

AVALIAÇÃO DE SISTEMAS MICELARES DE DUAS FASES AQUOSAS COMPOSTOS POR TRITON X-114 E LÍQUIDOS IÔNICOS COMO ADJUVANTES NA EXTRAÇÃO DE COLORANTES

B.R. ZACCARIM¹, P. A.M. NASCIMENTO¹, M.F.S. TEIXEIRA², J.F.B PEREIRA¹ e V.C. SANTOS-EBINUMA¹

¹ UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Escola de Ciências Farmacêuticas

² UFAM - Universidade Federal do Amazonas, Departamento de Parasitologia
E-mail para contato: bruzaccarim@hotmail.com

RESUMO – Os líquidos iônicos (LIs) têm ganhado grande importância nas áreas da biotecnologia como solventes alternativos aos orgânicos, uma vez que a demanda por tecnologias mais limpas tem aumentado. Dentro deste tema, LIs podem ser adicionados a sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA) para melhorar a extração de biomoléculas por esta técnica. SMDFA apresentam habilidade de manter as conformações e atividades das biomoléculas de interesse enquanto migram de fase sendo de grande interesse para extrair biomoléculas do meio fermentado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a extração de colorantes naturais vermelhos produzidos por cultivo submerso de *T. amestolkiae* utilizando SMDFA composto pelo surfactante não-iônico TX-114 com cloreto de colina ([Ch]Cl) e butanoato de colina ([Ch]But) como adjuvantes. Foram realizados experimentos para determinação das curvas binodais dos LIs e, posteriormente, experimentos de partição com os sistemas já caracterizados. O melhor sistema foi aquele que continha butanoato de colina em sua composição.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de colorantes é constituído pelos colorantes naturais e artificiais, sendo que atualmente há uma ampla tendência da substituição dos artificiais pelos naturais. Estes são obtidos de plantas, insetos (Boo *et al.*, 2012; Deveoglu *et al.*, 2012; Unagul *et al.*, 2005) e microrganismos (Cho *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Méndez *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009), sendo que os últimos são os principais utilizados para a sua produção. Dentro deles, os fungos filamentosos possuem vasta versatilidade metabólica, o que possibilita o emprego dos mesmos em diversos processos industriais, como a produção de ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, alcaloides, antibióticos e colorantes (Babitha *et al.*, 2007; El-Enshasy, 2007; Velmurugan *et al.*, 2010).

Em pesquisas realizadas por Teixeira *et al.* (2012), *T. amestolkiae* mostrou ser potencial produtor de colorantes naturais com alta atividade antimicrobiana e ausência de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*. Em outros estudos, os colorantes

vermelhos produzidos por este microrganismo mostraram estabilidade em condições alcalinas, na presença de sais e polímeros (Santos-Ebinuma *et al.*, 2013a), além de apresentarem atividade antioxidante.

Além da etapa de produção, desenvolver técnicas de extração/purificação mais econômicas, de forma a incrementar os parâmetros de purificação e ao mesmo tempo reduzir os custos operacionais (Pessoa Jr. e Kilikian, 2005) são de interesse. Neste contexto, pode-se citar os SMDFA, os quais são formados por agentes tensoativos, que são moléculas anfifílicas (Cordisco *et al.*, 2015). Os tensoativos em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) formam agregados, conhecidos como micelas (Santos-Ebinuma *et al.*, 2013a), e o aumento da temperatura provoca o fenômeno de separação de fases, no qual uma fase é rica em micelas e a outra pobre em micelas (Hagas *et al.*, 2013) Todo o processo é dependente da concentração e estrutura do agente tensoativo, da presença de aditivos, da força iônica e pH (Liu *et al.*, 1998).

A inserção de LIs nos SMDFA pode incrementar o processo de extração de biomoléculas, pois podem contribuir para a alteração das propriedades físico-químicas de micelas surfactantes (Vicente *et al.*, 2014). Os LIs são sais orgânicos que se encontram em estado líquido, em condições atmosféricas normais de temperatura e pressão, e apresentam características únicas como, estabilidade térmica e química, baixo ponto de fusão, elevada força de solvatação e ampla gama de estruturas químicas (Freire *et al.*, 2015). Diante do exposto, este trabalho visou a extração de colorantes naturais produzidos por *Talaromyces amestolkiae* empregando SMDFA com LIs como adjuvantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O LI butanoato de colina foi sintetizado pelo grupo de pesquisa. O tensoativo não-iônico Triton X-114 e o LI cloreto de colina foram adquiridos da Sigma-AldrichTM. Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.1. Microrganismo e produção dos colorantes naturais

T. amestolkiae (antigamente *P. purpurogenum*) foi cedido pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura foi preservada em água destilada esterilizada e foi reativada em caldo glicosado de acordo com Lacaz *et al.* (2002) em agitador rotativo a 30 °C, durante 7 dias e depois transferidos para tubos inclinados contendo meio CYA (ágar extrato de levedura Czapek), os quais foram incubados a 30°C, por 7 dias, e, posteriormente, conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias.

Para os experimentos de produção, o inóculo foi realizado em placa de Petri contendo meio BDA (ágar batata dextrose) suplementado com 0,5% (m/v) de extrato de levedura por um período de 7 dias a 30°C, o qual foi inoculado (10 discos de micélio de 8 mm de diâmetro) em frascos Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultivo. O cultivo submerso foi conduzido em agitador orbital por 168 horas a 30°C. A composição do meio de cultivo foi de 10 g/L de peptona de carne, 30g/L de glicose e 1 g/L de extrato de carne, com pH inicial de 7. Ao fim da produção, o meio contendo os colorantes naturais foi filtrado em papel de filtro Whatman n°1.

2.2. Construção e caracterização das curvas binodais

Foram construídas as curvas binodais para os sistemas através do método do “ponto de névoa” de acordo com Blankshtein *et al.* (1986). Os estudos foram realizados em sistemas formados por Triton X-114 em diferentes concentrações (1-15,0% m/m) em H₂O e na presença dos LIs nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,5M.

2.3. Sistemas de extração

Os sistemas de extração foram preparados nas mesmas concentrações empregadas anteriormente em tubos de ensaio graduados de 15 mL, pela adição por gravimetria de Triton X-114, meio fermentado, LI e H₂O nas concentrações desejadas. O sistema foi homogeneizado em agitador orbital a 8 rpm por 30 minutos. Em seguida, transferido para banho termorregulado com a temperatura previamente ajustada ao desejado e mantido em repouso por 3 horas. Após o repouso, os sistemas foram centrifugados e amostras das fases superior (*top*) e inferior (*bottom*) foram coletadas cuidadosamente, com o auxílio de seringa e agulha. Cada experimento de partição foi feito em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados. Em ambas as fases foram determinadas a concentração de colorantes naturais a fim de se calcular os parâmetros de extração: coeficiente de partição do colorante (K) – Equação 1, recuperação do colorante nas fase inferior (R_F) – Equação 2 e razão volumétrica (R_V) – Equação 3.

$$K_P = \frac{C_T}{C_F} \quad (1)$$

$$R_F = \frac{100}{1 + R_V K} \quad (2)$$

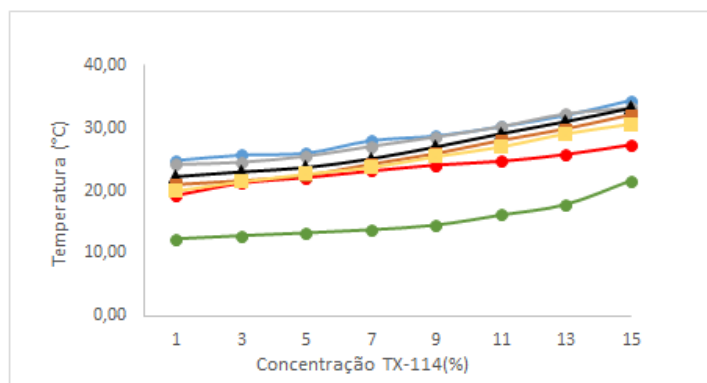
$$R_V = \frac{V_F}{V_T} \quad (3)$$

Em que: C_T e C_F referem-se às concentrações do colorante (UA) na fase de topo (rica em micelas) e fundo (pobre em micelas), respectivamente. R_V representa a razão volumétrica entre o volume da fase de topo (V_T) e o volume da fase de fundo (V_F).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as curvas binodais construídas a partir das temperaturas obtidas no experimento do ponto de névoa.

Figura 1 – Curvas binodais dos SMDFAs formados por Triton X-114 (TX-114) na presença ou ausência de LI (—●— 0,05M; —●— 0,1M; —●— 0,5M para os sistemas com cloreto de colina, —■— 0,05M; —■— 0,1M; —■— 0,5M para os sistemas com butanoato de colina e —▲— ausência de LI)

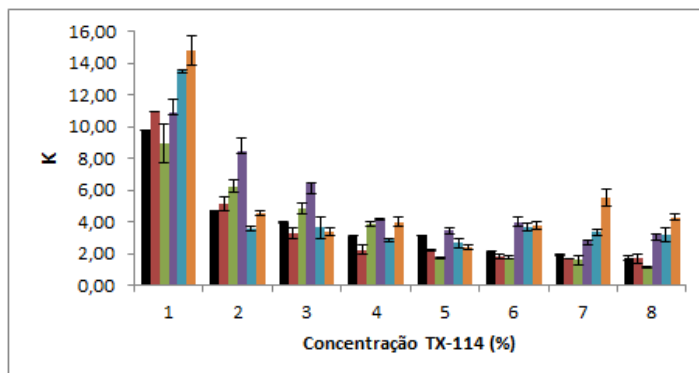


A partir destes resultados foi possível observar que as menores temperaturas foram obtidas com o sistema contendo butanoato de colina na concentração de 0,5M e as maiores foram encontradas nas amostras contendo cloreto de colina nas concentrações de 0,05M e 0,1M, sendo que as últimas foram as únicas curvas acima da encontrada no experimento realizado sem LI. Uma possível explicação para este fenômeno é que o aumento da cadeia carbônica dos compostos os deixam mais hidrofóbicos, requerendo, dessa forma, menor hidratação e, conseqüentemente, menor quantidade de energia necessária para a separação do sistema em duas fases (o que resulta em menores temperaturas de separação).

Além disso, de acordo com a atuação dos íons da Série de Hofmeister, o cloreto pode ser classificado como cosmotrópico, ou seja, aumenta a estruturação das moléculas de água ao redor do íon (Machado, 2010) por possuir maior interação com estas (Lo Nostro *et al.*, 2006). Assim, a maior hidratação acaba requerendo maior energia para a separação de fases do sistema e então maiores temperaturas são encontradas neste sistema.

A Figura 2 apresenta os coeficientes de partição do colorante vermelho para os ensaios contendo LI.

Figura 2 – Coeficientes de partição obtidos para a partição de colorantes naturais vermelhos por SMDFA composto por Triton X-114 (TX-114) na presença de LI. (■ 0,05M; ■ 0,1M; ■ 0,5M para os sistemas com cloreto de colina, ■ 0,05M; ■ 0,1M; ■ 0,5M para os sistemas com butanoato de colina)



Pelo gráfico, foi possível concluir que a partição do colorante foi eficiente e que migrou mais para a fase *bottom* (fase rica em surfactante), uma vez que todos os valores encontrados ficaram acima de 1. Notou-se também que para menores concentrações de Triton X-114 a partição foi mais efetiva. Dentro dos melhores resultados, os ensaios com cloreto de colina mostraram-se mais vantajosos. Ademais, além da separação do colorante, houve também a concentração do mesmo nos ensaios em que o valor do coeficiente de partição obtido foi bem maior que 1.

As Tabelas 1 e 2 apresentam as recuperações do colorante na fase *bottom* com os sistemas utilizado cloreto de colina e butanoato de colina, respectivamente.

Tabela 1 – Eficiência de extração na fase *bottom* para os sistemas com cloreto de colina.

TX-114	[Ch]Cl 0,05M	[Ch]Cl 0,1M	[Ch]Cl 0,5M
1%	42,29	59,99	62,15
3%	85,65	57,57	84,70
5%	82,05	75,77	75,85
7%	82,61	74,06	80,14
9%	84,91	85,23	73,22
11%	79,85	78,64	76,60
13%	82,61	82,42	76,41
15%	88,72	86,57	77,12

Tabela 2 – Eficiência de extração na fase *bottom* para os sistemas com butanoato de colina.

TX-114	[Ch]But 0,05M	[Ch]But 0,1M	[Ch]But 0,5M
1%	85,27	85,92	62,38
3%	98,57	97,29	95,74
5%	98,85	99,43	96,96
7%	99,91	99,75	98,25
9%	99,20	99,90	98,80
11%	98,87	99,56	99,36
13%	99,71	99,71	99,64
15%	99,63	99,68	99,82

A partir da análise dos dados das tabelas, foi possível notar que as maiores eficiências de extração na fase *bottom* foram obtidas nos ensaios que continham butanoato de colina e que os melhores resultados foram similares nas concentrações de 7-15%. Dessa forma, notou-se grande importância da maior cadeia carbônica deste LI quando comparado ao outro utilizado.

4. CONCLUSÃO

A extração de colorantes naturais utilizando líquidos iônicos como adjuvantes nos sistemas micelares de duas fases aquosas mostrou-se eficiente, uma vez que as eficiências de extração encontradas foram superiores a 50% em todos os ensaios. As amostras contendo butanoato de colina mostraram-se mais efetivas, obtendo valores próximos a 100%, sem apresentar diferenças no aumento da concentração do líquido iônico. Este LI também é de interesse, pois, mesmo apresentando coeficientes de partição ligeiramente menores que o cloreto de colina, apresentou menores temperaturas de partição, o que gera uma possível economia para o processo. Dessa forma, concluiu-se que o LI butanoato de colina tem grande potencial para a extração de colorantes naturais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo 2014/01580-3), CNPq e CAPES.

6. REFERÊNCIAS

Babitha, S.; Soccol, C.R.; Pandey, A. Solid-state fermentation for the production of Monascus pigments from jackfruit seed. *Bioresource Technology*, v.98, n.8, p.1554-1560, 2007.

Blankschtein, D.; Thurston, G.M.; Benedek, G.B. *Journal Chemical Physics*, v.85, p.7268-7288, 1986

Boo, H.-O.; Hwang, S.-J.; Bae, C.-S.; Park, S.-H.; Heo, B.-G.; Gorinstein, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, v.40, p.129-135, 2012.

Cho, Y.J.; Park, J.P.; Hwang, H.J.; Kim, S.W.; Choi, J.W.; Yun, J.W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, v.35, n.3, p.195-202, 2002.

Cordisco, E.; Haidar, C.N.; Goñi, R.; Nerli, B.B.; Malpiedi, L.P. *Fluid Phase Equilibria*, v.393, p. 111- 116, 2015.

Deveoglu, O.; Cakmakci, E.; Taskopru, T.; Torgan, E.; Karadag, R. Identification by RP-HPLC-DAD, FTIR, TGA and FESEM-EDAX of natural pigments prepared from *Datisca cannabina* L. *Dyes and Pigments*, v.94, n.3, p.437-442, 2012.

El-Enshasy, H.A. Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.-T., eds. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Amsterdam: Elsevier, 2007. cap.9, p.225-261.

Freire, M.G.; Cláudio, A.F.M.; Araújo, J.M.M.; Coutinho, J.A.P.; Marrucho, I.M.; Lopes, J.N.C.; Rebelo, L.P.N. *Chem. Soc. Rev.*, v.41, p. 4966- 4995, 2012.

Haga, R.B.; Santos-Ebinuma, V.C; Silva, M.S.C.; Pessoa Jr, A.; Rangel-Yagui, C.O. *Separation and Purification Technology*, v.103, p. 273-278, 2013.

Jiang, Y.; Li, H.B.; Chen, F.; Hyde, K.D. Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp. *Journal of Agricultural Technology*, v.1, p.113-126, 2005.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Marins, J.E.C.; Heins-Vacarri, E.M.; Mello, N.K. *Tratado de micologia médica* Lacaz. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p

Liu, C-L.; Kamei, D.T.; King, J.A.; Wang, D.I.C.; Blankschtein, D. *Journal of Chromatography B*, v.711, p.127-138, 1998.

Lo Nostro, P.; Ninham, B.W.; Milani, S.; Lo Nostro, A.; Pesavento, G.; Baglioni, P. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. *Biophysical Chemistry*. V 124, p.208-213, 2006.

Machado D.C.; Estudo da influência de substâncias cosmotrópicas e caotrópicas na interação de moléculas unitárias orgânicas com nanoporos individuais protéicos. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

Méndez, A.; Pérez, C.; Montañéz, J.C.; Martínez, G.; Aguilar, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *Journal of Zhejiang University, Science, B*, v.12, n.12, p.961-968, 2011.

Pessoa Jr., A., Kilikian, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Barueri: Manole, 2005. 444p.

Santos-Ebinuma, V.C.; Lopes, A.M.; Converti, A.; Pessoa Jr, A.; Yagui, C.O.R. *Fluid Phase Equilibria*, v.360, p. 435- 438, 2013.

Teixeira, M.F.S.; Martins, M.S.; Silva, J.C.; Kirsch, L.S.; Fernandes, O.C.C.; Carneiro, A.L.B.; Conti, R.; Durán, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v.6, n.3, p.300-311, 2012.

Unagul, P.; Wongsa, P.; Kittakoop, P.; Intamas, S.; Srikitikulchai, P.; Tanticharoen, M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.32, n.4, p.135-140., 2005.

Velmurugan, P; Hur, H; Balachandar, V.; Kamala-Kanna, S.; Lee, K.; Lee, S.; Chae, J.; Shea, P.J.; OH, B. Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

Vicente, F.A.; Malpiedi, L.P.; Silva, F.A.; Pessoa Jr., A.; Coutinho, J.A.P.; Ventura, S.P.M. *Separation and Purification Technology*, v.135, p. 259- 267, 2014.

Yang, H.; Xiao, C.; Ma, W.; He, G. The production of hypocrellin colorants by submerged cultivation of the medicinal fungus *Shiraia bambusicola*. *Dyes and Pigments*, v.82, n.2, p.142-146, 2009.