antioxidante, antiinflamatória,

antimicrobiana, antiviral, dentre outras (PETERSEN & SIMMONDS, 2003). A Tabela 4 mostra alguns estudos das propriedades contidas neste composto.

A biossíntese desse ácido e seus derivados são iniciadas pelo processo de esterificação do ácido caféico a da tirosina através da fenilalanina. A reação ocorre a partir da desaminação e transformação da fenilalanina, empregando a catálise enzimática para obtenção do 4-coumaroil-CoA. A tirosina passa por um processo de transformação para obter o ácido 4-hidroxifenilático a partir da catálise da enzima hidroxifenilpiruvato redutase (HPPR). Para finalizar a síntese ocorre a combinação do 4-coumaroil-CoA e ácido 4-hidroxifenilático, que combinados com ácido 4-coumaroil-4'-hidroxifenilático (4CpHPL) consegue atingir o composto desejado (KIM *et al.*, 2015; PETERSEN & SIMMONDS, 2003).

Tabela 4. Mecanismo de ação e atividade do ácido rosmarínico.

<i>Tipo de estudo</i>	<i>Atividade</i>	<i>Resultados/Mecanismos</i>	<i>Referência</i>
In vivo	Antimicrobiana	Diminuição das contagens de bactérias patogênicas	Benedec <i>et al.</i> 2015
In vivo	Imunomodulador	Aumento do peso dos órgãos linfóides e melhorada função dos macrófagos	Rocío-Teruel <i>et al.</i> , 2015
In vitro e in vivo	Anti-inflamatória Imunomodulador	Inibição da inflamação eosinofílica, acumulação de células mucosas, citocinas Th2 e inibição de IgG alergênica e diminuição de IL-4 e IL-5	Sanbongi <i>et al.</i> , 2004
In vitro e in vivo	Antioxidante	Redução de produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e superóxido (O ₂) radicais.	Fernando <i>et al.</i> , 2016
In vivo	Neuroprotetor	Redução da necrose do glomérulo, dilatação da cápsula de Bowman e degeneração do epitélio tubular renal células	Ozturk <i>et al.</i> , 2014
In vivo	Anti-hiperglicêmico Anti-diabetes	Aumento da expressão de GLUT4 e diminuição da expressão de PEPCK	Runtuwene <i>et al.</i> , 2016
In vivo	Anti-alérgico	Inibiu a atividade de α -glucosidase	Zhu <i>et al.</i> , 2014
In vivo	Anti-câncer	Reduziu o fator de transcrição através da inibição de AP-I que é responsável pela ativação de COX-2	Hossan <i>et al.</i> , 2014

3.3. Processos de extração e purificação

3.3.1 Processos de extração

A extração consiste no isolamento de frações biologicamente ativa da planta, mediante a utilização de solventes como metodologia padrão. Tendo em vista que as técnicas de extração permitem separar os biocompostos formando misturas complexas em estado líquido ou semi-sólido, o processo tradicional de extração inicia-se através da colheita do material vegetal, seguido da secagem, redução da granulometria da amostra, extração, separação do sobrenadante, filtração e quantificação dos compostos. O método de extração escolhido influencia as análises quantitativas e qualitativas, em razão de alguns fatores, tais como: solvente, pressão, temperatura e tempo (AZWANIDA, 2015).

Atualmente existe uma grande variedade de métodos de extração para a obtenção de compostos bioativos contidos no alecrim. A extração sólido-líquido é realizada tradicionalmente com o auxílio de um solvente orgânico, durante um determinado tempo, com agitação e temperatura controladas, de modo a extrair algum componente de uma composto matriz. Essas condições, influenciam na eficácia da extração, além disso, a polaridade do solvente escolhido pode tornar o processo limitado, em razão da capacidade dos solventes em isolar a biomolécula alvo (JACOTET-NAVARRO *et al.*, 2015).

Para a obtenção dos compostos bioativos do *R. officinalis*, verificou-se que o métodos de extração convencional mais utilizado é maceração. Nas últimas décadas, novas técnicas foram descritas na literatura para a extração dessas biomoléculas, tais como extração assistida por microondas (EAM), extração assistida por ultrassom (EAU) e extração supercrítica (ES).

A maceração é processo no qual a matriz rica na biomolécula de interesse é colocada em contato com um solvente, e o conjunto submetido a agitação à temperatura ambiente. Este método normalmente consiste em múltiplas etapas, iniciada com a moagem da matriz vegetal em pequenas partículas, em seguida um solvente é adicionado a um recipiente fechado e por último o líquido é filtrado (AZMIR *et al.*, 2013).

A extração assistida por microondas é caracterizada por ter uma radiação não ionizante, que possui um rápido aquecimento em decorrência da interação direta com o material. O calor resultante desta interação é devido a dois mecanismos que são: rotação molecular e a migração iônica. Essa técnica utiliza ondas eletromagnéticas constituídas

por um campo magnético e elétrico. No campo eletromagnético a faixa de frequência se situa entre 300 MHz e 300 GHz (ROSELLÓ-SOTO *et al.*, 2016; ADETUNJI *et al.*, 2017).

A técnica de extração assistida por ultrassom consiste em uma técnica simples que pode ser utilizada para recuperação de óleo bem como para a obtenção de compostos bioativos de diferentes matrizes (SAMARAM *et al.*, 2015). Esta técnica provoca alterações físicas e químicas decorrentes da variação de pressão, produzindo cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura na parede celular do vegetal, facilitando assim a transferência de massa e calor e, portanto se verifica uma redução de tempo e um aumento de eficiência na extração (ROSTAGNO *et al.*, 2003; CHEMAT *et al.*, 2016).

A extração supercrítica é um processo de separação que utiliza um fluido supercrítico, normalmente utiliza-se dióxido de carbono - CO₂. Os fluidos são submetidos a condições de temperatura e pressão acima do seu ponto crítico. Nessas condições, vão apresentar propriedades características de gases e líquidos simultaneamente, dessa forma permite um maior penetração na amostra de forma que a extração mais eficiente e mais rápida (HERRERO *et al.*, 2006; CONDE-HERNANDEZ *et al.*, 2017).

Contudo, estes métodos de extração supracitados requisitam condições operacionais mais severas, isto é, temperaturas e pressões elevadas, e eles também necessitam da utilização de um equipamento mais sofisticado transformando o processo caro e complexo. A escolha do processo de extração e purificação de compostos bioativos está associado ao grau necessário de purificação das biomoléculas, assim, em comparação aos processos citados anteriormente, a utilização do sistema aquoso bifásico (SAB) é uma alternativa bastante eficiente para a extração, purificação e concentração de biomoléculas.

3.3.2. Processo de purificação

3.3.2.1 Sistema Aquoso Bifásico

O sistema aquoso bifásico (SAB) é um processo de extração líquido-líquido, utilizado para extração e purificação de biomoléculas, o qual é conhecido desde o século XIX, quando o holandês Beijerinck descobriu que a mistura de soluções aquosas contendo gelatina e amido em determinadas temperaturas e concentrações, formavam misturas que se disassociavam duas fases líquidas (GRILO *et al.*, 2014). Posteriormente, pesquisadores como Dobry e Boyer realizaram estudos sobre a miscilidades de diferentes polímeros em soluções aquosas ou orgânicas na formação desses sistemas. Porém,

Albertsson e colaboradores observaram que ao inserir uma proteína no SAB, esta biomolécula era distribuída diferentemente entre as duas fases, confirmando, desta maneira, o potencial da aplicação para a separação e/ou purificação de materiais biológicos (DOBRY & BOYER-KAWENOKI, 1947; ALBERTSSON, 1958).

De uma forma geral, os SABs ocorrem pela adição de dois compostos solúveis em água, que acima de determinadas concentrações críticas estabelece-se um equilíbrio termodinâmico, resultando na formação de duas fases aquosas imiscíveis (fase de topo e fase de fundo) (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). Cada fase do sistema torna-se rica com um dos constituintes formadores do sistema, obtendo duas fases aquosas com características químicas e físicas distintas, que possibilitam a migração da biomolécula para uma das fases, por afinidade. Esses sistemas são processos de extração com grandes vantagens, em razão ao baixo custo, de fácil ampliação de escala e de tecnologia simples, portanto são altamente eficazes para a separação, concentração e purificação de uma grande variedade de biomoléculas (SOARES *et al.*, 2015).

Na literatura já foram descritos vários compostos utilizados para promover a formação de sistemas aquoss bifasicos, tais como: diferentes polímeros (AZEVEDO *et al.*, 2009), sais inorgânicos (SOUZA *et al.*, 2010), açúcares (CHEN *et al.*, 2010), líquidos iônicos (FREIRE *et al.*, 2011), alcoóis (REIS *et al.*, 2012), acetonitrila (CARDOSO *et al.*, 2015), tetrahidrofurano (SOUZA *et al.*, 2016) e solventes eutéticos profundos (LI *et al.*, 2016).

Uma ampla variedade de fatores conduzem o mecanismo do processo de separação de fase e partcionamento de biomoléculas nos sistemas, no qual são extremamente complexos. Esses, compreendem as interações que ocorrem entre a biomolécula e as espécies presentes nas fases do sistema. Portanto, algumas propriedades físico-químicas são responsáveis na partição dos SABs, tais como: hidrofobicidade, concentração dos constituintes e carga das moléculas (ASENJO & ANDREWS, 2012). Para representar a composição dos sistemas são utilizados diagramas de fases, que exibem a concentração dos constituintes do sistema. Após a separação de fases são obtidas duas fases, que são representadas pelos pontos da fase de topo (F_T) e da fase de fundo (F_F). O encontro destes pontos forma a linha de amarração. A curva binodal é formada a partir dos pontos extremos de cada linha de amarração, essa curva representa a separação das regiões do sistema, onde a região bifásica encontra-se acima da curva binodal, já a monofásica está abaixo da curva. O ponto crítico (PC) mostra que a composição do sistema, neste ponto, é igual e pode ter o coeficiente de partição igual a 1 (KULA *et al.*,

1982; PEI *et al.*, 2012; GLYK *et al.*, 2014). A Figura 7 mostra a representação esquemática de um diagrama de fases para um SAB.

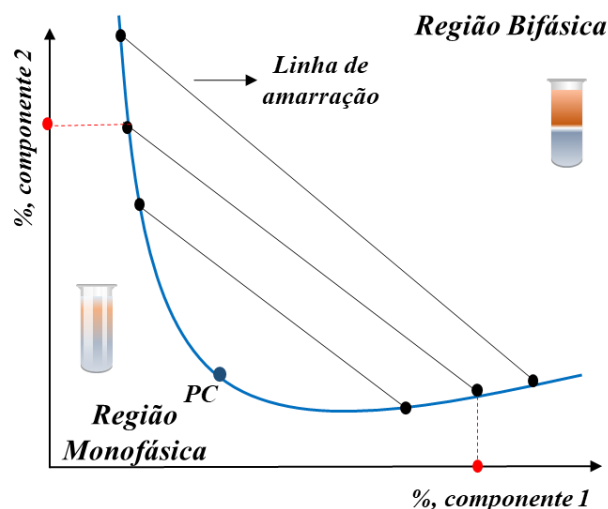


Figura 7. Representação gráfica do diagrama de fases para um SAB. —, curva binodal; —, linha de amarração (TL);●, ponto crítico - PC. Acima da curva binodal encontra-se a região bifásica e abaixo dela a região é monofásica;

Outros compostos, também podem ser empregados para promover a formação desses sistemas, como os surfactantes. Estes possuem como característica uma estrutura anfifílica, que é formada por uma região polar e uma apolar. Mônmeros de surfactantes que estão acima de uma determinada concentração constituem aglomerados denominado micelas. Esses componentes quando adicionados a uma determinada concentração e submetidos à temperatura, podem originar um sistema bifásico, o qual é titulado por sistemas aquosos bifásico micelares (SABM) (TANI *et al.*, 1998).

3.3.2.2 Sistema Aquoso Bifásico Micelar

O sistema aquoso bifásico micelar (SABM) consiste em um tipo de extração líquido-líquido, que foi descrito pela primeira vez por Watanabe e Tanaka em 1978, para concentração de íon zinco como metal quelado. Posteriormente, em 1981, Bordier utilizou esse tipo de sistema para extrair proteínas hidrofóbicas empregando um surfactante não iônico Triton X-114. Esses sistemas possuem características singulares, nomeadamente, baixo custo, alto fator de recuperação, alta seletividade e elevada biocompatibilidade, além dessas características, esse método é especialmente atrativo em consequência das suas propriedades físico-químicas, que são resultados da agregação de

monômeros de surfactante (AURÉLIO et al., 2017; CORDISCO et al., 2016; MALPIEDI et al., 2014; RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Os surfarctantes também conhecido como tensoativos podem ser de origem natural ou sintética, esses compostos vêm sendo utilizados em diferentes setores da indústria química. Esses compostos têm uma estrutura que é constituídas por uma parte hidrofílica (cabeça) e outra hidrofóbica (cauda) (ZAIN *et al.*, 2014), conforme mostra a Figura 8. Os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces fluidas com polaridades distintas sendo que a parte polar é responsável pela solubilidade em água (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004). A expressão surfactante é uma abreviatura do temo “*surface active agent*”, que significa agente ativo em uma superfície. Dessa forma, a expressão citada tem como significado a tendência de adsorção do surfactante em superfícies e interfaces.

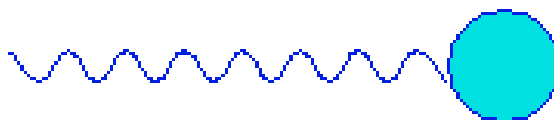


Figura 8. Estrutura de uma molécula surfactante

Existem diversos tipos de surfactantes, estes são classificados de acordo com a ionização da parte hidrofílica. A estrutura típica do surfactante é R-X, onde R é uma cadeia alquilica variando de 8 - 18 átomos e X é o grupo polar. Os surfactantes podem ser classificados dependendo da parte polar como iônicos (carga negativa), não-iônicos (não possui carga), catiônico (carga positiva) e anfotérica (transformar de catiônico para iônico)(Figura 9) (MANIASSO, 2001).

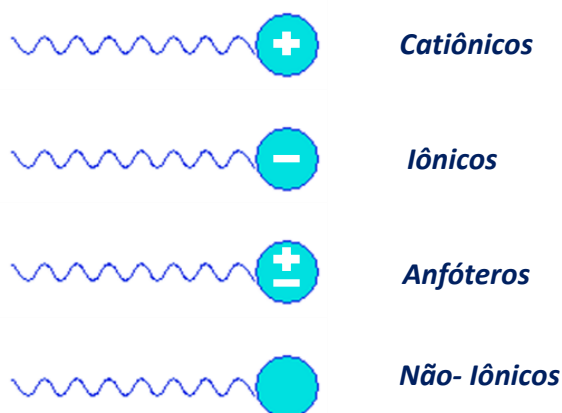


Figura 9. Aspecto dos tipos de molécula surfactante

A formação das micelas ocorrem em uma concentração mínima, denominada concentração micelar crítica (CMC), ou seja, quando a menor concentração em que o surfactante está em equilíbrio com as micelas. O CMC varia de acordo com a estrutura dos surfactantes (EDWARDS *et al.*, 1991). A formação de micelas retrata o equilíbrio termodinâmico, na qual é promovido por forças intermoleculares como van der Waals, ligações de hidrogênio e potencial eletrostático (CARVALHO SANTOS-EBINUM *et al.*, 2013).

Em uma solução aquosa, a diminuição da tensão superficial, ocorre em razão a diferentes fatores, que corresponde à presença de grupos anfifílicos, moléculas de surfactante em baixas concentrações, conseqüentemente pode existir interações entre as moléculas, que podem resultar na formação de aglomerados nomeadamente, micelas, esse processo é denominado micelização. O processo de agregação está relacionado a um aumento de entropia, que transcorre após a desidratação da região hidrofóbica da molécula promovendo a libertação das moléculas de água (CHEVALIER & ZEMB, 1980).

Esses aglomerados podem adotar formas e tamanhos diferentes, variando do esférico ao elipsoidal. Isso pode ser controlado variando algumas condições, como por exemplo, concentração do surfactante, temperatura, molaridade e tipo de sal e pH. Os aglomerados de surfactante orientam a cauda (cadeia alquílica) para centro formando um núcleo apolar. Isso ocorre independentemente da sua forma ou tamanho (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; WANG & WANG, 2014). A Figura 10 mostra a estrutura das micelas em solução.

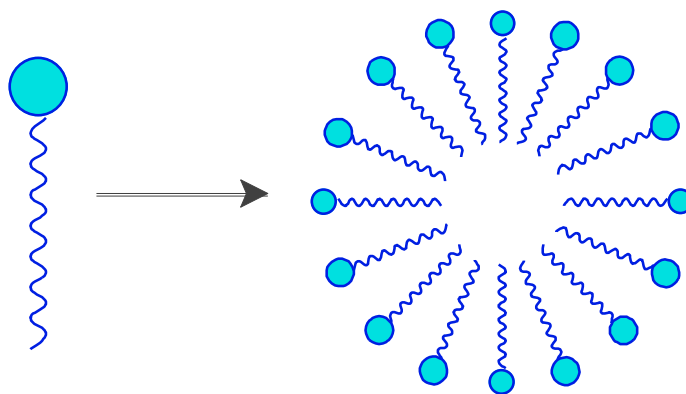


Figura 10. Esquema para formação de aglomerados de molécula surfactante

Além do CMC, existem outras formas de caracterizar as micelas, que é o número de agregação (n_a). Este refere-se ao número de monômeros constituídos em uma micela. O número de agregação podem aumentar ou diminuir em um meio aquoso, isso vai ocorrer com o aumento do comprimento da cadeia e com aumento da área da seção transversal da parte polar ou aumento do volume da porção hidrofóbica (YAZDI, 2011).

Em um sistema aquoso bifásico o particionamento de biomoléculas depende das propriedades físico-químicas como: ponto isoeletrico, hidrofobicidade, massa molar, tipo de surfactante, concentração, pH, e molaridade do sal. Atendendo a necessidade de obter alta seletividade e recuperação da biomolécula alvo, deve-se controlar essas características. Estes sistemas têm sido largamente aplicados como uma técnica de extração eficiente para uma ampla gama de biomoléculas, empregando surfactante (MAZZOLA *et al.*, 2008).

Uma solução aquosa de surfactante sofre a separação de fases com o aumento da temperatura, denominado ponto de nuvem (cloud point), resultando na formação de duas fases que é um ambiente singular para processo de bioseparações eficazes, já que possui uma fase rica em micelas (fase micelar) e a outra pobre em micelas (fase aquosa). Possivelmente, compostos hidrofílicos serão extraídos na fase aquosa, enquanto que compostos hidrofóbicos serão extraídos na fase micelar (CARVALHO SANTOS *et al.*, 2011). O SABM esta esquematizado na Figura 11.

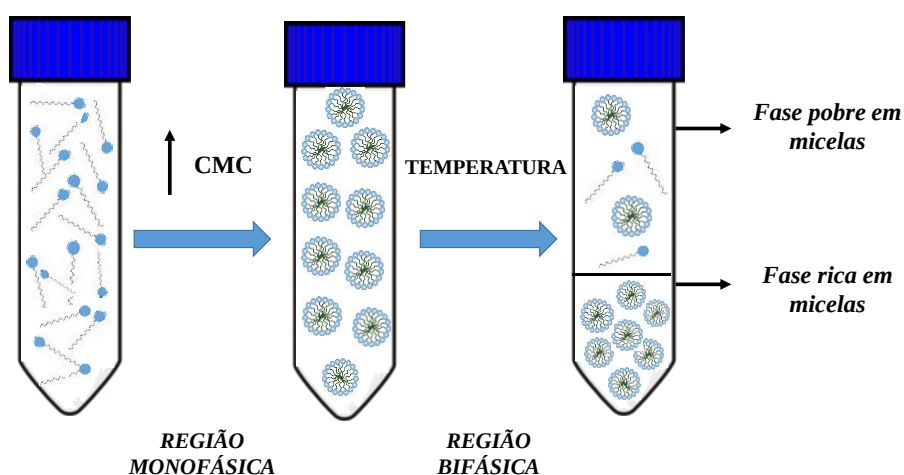


Figura 11. Representação esquemática de um SABM, em que a concentração do surfactante é maior do que o CMC para permitir a formação de duas fases após ser submetida ao aumento de temperatura.

O fenômeno de equilíbrio de fases induzido pelo aumento de temperatura pode ser analisado por meio da curva binodal, que a representação gráfica corresponde à separação das regiões do sistema, onde a região monofásica encontra-se abaixo da curva binodal e a região bifásica acima. Os diagramas de fases são descritos pela relação de concentração de surfactante e temperatura de *cloud point*. (FISCHER & FRANZREB, 2011). A Figura 12 mostra uma típica curva coexistência para o SABM.

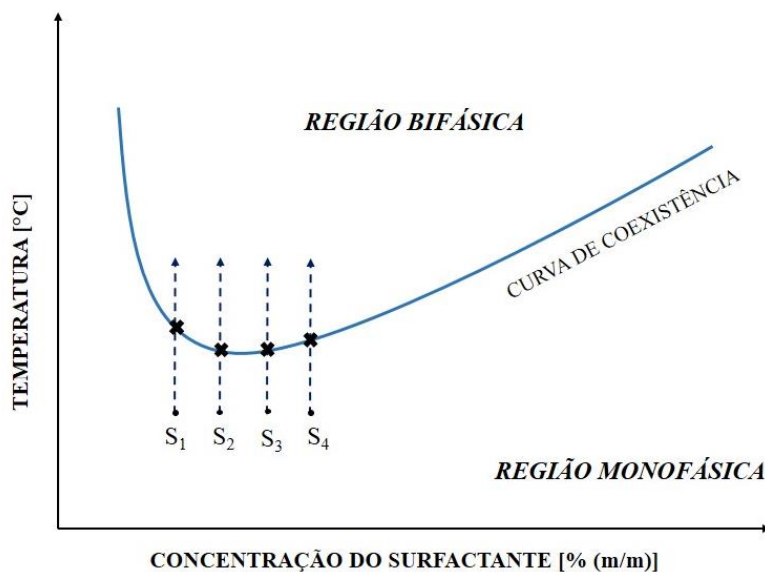


Figura 12. Representação gráfica da curva de coexistência para um SABM, S₁ – S₄ representa a concentração de surfactante. Acima da curva binodal exibe duas fases macroscópicas e abaixo apenas uma única fase.

As propriedades de agregação do SABM podem ser alterados, não apenas pela mudança de temperatura e pressão, mas também pela a adição de alguns aditivos, nomeadamente co-surfactantes. Estes podem ser outro surfactante ou líquidos iônicos, contribuindo para a modificação das propriedades físico-químicas das micelas, afetando o número de agregação e também o CMC do surfactante. Esses fenômenos são resultados das fortes interações entre os sais e as moléculas de água, provocando um maior desempenho no rendimento e na seletividade da extração (VICENTE *et al.*, 2017; CHRISTOV *et al.*, 2004).

Capítulo IV

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADETUNJI, L. R.; ADEKUNLE, A.; ORSAT, V.; RAGHAVAN, V. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review Food Hydrocolloids, 62: 239-250, 2017.
- ALAGAWANY, M.; EL-HACK, M.E.A.; FARAG, M.R.; GOPI, M.; KARTHIK, K.; MALIK, Y.S.; DHAMA, K. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. Animal Health Research Reviews. 1-10, 2017.
- ALBERTSSON, P. A. Particle fractionation in liquid two-phase systems; the composition of some phase systems and the behaviour of some model particles in them; application to the isolation of cell walls from microorganisms. Biochemica et Biophysica ACTA, 37: 378 – 395, 1958.
- ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNYL, L.; LORIMER, J. P.; MASON, T. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. Ultrasonics Sonochemistry, 11: 261 - 265, 2004.
- AMARAL, G.P.; CARVALHO, N.R.; BARCELOS, R. P.; DOBRACHINSKI, F.; PORTELA, R.L.; SILVA, M. H.; LUGOKENSKI, T. H.; DIAS, G. R. M.; LUZ, S.C.A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; VILLETI, M.A.; SOARES, F. A.A.; FACHINETTO, R.. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. Food and Chemical Toxicology 55:48–55, 2013.
- AMIN, M.; CHETPATTANANONDH, P.; KHAN, M. N.; MUSHTAQ, F.; SAMI, S. K. Extraction and Quantification of Chlorophyll from Microalgae *Chlorella* sp. Materials Science and Engineering 414: 1-8, 2018.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal Agricultural Food Chemistry, 52: 3530-3535, 2004.

- APROTOSOAIE, A.C.; RĂILEANU, E.; TRIFAN, A.; CIOANCĂ, O. The Polyphenolic content of common *Lamiaceae* species available as herbal tea products in Romanian Pharmacies. *Revista Medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi*, 117: 233-237, 2013.
- AQUINO, R.; CIAVATTA, M. L.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. A flavanone glycoside from *Hamelia patens*. *Phytochemistry* 29, 2358–2360, 1990.
- ARSLAN, D. & MUSA ÖZCAN, M. Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*, 49: 1258-1264, 2008.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications, *Journal of Chromatograph. A* , 1238:1 – 10, 2012.
- AURÉLIO, F.; TORRES, E.; CLARA, A.; FRANCISCO, D.A.; FERNANDO, J. Imidazolium-based ionic liquid as co-surfactant in aqueous micellar two-phase systems composed of nonionic surfactant and their aptitude for recovery of natural colorants from fermented broth. *Separation and Purification Technology*, 196: 262-269, 2017.
- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; PISCO, A.M.M.O.; VRIES, J.; Korporeaal, R.; VISSER, T.J.; AIREs-BARROS, M.R. Affinity-enhanced purification of human antibodies by aqueous two-phase extraction. *Separation and Purification Technology*, 65: 31–39, 2009.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A; GHAFOOR, K. NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review *Journal of Food Engineering*, 117: 426–436, 2013.
- AZWANIDA, N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*, 4: 1-16, 2015.
- BAHMANI, M.; ZARGARAN, A.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; SAKI, K. Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in the Urmia, Northwest Iran. *Asian Pacific Journal Tropical Medicine*. 7: S348-S354, 2014.

- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic Compounds In Plants And Agri-Industrial By-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, And Potential Uses. *Food Chemistry*, 99:191–203, 2006.
- BALENTINE, D.A.; DWYER, J.T.; ERDMAN, J. W. JR.; FERRUZZI, M.G.; GAINE, P. C.; HARNLY, J. M.; KWIK-URIBE, C. L. Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101: 1113 – 1125, 2015.
- BANNARI, A., & STAENZ, K. Hyperspectral chlorophyll indices sensitivity analysis to soil backgrounds in agrirultural aplications using field, Probe-1 and Hyperion. *IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS)* 978: 7129-7132, 2016.
- BARBA, F. J.; ZHU, Z.; KOUBAA, M.; SANT'ANA, A. S.; ORLIEM, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from. *Trends in Food Science & Technology*, 49: 96-109, 2016.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A; PHILLIPSON, J. D. *Herbal Medicines*, 3^a Ed. Pharmaceutical Press. 2007.
- BARONI, M. V.; NARANJO, R. D. P.; GARCÍA-FERREYRA, C.; OTAIZA, S.; WUNDERLIN, D. A. How good antioxidant is the red wine? Comparison of some in vitro and in vivo methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 47: 1 – 7, 2012.
- BEGUM A., SANDHYA S., SYED SHAFF ATH A., VINOD K.R., SWAPNA R., BANJI D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus Officinalis* (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Pololonorum Technology Aliment*, 12: 61-73, 2013.
- BEHLING, E. V.; SANDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15: 285 -292, 2004.
- BENDIF, H.; BOUDJENIBA, M.; MIARA, M.D; BIQIKU, L.; BRAMUCCI, M.; CAPRIOLI, G.; LUPIDI, G.; QUASSINTI, L.; SAGRATINI, G.; VITALI, L.A; VITTORI, S.; MAGGI, F. *Rosmarinus eriocalyx*: an alternative to *Rosmarinus officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 218: 78-88, 2016.
- BENEDEC, D.; HANGANU, D.; ONIGA, I.; TIPERCIUC, B.; OLAH, N.K.; RAITA, O.; BISCHIN, C.; DUMITRESCU, R. S.; VLASE, L. Assessment of rosmarinic acid content in six Lamiaceae species extracts and their antioxidant and

- antimicrobial potential. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28: 2297–2303, 2015.
- BERNATONIENE, J.; CIZAUSKAITEA, U.; IVANAUSKAS, L.; KAKSTAS, V.; KALVENIENEA, Z.; KOPUSTINSKIENEA, D. M. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Industrial Crops and Products*, 84: 72 – 79, 2016.
- BORDIER, C. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *The Journal of Biological Chemistry*. 254: 1604 -1607, 1981.
- BOZIN, B; DUKIC, N. M; SAMOJLIK, I; JOVIN, E. Antimicrobial And Antioxidant Properties Of Rosemary And Sage (*Rosmarinus Officinalis* L. And *Salvia Officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal Agricultural And Food Chemistry*, 55: 7879–7885, 2007.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, And Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317–333, 1998.
- CANELAS, V.; COSTA, C. T. Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Extracts of *Melissa officinalis* and Spectrophotometric Measurent of their antioxidant activities. *Journal of chemical education*, 84: 1502-1504, 2007.
- CARDOSO, G.B.; SOUSA, I.N.; PEREIRA, M.M.; FREIRE, M.G.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile. *Separation and Purification Technology*, 136: 74-80, 2014.
- CARDOSO, G.B.; SOUZA, I. N.; PEREIRA, M. M.; COSTA, L. P.; FREIRE, M. G.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, 94: 317–323, 2015.
- CARNEIRO, F.M.; PEREIRA, S.M.J.; BORGES, L.L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J.D.P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. *Revista Sapiência*, 3: 44-75, 2014.
- CARVALHO SANTOS - EBINUMA, V.; MORENI LOPES, A.; CONVERTI, A.; PESSÔA JR., A.; RANGEL - YAGUI, C. Behavior of Triton X-114 cloud point in the presence of inorganic electrolytes. *Fluid Phase Equilibria*, 360: 435 – 438, 2013.
- CARVALHO SANTOS, V.; HASMANN, A. F.; CONVERTI, A.; PESSOA JR., A. Liquid - liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for

- clavulanic acid recovery from fermented broth. *Biochemical Engineering Journal*, 56 : 75 – 83, 2011.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34: 540-560, 2016.
- CHEN, Y., MENG, Y., ZHANG, S., ZHANG, Y., LIU, X., YANG, J. Liquid–liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55:3612–3616, 2010.
- CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. *Reports on Progress in Physics*, 53: 279–371, 1980.
- CHRISTOV, N. C.; DENKOV, N. D.; KRALCHEVSKY, P. A.; ANANTHAPADMANABHAN, K. P.; LIPS, A. Synergistic Sphere-to-Rod Micelle Transition in Mixed Solutions of Sodium Dodecyl Sulfate and Cocoamidopropyl Betaine. *Langmuir* 20: 565-571, 2004.
- CIENFUEGOS, N. E. C.; SANTOS, P. L.; GARCÍA, A. R.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; SOUZA, R. L. Integrated process for purification of capsaicin using aqueous two-phase systems based on ethanol. *Food and Bioproducts Processing*, 106: 1- 10, 2017.
- CLÁUDIO, A.F.M.; FREIRE, M.G.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.; COUTINHO, J.A.P. Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 75: 39-47, 2010.
- CONDE-HERNÁNDEZ, L. A.; ESPINOSA-VICTORIA, J. R.; TREJO, A. GUERRERO-BELTRÁN, J. A. CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*, 200: 81-86, 2017.
- CORDISCO, E.; HAIDAR, C.N.; COSCUETA, E.R.; NERLI, B.B.; MALPIEDI, L.P. Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar system. *Food Chemistry*, 213: 514-520, 2016.
- CORDISCO, E.; HAIDAR, C.N.; GOÑI, R.; NERLI, B.B.; MALPIEDI, L.P. Physicochemical characterization of aqueous micellar systems formed by environmentally friendly salts. *Fluid Phase Equilibria*, 393: 111-116, 2015.

- CORRAL-LUGO, A.; DADDAOUA, A.; ORTEGA, A.; ESPINOSA-URGEL, M.; KRELL, T. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science Signaling*, 9: 1-11, 2016.
- DE TOMMASI, N.; DE SIMONE, F.; DE FEO, V.; PIZZA, C. Phenylpropanoid Glycosides and Rosmarinic Acid from *Momordica balsamina*. *Planta Medica* 57: 201, 1991.
- DOBRY, A.; BOYER-KAWENOKI, F. Phase separation in polymer solution. *Journal of Polymer science*, 2: 90 -100, 1947.
- DUTRA, R.C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. , 112: 4-29, 2016.
- EDWARDS, D. A.; LUTHY, R. G.; LIU, Z. Solubilization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Micellar Nonionic Surfactant Solutions. *Environmental Science Technology*, 25:127-133, 1991.
- FERNANDO, P. M.; PIAO, M. J.; KANG, K. A.; RYU, Y.S.; HEWAGE, S. R.; CHAE, S.W.; HYUN, J. W. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 24: 75–84, 2016.
- FISCHER, I.; FRANZREB, M. Direct determination of the composition of aqueous micellar two-phase systems (AMTPS) using potentiometric titration—A rapid tool for detergent-based bioseparation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 377: 97-102, 2011.
- FREIRE, M.G.; LOUROS, C.L.S.; REBELO, L.P.N.; COUTINHO, J.A.P. Aqueous biphasic systems composed of water-stable ionic liquid + carbohydrate and their applications. *Green Chemistry*, 3: 1536-1545, 2011.
- GARCIA-JIMENEZ, A.; MUNOZ-MUNOZ, J. L.; GARCÍA-MOLINA, F.; TERUEL-PUCHE, J. A.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. Spectrophotometric Characterization of the Action of Tyrosinase on p-Coumaric and Caffeic Acids: Characteristics of o-Caffeoquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 3378-3386, 2017.
- 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**, 45: 1082-1087, 2010.

- GEETHA, N. P.; MAHESH, M.; BETTADAIAH, B. K.; KINI, R. K.; PRAKASH, H. S. HPLC Method for Determination of p-coumaric acid from the Medicinal Herb *Leptadina reticulata*. *International Journal of Phytomedicine*, 3:319-324, 2011.
- GIADA, M. L. R.. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources And Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress And Chronic Degenerative Diseases - A Role For Antioxidants*. Rijeka: Intech, 87–112, 2013.
- GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG–Salt Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 59: 850-859, 2014.
- GOMEZ, G.; LEIVA, L.; BIBIANA, B. N. Aqueous two-phase systems: a simple methodology to obtain mixtures enriched in main toxins of *Bothrops Alternatus* Venom. *Protein Expression and Purification*, 124:68-74, 2015.
- GRILO, A. L.; RAQUEL AIRES-BARROS, M.; AZEVEDO, A. M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. *Separation & Purification Reviews*, 45: 68–80, 2014.
- GUSMAN, G.S.; CAMPANA, P.R.V.; CASTRO, L.C.; CASTILHO, R.O.; TEIXEIRA, M.M.; BRAGA, F.C. evaluation of the effects of some brazilian medicinal plants on the production of TNF- α and CCL2 by THP-1 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 1-11, 2015.
- HEIM, K. E; TAGLIAFERRO, A. R; BOBILYA, D, J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572–584, 2002.
- HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. *Food Chemistry*, 98:136-148, 2006.
- HERRERO, M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for extraction of bioactives from Rosemary. Chemical and functional characterization via UPLC-MS/MS and in-vitro assays. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2512-2520, 2009.
- HILLER, K. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoidae. 1.Mitteilung: *Sanicula europaea* L.—Isolierung und quantitative Erfassung von Chlorogen-und Rosmarinsäure. *Pharmazie* 20: 574–579, 1965.

- HOSSAN, M. S.; RAHMAN, S.; ANWARUL BASHAR, A. B. M.; JAHAN, R.; AL-NAHAIN, A.; RAHMATULLAH, M. Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3: 57–70, 2014.
- HUMPREY, A.M. Chlorophyll. *Food chemistry*, 5: 57 – 67, 1980.
- IBÁÑEZ, E; KUBÁTOVÁ, A; SEÑORÁNZ, F. J; CAVERO, S; REGLERO, G; HAWTHORNE, S. B. Subcritical Water Extraction Of Antioxidant Compounds From Rosemary Plants. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 51: 375-382, 2003.
- IQBAL, M., TAO, Y., XIE, S., ZHU, Y., CHEN, D., WANG, X., YUAN, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biological Procedures Online*, 18: 1 – 18, 2016.
- JACOTET-NAVARRO, M.; ROMBAUT, N.; FABIANO-TIXIER, A.S.; DANGUIEN, M.; BILLY, A.; CHEMAT, F. Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27: 102-109, 2015.
- JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E.G.; WEBSTER, T.J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *International Journal of Nanomedicine*, 12: 2957-2978, 2017
- KASPRZAK, M. M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. *RSC Advances*, 5: 45853-45877, 2015.
- KELLEY, C. J.; MAHAJAN, J. R.; BROOKS, L. C.; NEUBERT, L. A.; BRENEMAN, W. R.; CARMACK, M. Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales* Dougl. Ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 40: 1804–1815, 1975.
- KIM, G. D.; PARK, Y. S.; JIN, Y. H.; PARK, C. S. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:2083–2092, 2015.
- KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99: 213-218, 1999.
- KULA, M.-R.; KRONER, K.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In: (Ed.). *Reaction Engineering* Springer Berlin Heidelberg, 24: 73- 118, 1982.

- LANGENHEIM, J.H. Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview Of Their Ecological Roles. *Journal Of Chemical Ecology*, 20 : 1223-1280: 1994.
- LEITE, A. C.; FERREIRA, A. M.; MORAIS, E. S.; KHAN, I.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Cloud Point Extraction of Chlorophylls from Spinach Leaves Using Aqueous Solutions of Nonionic Surfactants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6:590-599, 2018.
- LEWIS, N. H. C., & FLEMING, G. R. Two-Dimensional Electronic-Vibrational Spectroscopy of Chlorophyll a and b. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 7: 831–837, 2016.
- LI, A.-N. LI, S.; ZHANG, L.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6: 6020-6047, 2014.
- LI, N.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, Y.; WEN, Q.; DING, X. Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein. *Talanta*, 152: 23–32, 2016.
- LIMA, A. S.; SANTANA, C. C. PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. Editora Universidade Tiradentes- Edunit, 220 p. 2017.
- LITVINENKO, V. I.; POPOVA, T. P.; SIMONJAN, A.V.; ZOZ, I. G.; SOKOLOV, V. S. “Gerbstoffe” und Oxyzimtsa” ureabko” mmlinge in Labiaten. *Planta Medica*, 27: 372–380, 1975.
- LIU, C.L.; NIKAS, Y.J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparation using two-phase aqueous micellar system. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 185-192, 1996.
- LIU, T.; SUI, X.; SHANG, R.; YANG, L.; ZU, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z. Application pf ionic liquid based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officialis*. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8480-8489, 2011.
- LUDWICZUK, A.; SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GEORGIEV, M. I. Terpenoids. *Pharmacognosy*, c.11: 233–266, 2017.
- MALPIEDI, L.P.; NERLI, B.B.; ABDALA, D.S.P.; PESSOA-FILHO, P.D.A.; PESSOA JR, A. Aqueous micellar system containing Triton X-144 and *Pichia pastoris* fermentation supernatant: A novel alternative for single chain-antibody fragment purification. *Separation and Purification Technology*, 132: 295-301, 2014.
- MANIASSO, N. AMBIENTES MICELARES EM QUÍMICA ANALÍTICA. *Quimica Nova*, 24: 87-93, 2001

- MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; JOZALA, A. F.; PENNA, T.C. V.; MAGALHÃES, P. O.; RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA, A. Jr. Review Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 143-157, 2008.
- MELO, M. M. R; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The journal of supercritical fluids*., 95: 115 – 176, 2014.
- MENA, P.; CIRLINI, M.; TASSOTTI, M.; HERRLINGER, K. A.; DALL’ASTA, C.; RIO, D. D. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. *Molecules*, 21: 1576 – 1591, 2016.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer’s spent grain. *Industrial Crops And Products* 25: 231–237, 2007.
- NAVIGLIO, D. Naviglio's Principle and Presentation of an Innovative Solid-Liquid Extraction Technology: Extractor Naviglio, *Analytical Letters*, 36: 1647-1659, 2003.
- NAVIGLIO, D.; PIZZOLONGO, F.; ROMANO, R.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, B.; SANTINI, A. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the Naviglio extractor for the production of lemon liquor. *African Journal of Food Science*, 1: 42-50, 2007.
- NES, W.D. & ZHOU, W. Terpenoids: Higher. *Encyclopedia Of Life Sciences / & 2001*.
- ONCSIK, T.; TREFALT, G.; BORKOVEC, M.; SZILAGYI, I. Specific Ion Effects on Particle Aggregation Induced by Monovalent Salts within the Hofmeister Series. *Langmuir*, 31: 3799–3807, 2015.
- OSTER, U. TANAKA, R. TANAKA, A. RÜDIGER, W. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 21: 305 – 310, 2000.
- OOI, C.W; TEY, B.T; HII, S.L; KAMAL, S.M.M.; LAN, J.C.W.; ARIFF, A; LING, T.C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 44: 1083-1087, 2009.

- OZTURK, H.; OZTURK, H.; TERZI, E. H.; OZGEN, U.; DURAN, A.; UYGUN, I. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Journal Pakistan Medicine Association*, 64: 260–265, 2014.
- PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; KARAYANNIS, M.I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24: 426 – 436, 2005.
- PAPAGEORGIOU, G. C.; & GOVINDJEE. The Non-Photochemical Quenching of the Electronically Excited State of Chlorophyll a in Plants: Definitions, Timelines, Viewpoints, Open Questions. *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*, 1–44, 2014.
- PAZ, M., GÚLLON, P., BARROSO, M. F., CARVALHO, A. P., DOMINGUES, V. F., GOMES, A. M., DELERUE-MATOS, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172: 462–468, 2015.
- PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal Science Food Agricultural*, 96: 2952 – 2962, 2016.
- PETERSEN, M; SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic Acid. *Phytochemistry* 62: 121–125: 2003.
- RAJA, R. R. Medicinally Potential Plants of Labitae (Lamiacea) Family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant*, 6: 201-213, 2012.
- RANGEL-YAGUI, C.O.; JUNIOR, A.P.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems - an alternative method for protein purification *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 21:531 - 544, 2004.
- 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*, 135: 2453-2461, 2012.
- RIBEIRO SANTOS, R.; CARVALHO-COSTA, D.; CAVALEIRO, C.; COSTA, H.S.; ALBUQUERQUE, T.G.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F. MELO, N.R.; SANCHES-SILVA, A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*, 45: 355 – 368, 2015.

- ROCÍO-TERUEL, R. M.; GARRIDO, M. D.; ESPINOSA, M.C.; LINARES, M. B. Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chemistry*, 172: 40–46, 2015.
- RODRIGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvent. *Journal of Food Engineering*, 109: 98–103, 2012.
- ROLIM, A.; MACIEL, C.P.M.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; VELASCO, M.V.R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (*Meliaceae*) and *Ptychopetalum olacoides* bentham (*Olacaceae*) commercial extract. *Journal of AOC International*, 88: 1015-1019, 2005.
- ROSELLÓ-SOTO, E.; PARNIAKOV, O.; DENG, Q.; PATRAS, A.; KOUBAA, M.; GRIMI, N.; BOUSSETA, N.; TIWARI, B. K.; VOROBIEV, E.; LEOVKA, N.; BARBA, F. J. Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8:214–234, 2016.
- ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultraound-assisted extraction of soy isoflavone. *Journal of Chromatography A*, 1012: 119-128, 2003.
- 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: 1–13, 2012.
- RUNTUWENE, J.; CHENG, K.C.; ASAKAWA, A.; AMITANI, H.; AMITANI, M.; MORINAGA, A.; TAKIMOTO, Y.; KAIRUPAN, B. H. R.; INUI, A. Rosmarinic acid ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity in diabetic rats, potentially by modulating the expression of PEPCK and GLUT4. *Journal of Drug Design, Development and Therapy*, 10: 2193–2202, 2016.
- SAITOH, T.;HINZE, W.L. Use of surfactante-mediated phase (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta*, 42: 119-127, 1995.
- SAMARAM, S.; MIRHOSSEINI, H.; TAN, C. P.; GHAZALI, H. M.; BORDBAR, S.; SERJOUIE, A. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry*, 172: 7-17, 2015.

- SANBONGI, C.; TAKANO, H.; OSAKABE, N. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clinical and Experimental Allergy*, 34: 971–977, 2004.
- SANTOS, P.L.; SANTOS, L.N.S.; VENTURA, S.P.M.; SOUZA, R. L.; COUTINHO, J.A.P.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and cholinium-based ionic liquids. *Chemical Engineering Research and Design*, 112: 103-112, 2016.
- SATAKE, T.; KAMIYA, K.; SAIKI, Y.; HAMA, T.; FUJIMOTO, Y.; KITANAKA, S.; KIMURA, Y.; UZAWA, J.; ENDANG, H.; UMAR, M. Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47: 1444–1447, 1999.
- SAWICKI, A.; WILLOWS, R. D.; CHEN, M. Spectral signatures of five hydroxymethyl chlorophyll a derivatives chemically derived from chlorophyll b or chlorophyll f. *Photosynthesis Research*, 1 – 13, 2019.
- SCARPATI, M. L. & ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus* off.). *La Ricerca Scientifica*, 28: 2329–2333, 1958.
- SEDIGHI, R.; ZHAO, Y.; YERKE, A.; SANG, S. Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: a brief review. *Current Opinion in Food Science*, 2: 58–70, 2015.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. *Revista De Nutrição*, 15: 71-81, 2002.
- SOARES, R. R. G.; AZEVEDO, A. M.; VAN ALSTINE, J. M.; AIRES-BARROS, M. R. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*, 10: 1158 – 1169, 2015.
- SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.;BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579:200–213, 2005.
- SOUZA, K. M.; MERLO, L. H. Z.; MARQUES, M. N.; CAVALCANTI, E. B.; SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Partitioning of diuron in a novel aqueous two-phase system based on polyols and tetrahydrofuran. *Fluid Phase Equil*, 429: 325-330, 2016.

- SOUZA, R.L.; BARBOSA, J.M.P.; ZANIN, G.M.; LOBAO, M.W.N.; SOARES, C.M.F.; LIMA, A.S. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 16: 288-300, 2010.
- ŠTEFAN, M. B.; RODRIGUEZ, J. V.; BLAZEKOVIĆ, B.; KINDL, M.; Vladimir-Knežević, S. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on Lamiaceae Species. *Food Analytical Methods*, 7: 326–336, 2014.
- STEINMAN, A. D.; LAMBERTI, G. A.; LEAVITT, P. R.; UZARSKI, D. G. Biomass and Pigments of Benthic Algae. *Methods in Stream Ecology*, 1: 223–241, 2017.
- SVOBODA, K. P.; DEANS, S. G. A study of the variability of rosemary and sage and their volatile oils on the British market: their antioxidative properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 7: 81-87, 1992.
- SYAFINAR, R.; GOMESH, N.; IRWANTO, M.; FAREQ, M.; IRWAN, Y. M. Chlorophyll Pigments as Nature Based Dye for Dye-Sensitized Solar Cell (DSSC). *Energy Procedia*, 79: 896–902, 2015.
- TAKAYAMA, C.; DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A.; DUNDER, R. J.; MANZO, L. P.; SOCCA, E. A. R.; BATISTA, L. M.; SALVADOR, M. J.; SOUSA-BRITO, R. M.; LUIZ-FERREIRA, A. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6:677-681, 2016.
- TANAKA, A.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, N. K.; YOSHIDA, K.; OKADA, K. Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 21: 12719-12723, 1998.
- TANI, H.; KAMIDATE, T.; WATANABE, W. Aqueous micellar two-phase systems for protein separation. *Analytical Sciences*, 14: 875-888, 1998.
- TAPAS, A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmacy Research*, 7:1089-1099, 2008.
- THOLL, D. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Biotechnology of Isoprenoids*, 148:63-106, 2015.
- TOPAL, M.; GULÇIN, I. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turkish Journal of Chemistry* 38: 894 – 902, 2014.
- VICENTE, F. A.; CARDOSO, I. S.; SINTRA, T. E.; LEMUS, J.; MARQUES, E. F.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P. The Impact of Surface Active Ionic

- Liquids on the Cloud Points of Nonionic Surfactants and the Formation of Aqueous Micellar Two-Phase Systems. *The Journal of Physical Chemistry*, 121: 8742–8755, 2017.
- VICENTE, G.; MOLINA, S.; GONZÁLEZ-VALLINA, M.; GARCÍA-RISCO, M.R.; FORNARI, T.; REGLERO, G.; MOLINA, A.R. Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. *The Journal. of Supercritical Fluids* 79:101–108, 2013.
- WANG, M.; WANG, Y. Development of surfactant coacervation in aqueous solution. *This journal is The Royal Society of Chemistry- Soft Matter*, 10: 7909–7919, 2014.
- WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactante as a new solvente for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol. *Talanta*, 25: 585-589, 1978.
- XU, H.; VAVILIN, D.; VERMAAS, W. Chlorophyll *b* can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 24: 14168-14173, 2001.
- YAZDI, A. S. Surfactant-based extraction Methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 30: 918-929, 2011.
- ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3144-3152, 2010.
- ZHANG, Y.; SMUTS, J. P.; DODBIBA, E.; RANGARAJAN, R.; LANG, J.C.; ARMSTRON, D.W. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60: 9305-9314, 2012.
- ZHU, F.; ASADA, T.; SATO, A.; KOI, Y.; NISHIWAKI, H.; TAMURA, H. Rosmarinic acid extract for antioxidant, antiallergic and α -glucosidase inhibitory activities, isolated by supramolecular technique and solvent extraction from perilla leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 885–892, 2014
- ZU, G.; ZHANG, R. YANG, L. MA, C.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHAO, C. Ultrasound-Assisted Extraction of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid Using Ionic Liquid Solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 11027-11043, 2012.

Capítulo V

5. CAPÍTULO V- ARTIGO

O capítulo V será apresentado em forma de artigo científico o qual corresponde os resultados referente a pesquisa do mestrado, que está relacionado ao processo integrativo para obtenção de biomoléculas baseada na extração líquido-líquido. O artigo foi organizado de acordo com as normas proposta pela revista, dos quais a informação suporte e as referências bibliográficas foram adicionadas ao final do artigo.

Artigo 1. Integrative process to extract and purify bioactive compounds from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*)

Integrative process to extract and purify bioactive compounds from rosemary leaves (*Rosmarinus officialis*)

Paula G. C. Gomes¹, Amanda F. Veloso¹, Isabella F. N. Maynard¹, Maria N. Marques^{1,2},
Ranyere Lucena de Souza^{1,2}, Matheus M. Pereira¹, Cleide M. F. Soares^{1,2}, Álvaro S.
Lima^{1,2,*}

¹UNIT, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia. 49032-490.
Aracaju-SE, Brasil

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

Autor correspondente: E-mail aslima2001@yahoo.com.br. Telefone: +55 7932182115. Fax:
+55 7932182190.

ABSTRACT.

BACKGROUND: Rosemary leaves has been widely employed in the food and pharmaceutical industry due to the presence of important compounds, as rosmarinic acid. However, during the extraction process other biomolecules such as chlorophyll and phenolic compounds are also extracted and therefore act as contaminants. This work focuses on the development of a sequential and selective protocol for the extraction of chlorophyll using the surfactant and its concentration using aqueous two-phase system based on Triton X-100 and phosphate buffer, followed by extraction of rosmarinic acid using different organic solvents and its purification in aqueous two-phase systems composed of organic solvents and potassium phosphate. **RESULTS:** Firstly, the extraction and purification of chlorophylls were studied. Chlorophylls rich-extract obtained by optimized conditions of aqueous solution of Triton X-100 (5 wt%) and phosphate buffer (50 mM), 50 °C, biomass-solvent weight fraction ratio was evaluated at 1:10 and 60 min, were submitted to temperature to achieve phase separation. Chlorophylls content at surfactant rich-phase was 88.99 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Further, the extraction and purification of rosmarinic acid were investigated. Organic solvents (ethanol, methanol and acetonitrile) were investigated and after extraction, the rosmarinic acid rich-extract were add in ATPS composed by organic solvent + K_3PO_4 . The extraction efficiency of rosmarinic acid to organic solvent-rich phase were 100 %. The remain phenolic compounds migrates to bottom phase in methanol based-ATPS. **CONCLUSIONS:** According to results reported in this work, the extraction and purification of add-value compounds of rosemary leaves using a sequence protocol allowed the extraction and purification of chlorophylls and rosmarinic acid and could be an alternative method to obtain several value chemicals coumpounds from other waste biomass.

Key-words: aqueous micellar two-phase system; aqueous two-phase system, rosmarinic acid; chlorophylls, purification; concentration.

INTRODUCTION

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) is a medicinal plant belonging to *Laminaceae* family and native from Mediterranean, but widely found in regions with warm temperate climate.¹ The plant appears as an evergreen looking small woody, containing linear, narrow, opposing, needle-shaped leaves (1.0 – 2.5 cm long and 4 cm width) and white, pink, purple or blue flowers.^{2,3}

This herbal plant has a traditional use in medicine based on its antibacterial, spasmolytic, anti-inflammatory, diuretic properties, beside of use in diabetes, cancer and cardiovascular diseases. Moreover, the rosemary is use in food and cosmetic as aroma and in preservation of different products.⁴ Their applications are directly associated with their chemical composition. The essential oil on hydro-distillation is constituted of 22 different components that correspond to 97.41 % of the total oil, whose main components are 1,8-cineole (26.54 %), α -pinene (20.14 %), camphor (12.88 %), camphene (11.38 %) and β -pinene (6.95 %) according to Jiang et al. (2011). In addition, the extract of rosemary present 17 compounds, being the main compounds ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ extract): carnosol (226.39), carnosic acid (151.55), rosmarinic acid (16.00), caffeic acid (0.81), chlorogenic acid (0.16), p-coumaric acid (0.05) and gallic acid (0.02), as reported by Herrero et al.⁵ Rosmarinic acid (RA) is a phenol compound produced through the secondary metabolic of caffeic acid, and is an ester of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid.⁶ The biological activities of RA are antiviral, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant.⁷ The literature reported several extraction methods to obtain RA, such as: maceration and Soxhlet extraction,⁸ ultrasound- and microwave-assisted procedures,⁹ supercritical fluid extraction¹⁰ and pressurized liquid extraction.¹¹ Some solvents such as methanol,¹² ethanol,¹³ acetone and chloroform¹⁴ have been used to extract rosmarinic acid. However, besides the target molecule is also extracted other

biocompounds as chlorophyll and total phenol compounds, which can be seen as contaminants of the process. In this way, this work developed an integrated and selective process for the initial extraction of chlorophyll using surfactant (solid-liquid extraction). Following by the sequence reuses the biomass to perform the solid-liquid extraction of rosmarinic acid using different organic solvents. It is noteworthy that in the process, chlorophyll was concentrated in micellar aqueous two-phase systems based on Triton X-100 and phosphate buffer and rosmarinic acid purified in aqueous two-phase systems based on organic solvents and potassium phosphate.

Aqueous two-phase system (ATPS) has been used in separation, concentration and purification of a broad number of biomolecules, such as proteins/enzymes,¹⁵ alkaloids,¹⁶ antioxidants,¹⁷ anthocyanins,¹⁸ and antibody,¹⁹ among others. ATPs are a liquid-liquid fractionation procedure formed by mixture of a pair of components in aqueous solution above a critical concentration, such as polymers, salts, ionic liquid, carbohydrates, polyols, and organic solvent.²⁰⁻²²

ATPS process presents a serie of advantages, such as: biocompatibility due to high water content in both phases, scalability, low cost, possibility to obtain products with high purity, to implement an integrative process, and recovery of system constituents.^{23,24} All these attractive advantages can be applied to micellar aqueous two-phase systems (AMTPS), making them a potential protocol for the separation, purification and concentration of biomaterials.^{24,25} AMTPS are suitable applied to recovery hydrophobic and amphiphilic biocompounds, because of the nature of the constituent (surfactant) and their properties as solubility.²⁶

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Triton X-100 surfactant (HBL 13.5) was acquired from Dinâmica. The salts sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (98 wt%); tripotassium phosphate (K_3PO_4) (98 wt%), and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (98 wt%) were purchased from Neon. All solvents (methanol, ethanol, acetone and acetonitrile) were acquired from Vetec with purity above 98 wt%. Standards of chlorophyll a (95 wt%), chlorophyll b (99 wt%), and rosmarinic acid (98 wt%) were purchased from Sigma-Aldrich. Rosemary leaves were acquired in the central market from Aracaju-Sergipe, Brazil, transported to the laboratory in thermal boxes. The samples were immediately were washed, dried, and stocked at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ultrapure water was produced in the laboratory through distillation with further treatment with Milli-Q Plus 185 water purification equipment.

Phase diagrams. A binodal curve was used to describe the aqueous micellar two-phase system (AMTPS) based on Triton X-100 and phosphate buffer. The binodal curve was measured by cloud-point method and represents the borderline between the mono- and biphasic area.²⁷ Briefly, 3 mL sample constituted of Triton X-100 aqueous solution (4 – 26 wt%, 50 – 250 mM) and phosphate buffer (pH 6 – 8 and 50 mM) were homogenized on a stirring plate (GO-Stirrer-MS-H-S) for 1 h, at 50 rpm, in a refrigerated ultra thermostat bath (Sppencer scie tific) at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min, increasing by $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ constantly. It was visually identified the temperature, in which the mixture with known composition becomes turbid (T_{cloud}). The binodal curve are built by plotting the T_{cloud} versus the Triton X-100 concentration.

Chlorophylls extraction. The frozen rosemary leaves were ground in a knife mill (Marconi) and sifted in sieves of 45 mesh (0.354 mm). Every procedure was performed

out of the light. The solid-liquid extraction was gravimetrically prepared in a glass tube (15 mL) and carried out in triplicate using an orbital shaker (Marconi- MA-095), at 200 rpm, changing the time (0 – 120 minutes) surfactant concentration (0 – 25 wt%) in phosphate buffer (pH 8 and 50 mM), temperature below the T_{cloud} (25 – 50 °C) and solid-liquid ratio (1:10 – 1:100). Additionally, it was studied the effect of different of solvents in aqueous solution (80 wt%) such as methanol, ethanol, acetone, and acetonitrile in the chlorophylls extraction and compare with the surfactant aqueous solution. After the extraction, the samples were centrifuged (Centribio), at 2000 rpm, at 25 °C for 10 min to separate the biomass.

Biomass-free extracts were used to quantify the chlorophyll concentration by UV-Vis spectroscopy, using a microplate reader (Epoch 2, BioTeck) in different wavelengths (646, 663 and 750 nm) according to Porra et al.²⁸. The concentration of chlorophyll *a*, *b* and total were measured using the equations (1) to (3)

$$[Chl]_a = 13.71 \times (A_{663} - A_{750}) - 2.85 \times (A_{646} - A_{750}) \quad (01)$$

$$[Chl]_b = 22.39 \times (A_{646} - A_{750}) - 5.42 \times (A_{663} - A_{750}) \quad (02)$$

$$[Chl]_T = 19.54 \times (A_{646} - A_{750}) + 8.29 \times (A_{663} - A_{750}) \quad (03)$$

Chlorophyll Partitioning. The temperature of biomass-free extracts was increased above T_{cloud} ($T \cong 65$ °C) for 1 h to separate the phases and to establish the partition equilibrium. The phases were carefully separated using a pipette for the top phase and a syringe with a long needle for the bottom phase. The volumes were measured in graduated test tubes and were weighed (Mettler Toledo AL-204).

The partition coefficient (*K*) was determined by the ratio of biomolecule concentration [*C*] in the aqueous (aq) and micellar (mic) phase, as indicated in equation 04.

$$K = \frac{[C]_{aq}}{[C]_{mic}} \quad (04)$$

Rosmarinic Acid Extraction. The solid-liquid extraction of rosmarinic acid was performed using the biomass (1 g) after chlorophyll extraction, using different organic solvents, such as: methanol, ethanol, and acetonitrile (85 wt%) in a solid-liquid ratio (1:10) under constant stirring using an orbital shaker (Marconi- MA-095), at 200 rpm, 50 °C for 1 h. After extraction, the samples were centrifuged (Centribio) at 2000 rpm.²⁹

The concentration of rosmarinic acid was measured by high pressure liquid chromatography – HPLC (Prominence, Shimadzu), using a column C-18 (Phenomenex), diode detector in a wavelength 254 nm. Initially, the extracts were (A) and 0.5 wt% formic acid in acetonitrile aqueous solution (2.7 wt %). The column temperature was maintained at 30 °C, the flow rate was 0.5 mL.min⁻¹ and the injection volume 20 µL.³⁰ In these conditions, the chromatographic peaks of rosmarinic acid were confirmed by comparing their retention time with standard reference. From these procedures, the calibration curve was built to quantify the concentration.

Purification of Rosmarinic Acid. The purification processes as performed using an aqueous two-phase system (ATPS) based on organic solvents (methanol, ethanol and acetonitrile) + phosphate potassium (K₃PO₄) + water at 25 °C and 0.1 MPa, as described by Reis et al.³¹ and Santos³².

ATPSs were prepared in glass tubes (3 mL) by weighting the appropriate amounts of constituents in two mixture point. System A: organic solvent (40 wt%) + K₃PO₄ (30 wt%) + water (30 wt%), and system B: organic solvent (50 wt%) + K₃PO₄ (20 wt%) + water (30 wt%). Each system have the same a total mass of 2 g. The mixtures were then gently stirred using solution shaker (Phoenix Luferco) and centrifuged (Centribio) at 2000 rpm for 10 minutes at 25 °C. The tubes were placed at 25 °C and 0.1 MPa, using a thermostatic

bath (Marconi MA-095), for circa 4 h, assuring that the thermodynamic equilibrium is reached. The vials were closed during this period to prevent organic solvent evaporation. The phases were carefully separated, weighted and the volume determined, as previously described in this paper.

Beside the rosmarinic acid (target molecule) concentration, the total phenolic compounds (identified as contaminant) concentration was also measured in top and bottom phases. The total phenolic compounds were determined through the Folin-Ciocalteu method, using gallic acid as a standard.³³ Briefly, 0.5 mL of each phase was placed in a glass tube and added 4 mL of ultrapure water and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent. After 3 min, it was added 0.5 mL of sodium carbonate solution (1 g Na₂CO₃ in 3.5 mL of water). And the solution was incubated, at 37 °C for 30 min. The absorbance was measured in spectrophotometer at 640 nm. The blank was formed by replacing the phases sample with ultrapure water. The results are expressed in gallic acid equivalents (GAE g. 100 g⁻¹). The partition coefficient of rosmarinic acid and total phenolic compounds is the ratio between the concentration in top and bottom phase.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction and Purification of chlorophylls from rosemary leaves. Aiming to extract all add-value compounds from rosemary leaves, the first step was the extraction and purification of chlorophylls using aqueous solutions of surfactant (Triton X-100) and phosphate buffer (50 mM) (Figure 1). In order to promote a purification step in sequence using AMTPS, phase diagrams of Triton X-100 and phosphate buffer were developed (Figure 1- Support Information). The knowledge of phase separation behavior of these compounds in aqueous solutions allowed the selection of extraction conditions.

The monophasic region for all phase diagrams developed are under 60 °C. Based on this, the extraction of chlorophylls from rosemary leaves were started using a aqueous solution of Triton X-100 (5 wt%) and phosphate buffer (50 mM), at 40 °C and biomass-solvent weight fraction ratio of 1:100 ($R = 0.01$). In this first step the maximum extraction time were 120min. Samples were collected each 15 min to quantify the amount of chlorophylls extracted. The chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and *total* chlorophyll total were quantified individually. The results displayed in Figure 1 (a) shows the effect of time on extraction of chlorophylls. The amount of chlorophyll were higher in all extractions times, compared to chlorophyll *b*. Chlorophyll total extraction increase until 60 min. (up to $6.57 \pm 0.14 \mu\text{g.g}^{-1}$). Then, the improvement of chlorophyll extracted is negligible. Aiming to extract chlorophyll from green beans (*Phaseolus vulgaris L.*) using N,N-dimethylformamide as solvent, Cubas and co-workers³⁴ developed an experimental design using response surface methodology. According to the results achieved optimum values at 90 min. of extraction. Beside the non-application of volatile organic solvents, the results here presented provides more environmental-friendly process, reducing the time spend on extraction procedure.

Since the extraction of chlorophylls were higher at 60 min., the further experiments were carried out with this temperature. Propose to reduce the amount of surfactant applied for chlorophylls extraction, several aqueous solution of Triton X-100, from 0 to 25 wt%, were investigated. The effect of surfactant concentration were studied in extractions at 40 °C, biomass-solvent weight fraction ratio of 1:100 ($R = 0.01$) and 60 min. The results of surfactant concentration on extraction of chlorophylls are depicted in Figure 1(b). The lowest extraction yield is noted in pure water, followed by highest amount of surfactant (Triton X-100 at 15 and 25 wt%). Highest extraction yields were achieved using 5 wt% of Triton X-100 ($6.57 \pm 0.01 \mu\text{g.g}^{-1}$). Chlorophylls present low solubility in water (log

$k_{ow} = 16.87$), which lead to lower extraction ability in pure water. On the other hand, surfactant rich-environment promote lowest mass transfer from biomass to solvent that lead to decrease in extraction yields at high surfactant concentrations.

Furthermore, the temperature effect on chlorophylls extraction was evaluated using operation conditions of: 5 wt% of Triton X-100 in aqueous solution, biomass-solvent weight fraction ratio of 1:100 ($R = 0.01$) and 60 min. The temperature range studied was from 25 to 50 °C. The results of temperature effect on chlorophylls extraction is shown in Figure 1(c). Temperature improve the extraction ability of chlorophylls. The extraction efficiency of chlorophylls is lower at room-temperature (25 °C), and increasing the temperature until reach 50 °C. The extractions yields were higher ($8.35 \pm 0.10 \mu\text{g.g}^{-1}$). According to previous reports, a surfactant-based extraction of chlorophylls from spinach leaves was obtained at 41°C (Optimum conditions).³⁵ Above this temperature the authors reported that no increase on chlorophylls extractions yields, was observed.

In order to study the effectiveness of surfactant aqueous solution (aqueous solution of Triton X-100 (5 wt%) and phosphate buffer (50 mM)) in the chlorophylls extraction, several traditional organic solvents, namely methanol, ethanol, acetone and acetonitrile at 80 wt% in aqueous solutions were applied for comparison (Figura 1 (d)). The solvent effect were studied in extractions at 50 °C, biomass-solvent weight fraction ratio of 1:100 ($R = 0.01$) and 60 min. The rank of extraction increase, as following: methanol < ethanol < acetonitrile < surfactant < acetone. Beside the extraction of acetone in aqueous solution, was the highest it was observed that values achieved ($9.33 \pm 0.26 \mu\text{g.g}^{-1}$), the extraction with surfactant aqueous solution appears to be more promising. Since Triton X-100 is non-volatile compound, the extractions of chlorophylls using surfactant in aqueous solution represent an environmental-friendly alternative to traditional organic solvents.

Finally, the biomass-solvent weight fraction ratio was studied under conditions previous optimized (aqueous solution of Triton X-100 (5 wt%) and phosphate buffer (50 mM), 50 °C and 60 min. (Figura 1(e)). The effect of biomass-solvent weight fraction ratio was evaluated at 1:10, 1:25, 1:50 and 1:100. According to obtained results, increase the amount of rosemary (1:10), improve the extraction of chlorophylls up to $34.39 \pm 0.52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Dumbravă and co-workers reported the extraction of add-value compounds from rosemary leaves using pure organic solvents (acetone and ethanol).³⁶ According to their results, biomass-solvent weight fraction ratio of 1:10 allow the highest extraction yields. After shown the ability of aqueous solution of Triton X-100 to extract chlorophylls from rosemary leaves, the next step should be the purification of chlorophylls. Since, the surfactant display ability to promote phase separation in aqueous solution associated to micelles coacervation, increase temperature of extract lead to chlorophylls partitioning. The chlorophylls rich-extract obtained by optimized conditions of aqueous solution of Triton X-100 (5 wt%) and phosphate buffer (50 mM), 50 °C, biomass-solvent weight fraction ratio was evaluated at 1:10 and 60 min, were submitted to temperature to achieve phase separation. The partitioning of chlorophylls are displayed in Figure 2. Total chlorophylls partition was similar to both phases, chlorophylls a migrates preferentially to top phase (water-rich environment), on the other hand chlorophylls b migrates to surfactant rich-phase (bottom phase). The purification of chlorophylls rich-extract from spinach leaves using similar protocol was investigated previously by Leite et al.³⁴ The chlorophylls migrates preferentially to surfactant rich-phase (more hydrophobic). However, no distinction were discussed based on chlorophylls a and b partitioning.

Extraction and Purification of rosmarinic acid from rosemary leaves. After extraction of chlorophylls in the previous section, the remain biomass were submitted to

further extraction using organic solvents aiming to extract other add-value compounds, namely rosmarinic acid. Thus, distinct organic solvents (ethanol, methanol and acetonitrile) were investigated to identify the most promising media for rosmarinic acid extraction. The results of solvent effect on rosmarinic acid extraction are depicted in Figure 3. According to results obtained, the solvent polarity is the driven force to this extraction. The solvent that obtained the highest extraction yields was methanol (7.04 mg.L⁻¹), followed by acetonitrile (6.02 mg.L⁻¹) and ethanol (3.81 mg.L⁻¹). In reported work the extraction of antioxidants (including rosmarinic acid) from rosemary using ethanol and water as solvents was investigated.³⁷ Ethanol promote the highest extraction yields, possibly by the solvent polarity in comparison to water. Finally, the purification of rosmarinic acid were study using ATPS. The biomolecule partition was carried out using ATPS composed of: organic solvent (40 wt%) + K₃PO₄ (30 wt%) + water (30 wt%), and system B: organic solvent (50 wt%) + K₃PO₄ (20 wt%) + water (30 wt%). The mixture composition were selected using a phase diagrams for this compounds already reported.^{31,32} In all ATPS developed a complete migration of rosmarinic acid was achieved for ATPS top phase (Figure 4). The biomolecule migration for organic rich-phase (top-phase) is based on solvent hydrophobicity (acetonitrile (Log P: 1.31), methanol (Log P: -0.72) and ethanol (Log P: -0.19)). However, the migration of phenolic compounds present different behavior. In ATPS tested using organic solvent (40 wt%) + K₃PO₄ (30 wt%) + water (30 wt%), the system constituted by ethanol present migration of phenolic compounds to ATPS top phase, with methanol and acetonitrile the migration occurs to bottom phase. The system composed of organic solvent (50 wt%) + K₃PO₄ (20 wt%) + water (30 wt%), ethanol and methanol-based ATPS display migration of phenolic compounds to bottom phase. On the other hand, phenolic compounds migrates equally to both phases in acetonitrile-based system. Tan et al.³⁸, also used the ATPS composed of

organic solvent and salt for partitioning of chlorogenic acid. Chlorogenic acid migrated preferentially to salt rich-phase in the system formed by ethanol /NaH₂PO₄. Considering the results achieved in this work, the extraction and purification of add-value compounds of rosemary leaves using a sequence protocol allowed the extraction and purification of chlorophylls and rosmarinic acid ($88,99 \pm 0,46 \mu\text{g.g}^{-1}$; $5,23 \pm 0,03 \text{mg.L}^{-1}$). The developed protocol could be applied for the several waste biomass, supporting the emerging biorefinery concept in extraction of several value chemicals compounds.

CONCLUSIONS

The integrative process here developed based on extraction and purification in sequence shows to be an effective technique for the isolation of biomolecules from biomass. The conditional parameters to perform the chlorophyll extraction and purification were identified and fixed in order to obtain the best yield. In this way it was possible to observe the potential of the surfactant to extract hydrophobic molecules, besides it was analyzed that the AMTPS is efficient to purify and to concentrate hydrophobic biomolecules. Also, the rosmarinic acid extraction and purification method was able to extract and separate the target biomolecule from the phenolic compounds. The developed method could be an alternative of traditional methods of extraction and purification of biomolecules from biomass.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe – FAPITEC, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for the scholarship of M. M. Pereira.

REFERENCES

1. Štefan MB, Rodriguez JV, Blazekovic B, Kindl M, Vladimir-Knežević S, Total hydroxycinnamic acids assay: prevalidation and application on Lamiaceae species. *Food Analytical Methods*, 7: 326–336 (2014).
2. Akshay K, Swathi K, Bakshi V, Boggula N, *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Journal of drugs and Therapeutics*, 9: 323-330 (2019).
3. Begum A, Sandhya S, Syed Shaff Ath A, Vinod KR, Swapna R, Banji D, An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus Officinalis* (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Pololonorun Technology Aliment*, 12: 61-73 (2013).
4. Santos RR, Costa DC, Cavaleiro C, Costa HS, Albuquerque TG, Castilho MC, Ramos F, Melo NR, Sanches-Silva A. A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 45: 355-368 (2015).
5. Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E, Green process for the extraction of bioactivites from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tendem mass spectrometry and in-vitro assay. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2512-2520 (2010).
6. Bulgakov VP, Inyushkina YV, and Fedoreyev SA, Rosmarinic acid and its derivates: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32: 203-217 (2012).
7. Petersen M and Simmonds MSJ, Rosmarinic Acid. *Phytochemistry*, 62: 121–125 (2003).
8. Bicchi C, Binello A, and Bubiolo P, Determination of phenolic diterpene antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis*, 11: 236-242 (2000).

9. Bellumori M, Innocent M, Binello A, Boffa L, Mulinacci N, Cravotto G, Selective recovery of rosmarinic and carnosic acid from rosemary leaves under ultrasound-and microwave-assisted extraction procedure. *Comptes Rendus Chimie*, 19: 699-706 (2016).
10. Carvalho JR. RN, Moura LS, Rosa PTV, Meirelles MA, Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition and antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 35: 197-204 (2005).
11. Herrero M, Arráez-Román D, Segura A, Kenndler E, Gius B, Raggi MA; Ibáñez E, Cifuentes A, Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in Rosemary extracts. *Journal of Chromatography A*, 1084: 54-62 (2005).
12. Erkan N, Aytanci G, and Eyranci E, Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76-82 (2008).
13. Zibetti AW, Aydi A, Livia MA, Bolzan A, Barth D, Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: Economic evaluation and scale-up. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83: 133-145 (2013).
14. Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun, A, The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 93: 311-317 (2005).
15. Souza RL, Lima RA, Coutinho JAP, Soares CMF, Lima AS, Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Separation and Purification Technology*, 155: 118-126 (2015).
16. Placido NSO, Carlos ALS, Galvão JU, Souza RL, Soares CMF, Mattedi S, Fricks AT, Lima AS, Protic ionic liquids as a constituent of biphasic systems based on

acetonitrile: Phase diagram and alkaloid partitioning. *Separation and Purification Technology*, 200: 318-326 (2018).

17. Almeida MR, Passos H, Pereira MM, Lima AS, Coutinho JAP, Freire MG, Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 128: 1-10, (2014).

18. Lima AS, Soares CMF, Paltram R, Halbwirth H, Bica K, Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 451: 68-78 (2017).

19. Muendges J, Stark I, Mohammad S, Górak A, Zheiner T, Single stage aqueous two-phase extraction for monoclonal antibody purification from cell supernant. *Fluid Phase Equilibria*, 385: 227-236 (2015).

20. Iqbal M, Tao Y, Xie S, Zhu Y, Chen D, Wang X, Huang L, Peng D, Sattar A, Shabbir MAB, Hussain HI, Ahmed S, Yuan Z, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its application. *Biological Procedures Online*, 18: 1-18 (2016).

21. Cardoso GB, Sousa IN, Pereira MM, Freire MG, Soares CMF, Lima AS, Aqueous two-phase systems formed by biocompatible and biodegradable polysaccharides and acetonitrile. *Separation and Purification Technology*, 136: 74-80 (2014).

22. Cardoso GB, Mourão T, Pereira FM, Fricks AT, Freire MG, Soares CMF, Lima AS, Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. *Separation and Purification Technology*, 104: 106-113 (2013).

23. Soares RG, Azevedo AM, Van-Alstine JM, Aires-Barros MR, Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*, 10: 1158-1169 (2015).

24. González-Valdez J, Mayolo-Deloisa K, Rito-Palomares M, Novel aspects and future trends in the use of aqueous two-phase systems as a bioengineering tool. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93:1836-1844 (2018).
25. Liu CL, Nikas YJ, and Blankschtein D, Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar system. *Biotechnology and Bioengineering*, 52: 185-192 (1996).
26. Chávez-Castilla LR and Aguilar O, An integrated process for the in situ recovery of prodigiosin using micellar ATPS from a culture of *Serratia marcescens*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91: 2896-293 (2016).
27. Watanabe H and Tanaka H, A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta*, 25: 585-589 (1978).
28. Porra RJ, Thompson WA, and Kriedman PE, Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975: 384-394 (1989).
29. Liu T, Sui X, Shang R, Yang L, Zu Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang Z, Application of ionic liquid based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8480-8489 (2011).
30. Canelas V, and Costa CT, Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Extracts of *Melissa officinalis* and Spectrophotometric Measurement of their antioxidant activities. *Journal of chemical education*, 84: 1502-1504 (2007).
31. Reis IAO, Santos SB, Santos LA, Oliveira N, Freire MG, Pereira JFB, Ventura SPM, Coutinho JAP, Soares CMF, Lima AS, Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*, 135: 2453-2461 (2012).

32. Santos PL, Extração de capsaicina por métodos convencionais e métodos não convencionais e purificação utilizando sistema aquoso bifásico. Tese de doutorado, PEP/UNIT, Aracaju, SE, Brasil, (2014).
33. Swain T and Hillis WE, The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1- the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 63-68 (1959).
34. Cubas C, Lobo MG, and González M, Optimization of the extraction of chlorophylls in green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by *N,N*-methylformamide using response surface methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 125- 133 (2008).
35. Leite AC, Ferreira AM, Morais E, Khan I, Freire MG, Coutinho JAP, Cloud point extraction of chlorophylls from spinach leaves using aqueous solutions of non-ionic surfactants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6, 590-599 (2018).
36. Dumbravă DG, Moldovan C, Raba DN, Popa MV, Vitamin C, chlorophylls, carotenoids and xanthophylls content in some basil (*Ocimum basilicum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves extracts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 18: 253-258 (2012).
37. Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109: 98–103 (2012).
38. Tan Z, Wang C, Yi Y, Wang H, Li M, Zhou W, Li F, Extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud) leaf using an ethanol/salt aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 132, 396–400 (2014).

FIGURES

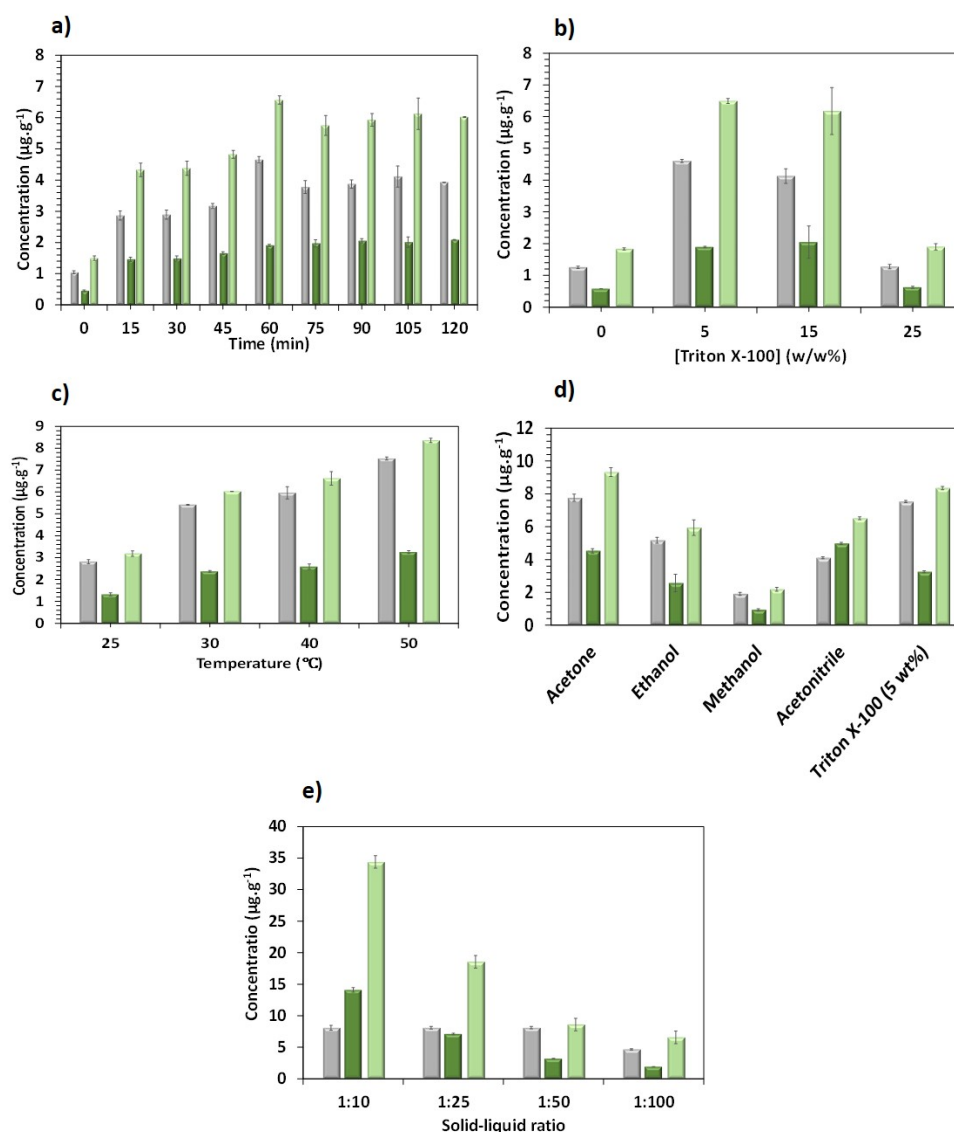


Figure 1. Analyses of the concentration of chlorophyll a (■), chlorophyll b (■) and total chlorophyll total (■) for rosemary leaves. **(a)** Extraction kinetics performed at a temperature of 40 ° C and a concentration of 5% Triton X-100 and a solid-liquid ratio of 1: 100. **(b)** Variation of the surfactant concentration in the extraction yield at a temperature of 40 ° C, time of 60 minutes and a solid-liquid ratio of 1:100. **(c)** Temperature variation in extraction yield at a concentration of 5% Triton-100, time of 60 minutes and a solid-liquid ratio of 1:100. **(d)** Comparative in extraction yield at a concentration of 5% Triton-100, time of 60 minutes and a solid-liquid ratio of 1: 100 and a solution of organic solvent and water (85:15). **(e)** Influence of the solid-liquid ratio on an extraction performed at 50 °C, concentration of 5% Triton X-100 and time of 60 minutes.

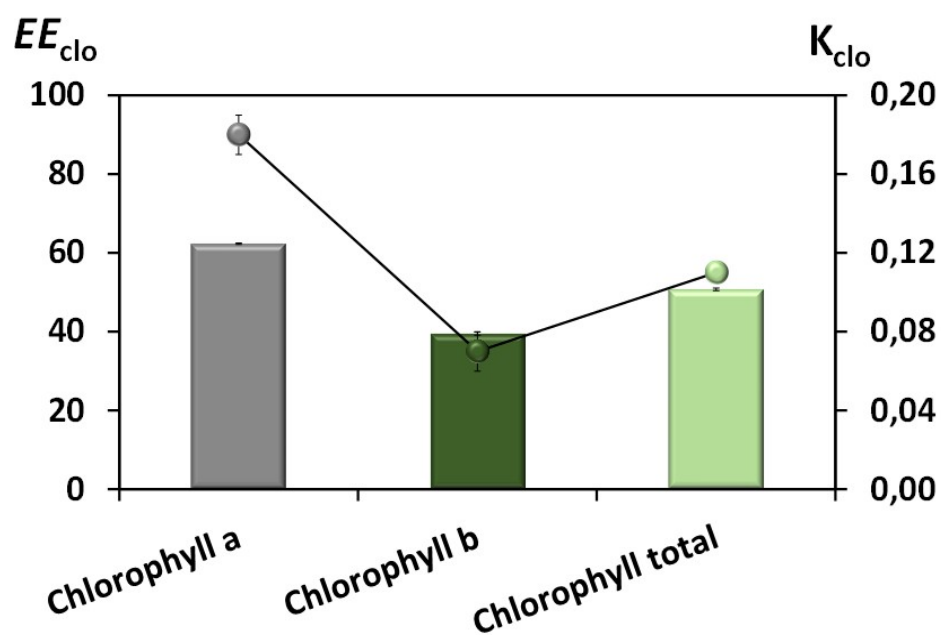


Figure 2. Concentration of chlorophyll a (■), chlorophyll b (■) and total chlorophyll total (■) in the top and bottom phases of the aqueous micellar biphasic system formed by Triton X-100 (5% wt) and phosphate buffer (50 mM) and partition coefficient of chlorophyll a (●), chlorophyll b (●) and total chlorophyll total (●).

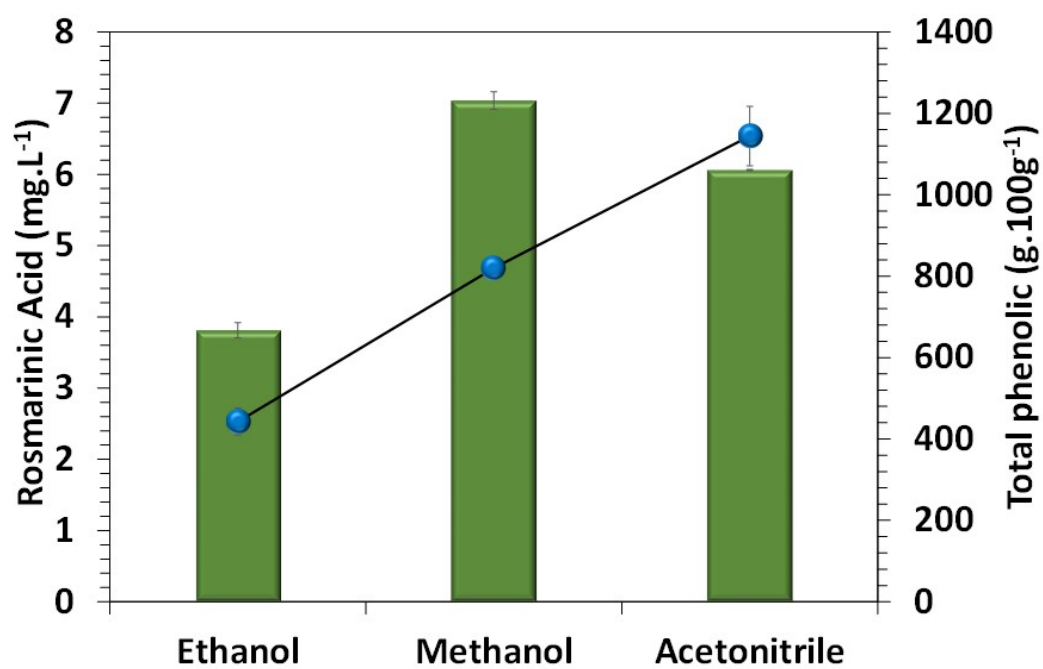


Figure 3. Extraction rosmarinic acid (■) and total phenol compounds (●).

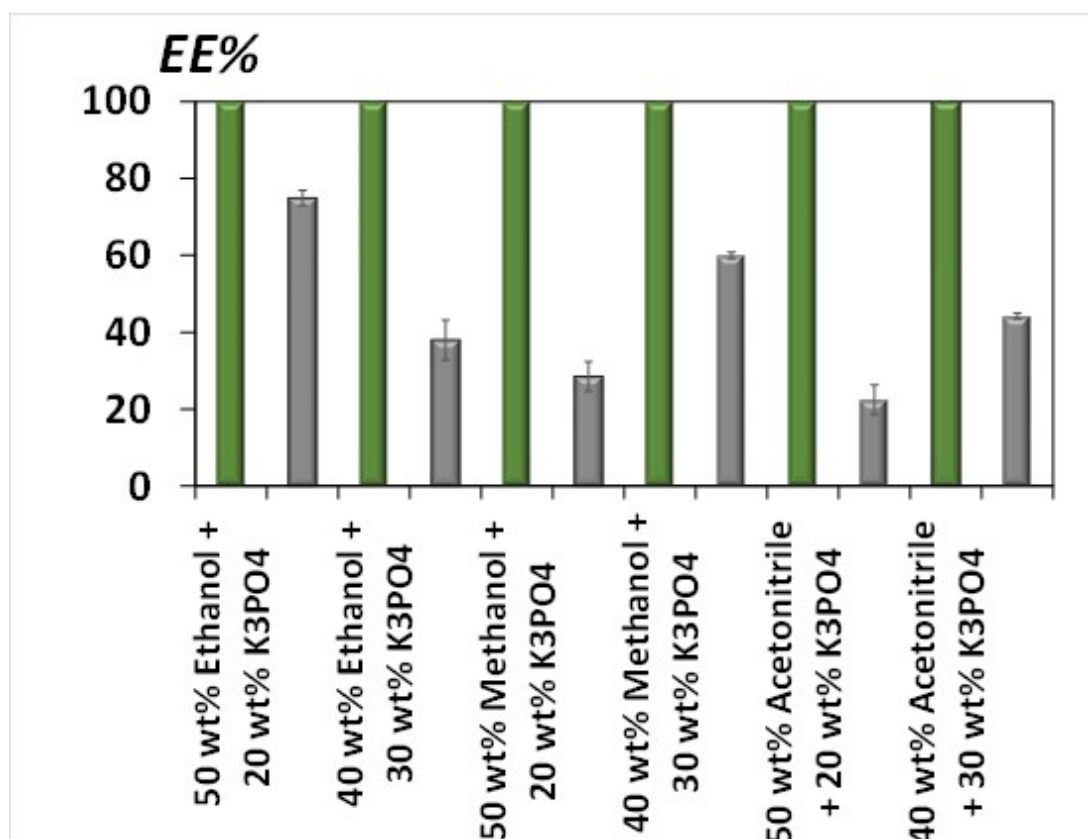


Figure 4. Extraction rosmarinic acid (■) and total phenol compounds (■) of the aqueous two-phase system formed by solvents and salt.

SUPPORT INFORMATION

Integrative process to extract and purify bioactive compounds from rosemary leaves (*Rosmarinus officialis*)

Paula G. C. Gomes¹, Amanda F. Veloso¹, Isabella F. N. Maynard¹, Maria N. Marques^{1,2},
Ranyere Lucena de Souza^{1,2}, Matheus M. Pereira¹, Cleide M. F. Soares^{1,2}, Álvaro S.
Lima^{1,2,*}

¹UNIT, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia. 49032-490.
Aracaju-SE, Brasil

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

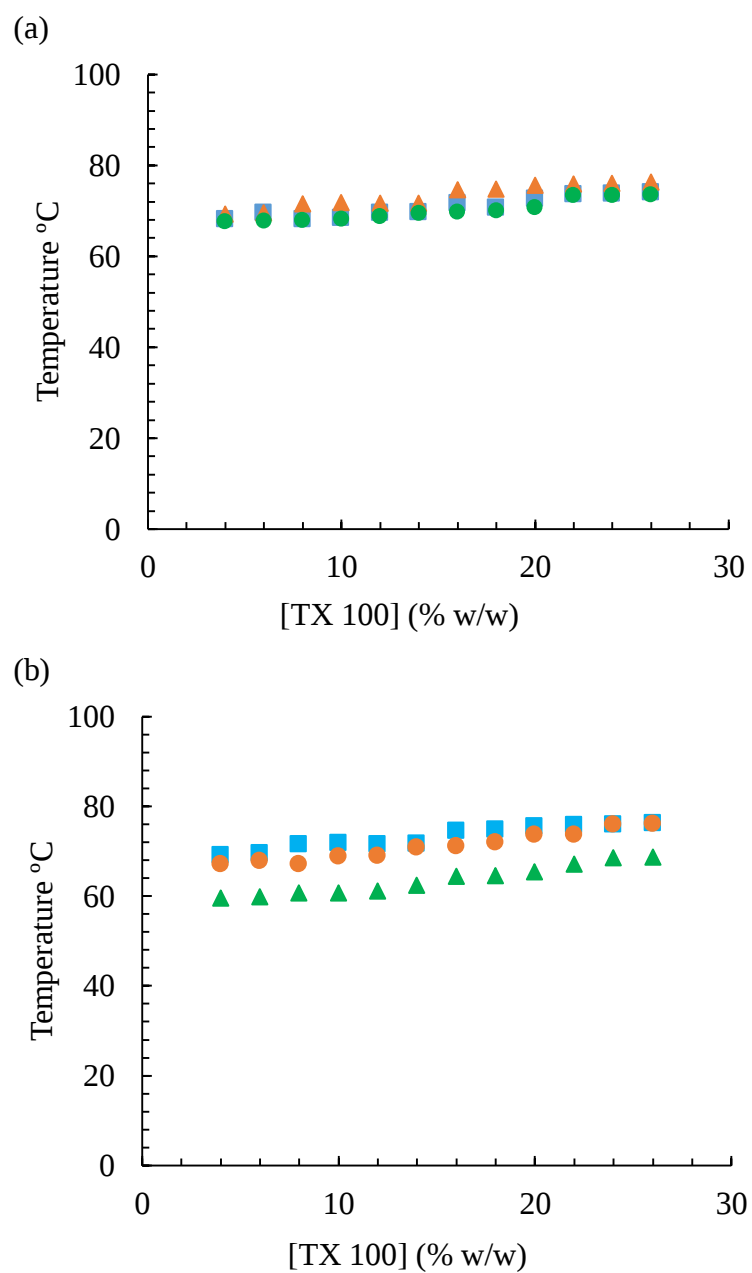


Figura S.1. Effect of molarity of phosphate buffer (▲ - 50 mM, ■ - 100 mM and ● - 250 mM) (a) and pH value (■ - 6, ● - 7 and ▲ - 8) (b) in phase diagram of aqueous micellar two-phase system composed of Triton X-100 e phosphate buffer.