

EXTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS COM LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADJUVANTE

R.L. de SOUZA¹, S.P. VENTURA², C.M.F. SOARES^{1,3}, J.A.P. COUTINHO² e A.S. LIMA^{1,3}

¹ Universidade Tiradentes, Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP, Aracaju, Brasil

² Universidade de Aveiro, Departamento de Química, CICECO, Aveiro, Portugal

E-mail para contato: alvaro_lima@unit.br

RESUMO – Sistemas aquosos bifásicos (SAB) representam uma excelente técnica para extração/purificação de biocompostos. Os SABs são normalmente formados por polímeros, sais, ou líquidos iônicos (LIs), porém o preço ainda relativamente alto dos LIs e a baixa polaridade dos polímeros limitam sua. Como alternativa, tem-se sugerido a aplicação de LI ($\cong 5\%$, m/m) para controlar a partição de biomoléculas. Desta forma, o objetivo do trabalho é utilizar o LI como adjuvante na extração de antioxidantes (propil galato e eugenol) em SAB. Foram estudados LIs da família dos imidazólios, conjugados com o ânion cloreto [$C_n\text{mim}$]Cl ($n = 2$ a 8). Os resultados mostram que as biomoléculas migram para a fase mais hidrofóbica (rica em PEG + LI, $K > 1$) e PEGs de menor massa molecular ($M = 1500$). A melhor eficiência de extração (EE) do eugenol foi de 99%, em sistemas contendo [$C_6\text{mim}$]Cl. Para o propil galato, a EE é completa independente da presença ou não de LI ($EE = 100\%$), exceto quando aplicado o [$C_8\text{mim}$]Cl.

1. INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são compostos fenólicos amplamente utilizados em suplementos alimentares e na área da saúde, devido às suas propriedades de remoção de radicais livres de uma molécula ou organela (Zuo *et al.*, 2002). Antioxidantes fenólicos sintéticos como o propil galato, ou de fontes naturais como o eugenol podem interromper a propagação de reações em cadeia de auto-oxidação (antioxidantes de quebra de cadeia), inibir a formação ou interromper a propagação do radical livre (Brewer 2011).

De modo a desenvolver novos métodos para a extração e concentração de antioxidantes, sistemas aquosos bifásicos (SABs), uma técnica de extração líquido-líquido foi pensada como alternativa para a clássica extração/purificação de compostos e moléculas que incluem os aminoácidos, princípios ativos de medicamentos, compostos fenólicos, enzimas e proteínas que estão presentes em inúmeros processos tecnológicos (Rito-Palomares *et al.*, 2004; Asenjo e Andrews 2012). Os SABs caracterizam-se por remover vários contaminantes de modo simples e econômico, tendo como principais vantagens a sua seletividade mais elevada, a capacidade de adaptação para o processamento da amostra em contínuo e muitas vezes, a manutenção da atividade biológica do composto extraído (Souza *et al.*, 2010).

Geralmente os SABs são compostos por polímeros, sais, carboidratos ou, mais recentemente, por líquidos iônicos (LIs) (Gutowski *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2010, Cardoso *et al.*,

2013). Para todos os casos, duas fases líquidas são formadas e diversos solutos podem ser distribuídas em cada uma das duas fases aquosas (Graber *et al.*, 2000). São inúmeras as vantagens destes sistemas de extração, no entanto a natureza pouco polar do polímero e o preço relativamente alto dos LIs apresenta-se como um fator limitante no que diz respeito à aplicabilidade desta técnica. Recentemente, SABs utilizando LIs como adjuvantes (usando apenas 5%, m/m de LI), permitiram um controle mais eficaz dos coeficientes de partição do L-triptofano como biomolécula modelo em sistemas formados por polietileno glicol (PEG) e Na₂SO₄ (Pereira *et al.*, 2010). Da mesma forma, Almeida *et al.* (2014) evidenciam a melhoria na eficiência de extração de compostos fenólicos, como o ácido gálico, ácido vanílico e ácido sirínico nestes mesmos sistemas, porém com PEGs com baixa massa molecular.

O objetivo deste trabalho relaciona a capacidade de SAB à base de PEG e tampão fosfato de potássio ([K₂HPO₄/KH₂PO₄], pH 7), utilizando LIs como adjuvantes (5% m/m) serem capazes de particionar dois antioxidantes, o propil galato e o eugenol. Neste estudo foram avaliados PEG de massa molecular diferentes (M = 1500 e 8000) e LIs da família dos imidazólios, conjugados com o ânion cloreto [C_nmim]Cl e com diferentes tamanhos de cadeia alquílica, no qual n onde n = 2 a 8.

2. DADOS EXPERIMENTAIS

Os sistemas para extração dos antioxidantes foram formados a partir de 15% (m/m) de PEG (M = 1500 ou 8000), + 15% (m/m) de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄/K₂HPO₄ à pH 7), + 5% (m/m) de cada LI testado (cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio - [C₂mim]Cl, cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio - [C₄mim]Cl, cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio - [C₆mim]Cl e cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio - [C₈mim]Cl); o propil galato (≥98%, Sigma Aldrich) e o eugenol (99%, Sigma Aldrich) foram adicionados em cada sistema na concentração de ≈ 300 mg.L⁻¹ para um sistema de 5 g totais. As concentrações dos constituintes utilizados para formar duas fases aquosas imiscíveis foram confirmadas pelos diagramas de fases descritos por Souza *et al.* (2014). Os sistemas foram mantidos a 25°C durante 12 horas para atingir o equilíbrio. Ambas as fases foram cuidadosamente separadas e pesadas; o volume de cada fase foi registrado, e os antioxidantes foram quantificados utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu), a 271 nm para o propil galato e 279 nm para o eugenol, por meio de uma curva de calibração previamente determinada para estes compostos.

O coeficiente de partição (K) foi determinado pela razão entre as concentrações de topo e fundo do propil galato ou eugenol (Equação 1); e a eficiência de extração dos antioxidantes (EE, %) foi calculada para cada sistema estudado de acordo com a Equação 2,

$$K = \frac{[Ant]_T}{[Ant]_F} \quad (1)$$

$$EE = \frac{[Ant]_T \times V_T}{[Ant]_i \times V_i} \times 100 \quad (2)$$

onde: V e [Ant] são o volume e a concentração do antioxidante adicionada para preparar os sistemas de extração, os índices i e T representam a fase inicial e a fase de topo, respectivamente.

3. RESULTADOS

1.1. Efeito da massa molecular do PEG

A migração preferencial de solutos/biomoléculas em SAB depende inteiramente das interações específicas e/ou da sua afinidade para uma dada fase (Shang *et al.*, 2004; Salabat *et al.*, 2011). Previamente dois PEGs com massas moleculares distintas ($M = 1500$ e 8000) foram utilizados para avaliar a extração dos antioxidantes em SAB compostos por PEG + K_2HPO_4/KH_2PO_4 , de pH 7.

O propil galato e o eugenol (Figura 1a) particionaram-se preferencialmente para a fase rica em polímero com ($K > 1$). Os coeficientes de partição dos antioxidantes para o sistema PEG 1500 + K_2HPO_4/KH_2PO_4 , são de $104,8 \pm 7,4$ e $40,9 \pm 7,0$, respectivamente para o propil galato e eugenol. Na Figura 1 (b), a *EE* dos antioxidantes para fase mais hidrofóbica (rica em PEG) foi reforçada com PEG de menor massa molecular (PEG 1500), a *EE* do propil galato aumentou de 95 para 100%, e nesta mesma condição, a *EE* do eugenol passou de 80 para 94%. O perfil desta migração preferencial segue um padrão semelhante ao relatado anteriormente com uma clara preferência dos antioxidantes para a fase mais hidrofóbica (Santos *et al.*, 2010), e confirmado por seus coeficientes de partição octanol – água (K_{ow}): propil galato ($K_{ow} = 1,8$) e do eugenol ($K_{ow} = 2,27$). Corroborando estes resultados, Almeida *et al.* (2014) descreve o uso de PEGs menores como os melhores para a partição do ácido gálico (*EE* = 95%), ácido vanílico (*EE* = 96%) e ácido siríngico (*EE* = 96%) utilizando SAB com base em PEG 300 e Na_2SO_4 . Embora as duas biomoléculas sejam de caráter hidrofóbico e migrem para fase rica em PEG, a menor *EE* do eugenol pode estar relacionada ao pH da fase de fundo rica em sal (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH ≈ 7) com sua maior constante de dissociação ($pK_a = 9,94$) comparado ao do propil galato ($pK_a = 8,11$) (Wishart *et al.*, 2013). De fato, espécies carregadas tendem a migrar para a fase rica em sal enquanto que moléculas neutras particionam preferencialmente para a fase mais hidrofóbica e menos carregada.

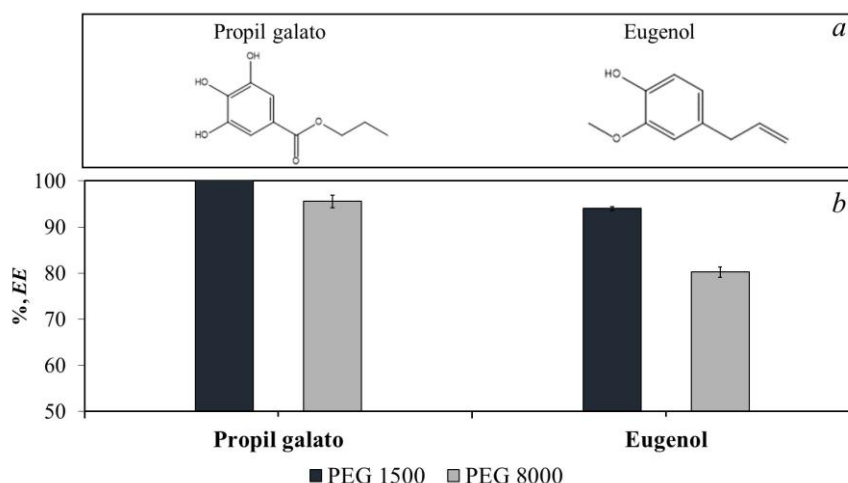


Figura 1 – *i*) Estrutura molecular do propil galato e do eugenol; *ii*) Efeito da massa molecular do PEG na eficiência de extração (*EE*) do propil galato e do eugenol em SAB compostos por PEG + $[K_2HPO_4/KH_2PO_4]$ à temperatura de 25°C.

1.1. Efeito do LI

SAB utilizando líquidos iônicos como adjuvante (5 %, m/m) para a extração de compostos antioxidantes, são uma alternativa para melhorar o desempenho da extração dos sistemas estudados. Os LIs com diferentes comprimentos de cadeia alquílica do cátion imidazólio conjugado com ânion cloreto $[C_n\text{mim}]\text{Cl}$ ($n = 2$ a 8) foram adicionados em SAB com base em PEG + $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ e testados para a extração do propil galato e do eugenol.

A *EE* do propil galato utilizando PEG 1500 (Figura 2) foi sempre completa para a fase de topo em todos os sistemas testados, seja ele com ou sem LI, com exceção do sistema aditivado com $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ que por fenômenos associados à formação de micelas possui um desvio da tendência esperado (Passos *et al.*, 2013). Porém, nos sistemas formados com PEG 8000, para os dois antioxidantes (Figuras 2 e 3), é possível observar melhor o efeito na *EE* com o aumento da cadeia alquílica do LI, que segue a seguinte tendência: $[C_2\text{mim}]\text{Cl} < [C_4\text{mim}]\text{Cl} < [C_6\text{mim}]\text{Cl}$, o LI $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ novamente aparece como exceção. Este efeito é mais claramente observado na Figura 3, para a extração do eugenol.

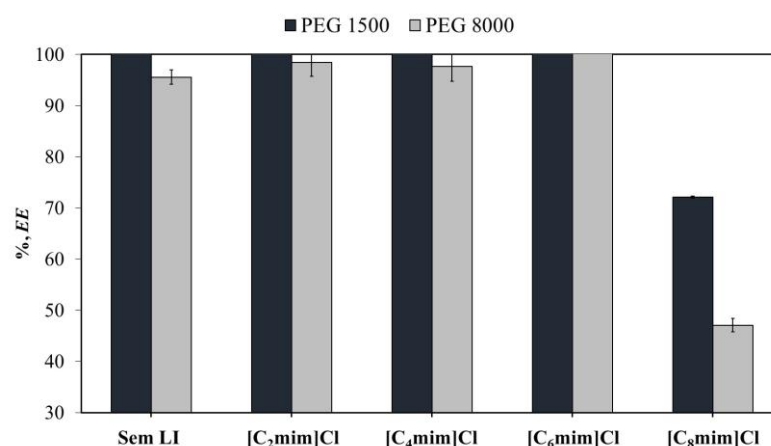


Figura 2 – Eficiência de extração (*EE*) do propil galato em SAB com base em PEG + $[\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4]$ + IL (como adjuvante) à 25 °C.

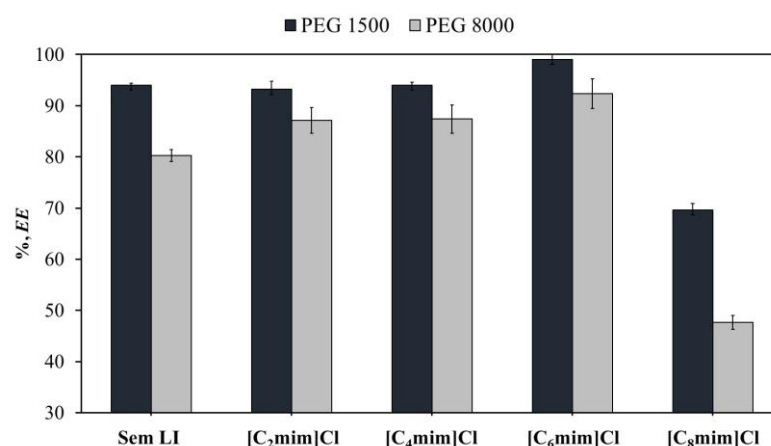


Figura 3 – Eficiência de extração (*EE*) do propil galato em SAB à base de PEG + $[\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4]$ + IL (como adjuvante) à 25 °C.

Pela observação da Figura 3 é possível verificar o efeito do LI na *EE* do eugenol. A *EE* foi melhorada (de 94 ± 0.38 para $99 \pm 3.06\%$) utilizando o $[C_6mim]Cl$ em sistema com PEG 1500. Para compreender este efeito, as interações entre o polímero e os LIs também são relevantes, visto que, não somente há migração entre as fases dos antioxidantes, mas também do LI adicionado ao SAB (Pereira *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014). Os valores da eficiência de extração denotam uma partição preferencial para a fase rica em polímero e quando presente, rica igualmente em LI. Neste sentido, a maior hidrofobicidade desta fase polimérica, dita a partição também quando aditivada com Lis cuja cadeia alquílica vai aumentando o tamanho. Na verdade, essas tendências estão intimamente relacionadas com o comportamento binário de miscibilidade entre PEG-LI e com a respectiva capacidade de formação SAB (Freire *et al.*, 2012). Neste sentido, a migração de LI preferencial para a fase superior do sistema irá naturalmente alterar as propriedades químicas e físicas da fase rica em polímero, permitindo ocorrer interações específicas como entre polímero+sal+água+antioxidante.

4. CONCLUSÃO

O uso de LIs como adjuvantes em SAB convencionais PEG + $[K_2HPO_4/KH_2PO_4]$ para melhorar a extração de produtos de valor agregado, tais como antioxidantes, é aqui proposto. Os resultados sugerem que os antioxidantes (propil galato e eugenol) tem uma maior afinidade para a fase mais hidrofóbica (fase rica em PEG) de peso moleculares menores (PEG 1500) em SAB convencional formado por PEG e sais. No entanto, SAB com base em PEG + sal + LI + água proporcionam eficiências de extração melhoradas, especialmente com o $[C_6mim]Cl$ para a extração do eugenol (*EE* = 99 %). Para o propil galato, a *EE* é completa e em geral, independente do uso de LI em SAB à base de PEG 1500 (*EE* = 100%), sendo o $[C_8mim]Cl$ a exceção a este comportamento, pela sua auto-agregação e consequente formação de agregados.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R.; PASSOS, H.; PEREIRA, M. M.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P.; FREIRE, M. G. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol*, v. 128, p. 1-10, 2014.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *J Chromatogr A*, v. 1238, p. 1-10, 2012.
- BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr Rev Food Sci F*, v.10, p. 221-247, 2011.
- CARDOSO, G.B; MOURÃO, T.; PEREIRA, F. M.; FREIRE, M. G.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanillin. *Sep Purif Technol*, v. 104, p. 106-113, 2013.
- FREIRE, M. G.; PEREIRA, J. F. B.; FRANCISCO, M.; RODRIGUEZ, H.; REBELO, L. P. N.; ROGERS, R. D.; COUTINHO, J. A. P. Insight into the Interactions That Control the Phase Behaviour of New Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol Polymers and Ionic Liquids. *Chem-Eur J*, v. 18, p. 1831-1839, 2012.

GRABER, T. A.; TABOADA, M. E.; CARTON, A.; BOLADO, S. Liquid-liquid equilibrium of the poly(ethylene glycol) plus sodium nitrate plus water system at 298.15 K. *J Chem Eng Data*, v. 45, p. 182-184, 2000.

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

MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *J. Chromatogr. B*, v. 711, p. 285-293, 1998.

PASSOS, H.; TRINDADE, M. P.; VAZ, T. S. M.; DA COSTA, L. P.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol*, v. 108, p. 174-180, 2013.

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

RITO-PALOMARES, M. (2004) Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *J Chromatogr B*, v. 807, p. 3-11, 2004.

SALABAT, A., SADEGHI, R., MOGHADAM, S. T. & JAMEHBOZORG, B. (2011) Partitioning of L-methionine in aqueous two-phase systems containing poly(propylene glycol) and sodium phosphate salts. *J Chem Thermodyn*, v. 43, p. 1525-1529, 2011.

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. *Appl Biochem Biotech*, v.161, p. 288-300, 2010.

SOUZA, R.L.; CAMPOS, V. C.; VENTURA, S. P. M.; SOARES, C. M. F.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S. Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes. *J. Fluid Phases*, In Press (2014).