

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FÁBIO AURÉLIO ESTEVES TORRES

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DE COLORANTES NATURAIS
PRODUZIDOS POR *Talaromyces amestolkiae***

ARARAQUARA – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FÁBIO AURÉLIO ESTEVES TORRES

**EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DE COLORANTES NATURAIS
PRODUZIDOS POR *Talaromyces amestolkiae***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos
Ebinuma

ARARAQUARA – SP

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

T693e Torres, Fabio Aurélio Esteves.
Extração e identificação química de corantes naturais produzidos por
Talaromyces amestolkiae / Fabio Aurélio Esteves Torres. – Araraquara, 2018.
193 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em
Biotecnologia.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

1. Corantes naturais. 2. Líquido iônico. 3. Micelas. 4. Sistemas aquosos. 5.
Surfactante. I. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

Dedico a todos que apoiaram, auxiliaram e, principalmente, me
aguentaram durante todo o processo!

Isso não seria possível sem vocês!

Agradecimentos

À **VIDA**, por me dar energia para que eu possa ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus pais **JOSÉ FÁBIO** e **RENATA** por serem exemplos de coragem, por todo apoio incondicional e esforço para que meus sonhos fossem alcançados e principalmente à paciência e amizade durante este trajeto!

À minha esposa **JULIANA**, por toda a paciência e companheirismo tanto nas fases boas como nas difíceis! Não sei o que faria sem você! Te Amo!

Aos meus avós **BARTHOLOMEU** e **HELENA**, por sempre estarem presentes e cuidando de mim.

Aos meus amigos de quatro patas **NERO** e **KIARA**, por sempre me receberem com toda a alegria do mundo e me mostrarem o que é amor verdadeiro!

À orientadora Prof^a. Dr^a. **VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA**, por ter me dado a oportunidade de continuar trilhando meu caminho como cientista e por ter acreditado no meu potencial.

A meu co-orientador **ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS**, por ter aberto seu laboratório e ajudado em pontos cruciais do projeto.

Aos amigos de laboratório **MARIANA, FERNANDA, NATHAN, PAULO** e **GABI**, por terem tornado os dias mais alegres e agradáveis!

Ao técnico **CAIO PEREGO**, pelo auxílio quando mais precisei!

Ao técnico **EDUARDO JOSÉ CREVELIN**, pela ajuda com a parte mais complicada do meu projeto!

À **FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS** por ter oportunizado essa conquista!

Agradecimentos

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), pela importante contribuição financeira para a realização deste projeto (2015/04751-6).

Epígrafe

“...eu abraçarei meu desejo
De abraçar meu desejo de sentir o ritmo
...
De me sentir inspirado,
A conhecer o poder
Para testemunhar a beleza, banhar-se na fonte.
...
Balançar na espiral de nossa divindade...
...e ainda ser humano!
Com meus pés no chão
Eu me perco entre os sons
E me abro para recebê-los.
Eu sinto-os se mover através da minha pele
Estou alcançando e atingindo!
...
E seguindo nosso desejo e o vento
Nós poderemos chegar aonde ninguém jamais esteve
Percorreremos a espiral até o fim
E podemos ir aonde ninguém foi!”

Lateralus (Tool)

Resumo

Colorantes sintéticos têm sido cada vez mais substituídos pelos colorantes naturais em diversos produtos industriais, pois os últimos apresentam efeitos desejáveis à saúde e podem possuir atividades biológicas. Neste cenário, o fungo filamentosso *Talaromyces amestolkiae* apresenta-se como uma fonte alternativa de colorantes naturais por não ser micotoxigênico. Assim, técnicas eficientes para a extração e/ou purificação destes biocompostos do meio fermentado são de grande interesse visando sua aplicação industrial. O objetivo deste trabalho foi definir a estrutura química do colorante produzido por *T. amestolkiae* e avaliar Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA) como técnica de extração. Em relação a molécula do colorante, esta foi purificada por técnicas espectrométricas e espectroscópicas e apresentou massa de 542 u, absorção máxima em 544 nm e pertence a classe dos policetídeos. Avaliou-se a estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* e verificou-se que o mesmo é estável na faixa de temperatura de 25 a 65°C, na presença de altas concentrações do surfactante não iônico TX-114 (1-15% m/m) e dos líquidos iônicos da família dos imidazólios (0,1, 0,5 e 1,0M), porém, a molécula foi estável somente em baixas concentrações de LIs da família das colinas (0,1M). Em relação às partições por SMDFA composto por Triton X-114 e LI como surfactante iônico (família dos imidazólios) ou adjuvante (família das colinas), baixas concentrações de LI, independente da família avaliada, aumentaram o coeficiente de partição do colorante vermelho (aproximadamente, 3 vezes para a família dos imidazólios e de 3,5 vezes para a família das colinas). A influência da temperatura na partição do colorante vermelho também foi estudada e verificou-se que sistemas incubados a 45°C apresentaram coeficiente de partição, aproximadamente, 4 vezes superior que aqueles incubados a 25°C. Como conclusão final, novos colorantes fungícos com diferentes estruturas químicas para aplicações em diversos segmentos industriais podem ser obtidos e sistemas micelares de duas fases aquosas apresentam-se como método de extração alternativo eficiente para recuperação destes colorantes do meio fermentado.

Palavras-chave: Colorante naturais. Líquido iônico. Micelas. Sistemas aquosos. Surfactante.

Abstract

Synthetic colorants have been increasingly replaced by natural ones in several industrial products, since the last have lower adverse health effects and may present biological activities. In this scenario, the filamentous fungus *Talaromyces amestolkiae* is an alternative source of natural colorants for being non-mycotoxigenic. Thus, efficient techniques for the extraction and/or purification of these biocompounds from the fermented medium are of great interest aiming their industrial application. The objective of this work was to purify natural colorants from the fermented medium of *T. amestolkiae* by liquid-liquid extraction with organic solvents in order to determine the chemical structure of these compounds and to evaluate aqueous micellar two-phase systems (AMTPS) as an alternative extraction technique. In relation to the colorant molecule, it has a mass of 542 u, maximum absorption at 544 nm and structure similar to N-GABA-PP-V molecule of the polyketide class, with an additional glutamic acid chain. In the literature, there are no previous reports of this molecule. The stability of the red colorant present in the fermented medium of *T. amestolkiae* was evaluated and it was found to be stable in temperature range of 25 to 65 °C, in the presence of high concentration of the non-ionic surfactant TX-114 (1 (0.1, 0.5 and 1.0 M) and the ionic liquids (IL) from imidazolium family (0,1, 0,5 e 1,0 M), however, it is only stable at low concentrations of , IL from the choline family (0,1 M). Regarding the colorant partition by AMTP composed of Triton X-114 and IL as ionic surfactant (imidazolium family) or adjuvant (choline family), low concentrations of IL, independent of the family studied, increased the partition coefficient of the red colorant. The influence of temperature on the red colorant partition was evaluated and it was verified that systems incubated at 45 °C had a partition coefficient, approximately, 4 times higher than those incubated at 25 °C. As final remarks, new microbial colorants with different chemical structure and industrial application can be obtained and AMTPS presented as efficient alternative extraction methods for the recovery of these colorants from the fermented broth.

Keywords: Natural corant. Ionic liquid. Micelles. Aquous systems. Surfactant.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1. (A) Retrato de um bisão do Salon Noir na caverna de Niaux (~10500 AC); (B) Mona Lisa (1503-1506) por Leonardo da Vinci; (C) Graffiti por Bansky (Dezembro de 2009)	36
Figura 2. Estruturas químicas dos mais importantes colorantes para o mercado global. (A) bixina; (B) capsantina; (C) capsorrubina; (D) curcumina; (E) estrutura comum para antocianinas; (F) carmim cochonilha. Estruturas B e C são derivadas do extrato de páprica.....	39
Figura 3. Estruturas base dos colorantes policetídeos (A) antraquinona; (B) 1-hidroxiantraquinona; (C) 2-hidroxiantraquinona; (D) 1,2-naftoquinona; (E) 1,4-naftoquinona; (F) azafilonas	40
Figura 4. Diagrama de fases para um sistema aquoso bifásico composto por polímero e sal (A) e outro para um sistema micelar de duas fases aquosas (B). Demonstração da região onde há formação de duas fases e a relação de volume entre as fases de acordo com a porcentagem de cada componente ..	45
Figura 5. Representação gráfica da estrutura de surfactantes e suas cargas. (A) catiônico, (B) aniônico, (C) zwitteriônico e (D) não-iônico	46
Figura 6. Estrutura química do surfactante não-iônico (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol.....	47
Figura 7. Representação gráfica dos diferentes tipos de micelas. (A) esférica, (B) reversa, (C) cilíndrica, (D) lamelar, (E) bicontínua e (F) vesícula	48
Figura 8. Representação gráfica da formação de micelas mistas com o aumento de temperatura em um sistema composto por dois surfactantes diferentes	49
Figura 9. Cátions (I – amônio; II – Sulfônio; III – Fosfônio; IV – Imidazólio; V – Piridino; VI – Pirrolidínio; VII – Tiazólio; VIII – Oxazólio; IX – Pirazólio) e alguns ânions (cloreto, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, brometo, tiocianato, ácido fluorantimônico, iodeto e tetracloroaluminato) que podem compor diferentes LI	52
Figura 10. Estrutura química base dos LI da família dos imidazólios (I) e das colinas (II).....	54
Figura 11. Esquema de separação de fases de sistemas micelares de duas fases aquosas demonstrando o efeito do aumento de temperatura na separação do sistema em duas fases, sendo uma rica e outra pobre em micelas	55

Lista de Figuras

- Figura 12.** Estruturas químicas dos LI da família dos imidazólios ([C2mim]Cl (A), [C4mim]Cl (B), [C6mim]Cl (C), [C8mim]Cl (D), [C10mim]Cl (E) e [C12mim]Cl (F)) e das colinas ([Ch]Cl (G), [Ch][Ac] (I), [Ch][But] (H), [Ch][Prop] (J) e [Ch][Hex] (K)) e do surfactante não-iônico TX-114 (L)..... 63
- Figura 13.** Processo de *downstream* para obtenção do corante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* 67
- Figura 14.** Extração líquido-líquido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* utilizando o solvente orgânico acetato de etila. Adicionaram-se 50 mL de acetato de etila para 50 mL de meio fermentado, em três etapas (etapa A, etapa B e etapa C), para extrair o máximo possível de corante do meio fermentado 79
- Figura 15.** Cromatoplaça (sílica gel, 025 mm) do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*, indicando a presença de duas substâncias colorantes. Fase móvel: tolueno: acetato de etila:ácido fórmico (2,9:6,1:1). Visualização sob luz visível 80
- Figura 16.** Cromatograma do extrato de acetato de etila do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Análise em CLAE-DAD em coluna Hypersil C18 (250 x 4 mm, 5 µm), modo gradiente com água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B) 5 a 95% de B em 28 minutos e 95% a 5% de B em 33 minutos; vazão de 1mL/min; volume de injeção 20 µL 81
- Figura 17.** Subfrações 3 (vermelha) e 4 (roxa) obtidas do extrato de acetato de etila, do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* por CLAE-UV/Vis em modo preparativo 82
- Figura 18.** Estrutura química da molécula N-GABA-PP-V (A) e estrutura química proposta da substância obtida da subfração 4 (B) do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado de *T. amestolkiae* 85
- Figura 19.** Estabilidade do corante vermelho presente no meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*, exposto a diferentes (25, 35, 45, 55 e 65 °C) por 48 horas. As barras de erro representam limites de confiança de 95% para cada medida (encobertas pelos marcadores) 87
- Figura 20.** Corante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* em 0 horas a 55 °C (A) e após 48 horas de exposição a 55 °C (B) 88

Lista de Figuras

- Figura 21.** Estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* incubado, a 10 °C, na presença de 1-15% (m/m) do surfactante não-iônico TX-114 durante 48 horas. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores) 90
- Figura 22.** Estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* na presença dos LI [C₂mim]Cl, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl e [C₁₀mim]Cl nas concentrações de 0,1 M (A), 0,5 M (B) e 1,0 M (C), durante o período de 120 horas a 10 °C. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores)..... 92
- Figura 23.** Estabilidade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* na presença dos LI [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex] nas concentrações de 0,1 M (A), 0,5 M (B) e 1,0 M (C), durante o período de 120 horas. Todos os sistemas foram incubados a 10 °C. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores) 95
- Figura 24.** Comparação entre o colorante na ausência de LI no tempo de 0 horas (A) e após 120 horas na presença de acetato de colina (B), butanoato de colina (C) e hexanoato de colina (D) 97
- Figura 25.** Curva binodal para os sistemas compostos apenas por TX-114 e tampão McIlvaine pH 6,5 na ausência (linha preta) e presença do meio fermentado de *T. amestolkiae* (linha vermelha). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores) 101
- Figura 26.** Coeficiente de partição do colorante (K) vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)) em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições 102
- Figura 27.** Sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por 3% (m/m) (A) e por 15% (m/m) (B) de TX-114, tampão McIlvaine pH 6,5 e meio fermentado de *T. amestolkiae* contendo o colorante vermelho 103
- Figura 28.** Curva binodal para os sistemas compostos por TX-114, Tampão McIlvaine pH 6,5 e os LI (A) [C₈mim]Cl, (B) [C₁₀mim]Cl e (C) [C₁₂mim]Cl na presença (linhas cheias) e ausência (linhas pontilhadas) de meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* contendo os colorantes vermelhos. Br – Branco;

Lista de Figuras

MF – Meio Fermentado. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores)	106
Figura 29. Comparação das curvas binodais dos SMDFA compostos por TX-114 e 0,5% (m/m) dos LI [C ₈ mim]Cl, [C ₁₀ mim]Cl e [C ₁₂ mim]Cl.....	108
Figura 30. Coeficiente de partição (K) do colorante vermelho proveniente do meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i> utilizando-se SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)), tampão McIlvaine pH 6,5 e diferentes concentrações (0,1, 0,3 e 0,5% (m/m)) dos LI [C ₈ mim]Cl (A), [C ₁₀ mim]Cl (B) e [C ₁₂ mim]Cl (C). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores)	111
Figura 31. Comparação entre as eficiências de extração de sistemas compostos por 15% (m/m) de TX-114, na presença ou ausência do líquido iônico [C ₈ mim]Cl em diferentes concentrações	114
Figura 32. Comparação entre as seletividades do colorante vermelho em relação ao amarelo para sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114 e do líquido iônico [C ₈ mim]Cl.....	115
Figura 33. Curvas binodais para os sistemas compostos por TX-114 em água Mili-q e os LI (A) pentanoato de colina ([Ch][Pent]) e (B) hexanoato de colina ([Ch][Hex]) na presença (linhas cheias) e ausência (linhas pontilhadas) de meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i> . Onde Br – branco; MF – meio fermentado. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).....	117
Figura 34. Comparação das curvas binodais dos SMDFA compostos por TX-114 e 0,5 M dos LI [Ch][Pent] e [Ch][Hex].....	119
Figura 35. Coeficiente de partição do colorante vermelho proveniente do meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i> utilizando-se SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)), tampão McIlvaine pH 6,5 e diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,5 M) dos LI [Ch][Pent] (A) e [Ch][Hex] (B). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições.....	120
Figura 36. Comparação entre as eficiências de extração de sistemas compostos por 13% (m/m) de TX-114, na presença ou ausência do líquido iônico [Ch][Pent] em diferentes concentrações	122

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Solventes utilizados para o ensaio de solubilidade do meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i>	66
Tabela 2. Solubilidade do meio fermentado liofilizado produzido por <i>T. amestolkiae</i> em diferentes solventes	77
Tabela 3. Dados espectrométrico de RMN obtidos para a subfração 4 a 600 MHz para ¹³ C e ¹ H em deuterometanol.....	84
Tabela 4. Condutividade das fases <i>top</i> e <i>bottom</i> dos SMDFA compostos por TX-114 (3 e 15% (m/m)).....	104
Tabela 5. Balanço de massa para os SMDFA compostos por 3-15% (m/m) de TX-114	105
Tabela 6. Coeficiente de partição (K) do colorante vermelho produzido por <i>T. amestolkiae</i> , a razão volumétrica (R) e eficiência de extração (EE (%)) dos SMDFA compostos por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) [C ₁₀ mim]Cl incubados a 25, 35 e 45 °C	115

Lista de Material Suplementar

Lista de Material Suplementar

Figuras

Figura S1. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico acetato de colina e sua respectiva estrutura química.....	150
Figura S2. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico propanoato de colina e sua respectiva estrutura química	151
Figura S3. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico butanoato de colina e sua respectiva estrutura química.....	152
Figura S4. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico pentanoato de colina e sua respectiva estrutura química.....	153
Figura S5. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico hexanoato de colina e sua respectiva estrutura química.....	154
Figura S6. Varredura (230-650 nm) do meio fermentado (A) produzido por <i>T. amestolkiae</i>	155
Figura S7. Varredura (230-650 nm) do meio fermentado (B) produzido por <i>T. amestolkiae</i>	156
Figura S8. Solubilidade do meio fermentado liofilizado em diferentes solventes orgânicos. (A) 2-propanol, (B) acetato de etila, (C) acetona, (D) ácido clorídrico 5%, (E) ácido fórmico, (F) ácido nítrico 65%, (G) água, (H) benzeno, (I) butanol, (J) diclorometano, (K) dimetilsufóxido, (L) etanol, (M) éter etílico, (N) etilenoglicol, (O) formaldeído, (P) hexano, (Q) hidróxido de amônio, (R) isopropanol, (S) metanol, (T) n-n dimetilformamida e (U) toluol.....	157
Figura S9. Espectro de massas para a subfração 3 ($t_R = 15,98$)	158
Figura S10. Espectro de massas para a subfração 4 ($t_R = 16,65$)	158
Figura S11. Espectro de varredura em CLAE-DAD para a subfração 3 ($t_R = 15,98$).....	159
Figura S12. Espectro de varredura em CLAE-DAD para a subfração 4 ($t_R = 16,65$).....	159
Figura S13. Espectro de RMN de ^1H obtido à 600 MHz da subfração 4 do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i>	160
Figura S14. Mapa de contornos HMBC obtido a 600 MHz da subfração 4 do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por <i>T. amestolkiae</i>	161

Lista de Material Suplementar

Tabelas

- Tabela S1.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, tampão Mc Ilvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*..... 162
- Tabela S2.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, LI [C₈mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* 163
- Tabela S3.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₀mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* 164
- Tabela S4.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₂mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* 165
- Tabela S5.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Pent], tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* 166
- Tabela S6.** Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Hex], tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* 167
- Tabela S7.** Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos somente por TX-114 168
- Tabela S8.** Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos por TX-114 e pelos LI da família dos imidazólios 169
- Tabela S9.** Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos por TX-114 e pelos LI da família das colinas 170
- Tabela S10.** Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente 171
- Tabela S11.** Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₈mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os

Lista de Material Suplementar

resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente

Tabela S12. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₀mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. 173

Tabela S13. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₂mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. 174

Tabela S14. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Pent], água Mili-q e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente 175

Tabela S15. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Hex], água Mili-q e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente 176

Tabela S16. Eficiência da extração (EE) dos sistemas compostos apenas por TX-114 177

Tabela S17. Eficiência da extração (EE (%)) dos sistemas compostos por TX-114 e [C₈mim]Cl 178

Tabela S18. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [C₁₀mim]Cl 179

Tabela S19. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [C₁₂mim]Cl 180

Tabela S20. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) de [C₁₀mim]Cl em diferentes temperaturas de incubação 181

Lista de Material Suplementar

Tabela S21. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [Ch][Pent].....	182
Tabela S22. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [Ch][Hex].....	183
Tabela S23. Seletividade do corante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [C ₈ mim]Cl.....	184
Tabela S24. Seletividade do corante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [C ₁₀ mim]Cl.....	185
Tabela S25. Seletividade do corante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [C ₁₂ mim]Cl.....	186
Tabela S26. Seletividade do corante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [Ch][Pent]	187
Tabela S27. Seletividade do corante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [Ch][Hex]	188
Tabela S28. Condutividade de ambas as fases co-existentes nos SMDFA compostos por TX-114 (3-15% m/m) e LI da família dos imidazólios (0,10 – 0,50% m/m).....	189
Tabela S29. Condutividade de ambas as fases co-existentes nos SMDFA compostos por TX-114 (1-15% m/m) e LI da família das colinas (0,05 – 0,50 M)	190

Abreviatura e Siglas

Abreviatura e Siglas

%Abs_{rel} – Absorbância relativa

[C₂mim]Cl – Cloreto de 1-etil-3-metilimidazol

[C₄mim]Cl – Cloreto de 1-butil-3-metilimidazol

[C₆mim]Cl – Cloreto de 1-hexil-3-metilimidazol

[C₈mim]Cl – Cloreto de 1-octil-3-metilimidazol

[C₁₀mim]Cl – Cloreto de 1-decil-3-metilimidazol

[C₁₂mim]Cl – Cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazol

[Ch]OH – Hidróxido de colina

[Ch][Ac] – Cloreto de colina

[Ch][But] – Butanoato de colina

[Ch][Hex] – Hexanoato de colina

[Ch][Pent] – Pentanoato de colina

[Ch][Prop] – Propanoato de colina

Abs – Absorbância

Abs_{bottom} – Absorbância na fase *bottom*

Abs_{top} – Absorbância na fase *top*

AC – Antes de Cristo

AcOET – Acetato de etila

AOT – Bis (2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio

BM – Balanço de massa

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CMC – Concentração micelar crítica

CYA – Agar Czapeck

C₆H₈O₇ – Ácido cítrico

C₁₀E₄ – Éter monodecílico de tetraetilenoglicol

C₁₀TAB – Brometo de deciltrimetilamônio

CaCl – Cloreto de cálcio

CD₄O – deuterometanol

CTBA – Brometo de cetil-trimetilamonio

D₂O – Óxido de deutério

DIC – Dissociação induzida por colisão

EE (%) – Eficiência de extração

Abreviatura e Siglas

EM – Espectrômetro de massas

EM-ID – Espectrometria de massas via inserção direta

FDA – *Food and Drug Administration*

G6PG – Glucose-6-fosfato desidrogenase

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

K – Coeficiente de partição

LI – Líquidos iônicos

LIA – Líquidos iônicos apróticos

LIP – Líquidos iônicos próticos

PBS – Tampão fosfato-salino

R – Razão entre volumes

RMN – Ressonância magnética nuclear

SAB – Sistemas aquosos bifásicos

SMDFA – Sistemas micelares de duas fases aquosas

T_{cp} – Temperatura de *Cloud point*

T_R – Tempo de retenção

TX-100 – 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol

TX-114 – (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenoglicol

UA – Unidades de absorbância

V – Volume

V_{bottom} – Volume na fase *bottom*

V_{top} – Volume na fase *top*

Símbolos

Símbolos

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

%m/m – Porcentagem massa por massa

μL – Microlitros

μg/mL – Microgramas por mililitro

μL/min – Microlitros por minuto

g – Gramas

g/L – Gramas por litro

h – Horas

kV – Quilovolt

L/h – Litros por hora

M – Molar

mV – Milivolt

mg – Miligramas

mg/L – Miligramas por litro

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mM – Milimolar

m/z – Razão massa/carga

nm – Nanômetros

rpm – Rotações por minuto

u – Unidade de massa atômica

UA – Unidades de absorvância

V – Volts

Sumário

Sumário

1. Introdução	31
2. Revisão da Literatura	35
2.1. História dos Colorantes.....	36
2.1.1. Colorantes Naturais.....	38
2.1.2. Colorantes Naturais Produzidos por Fungos.....	39
2.1.3. Aplicações de Colorantes Naturais	42
2.2. Downstream.....	43
2.3. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	45
2.3.1. Surfactantes	46
2.3.2. Concentração Micelar Crítica	47
2.3.3. Micelas	48
2.3.4. Micelas Mistas.....	49
2.3.5. Líquidos Iônicos	51
2.3.6. Separação de Fases	54
2.3.7. Características dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	56
2.3.8. Aplicação dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	56
3. Justificativa	58
4. Objetivos	60
4.1. Objetivo Geral.....	61
4.2. Objetivos Específicos.....	61
5. Materiais e Métodos	62
5.1. Materiais	63
5.2. Microrganismos, Cultivo Submerso e Composição do Meio	64
5.3. Síntese de Líquidos Iônicos da Família das Colinas.....	65
5.4. Caracterização Química do Colorante Vermelho Produzido por <i>T.</i> <i>amestolkiae</i>	66
5.4.1. Solubilidade do Meio Fermentado.....	66
5.4.2. Partição Líquido-Líquido.....	67
5.4.3. Cromatografia em Camada Delgada.....	67
5.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Analítica.....	68
5.4.5. Separação dos Picos Majoritários	68

Sumário

5.4.6. Análise das Substâncias Purificadas por Espectrometria de Massas	68
5.4.7. Ressonância Magnética Nuclear	69
5.5. Estabilidade do Colorante Vermelho.....	70
5.6. Metodologias Analíticas	70
5.6.1. Análise dos Colorantes Vermelhos	70
5.7. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	71
5.7.1. Construção e Caracterização das Curvas Binodais	71
5.7.2. Estudo da Extração de Colorantes Naturais Vermelhos com Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	72
5.7.2.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas sem Líquidos Iônicos	72
5.7.2.2. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Com Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios	73
5.7.2.3. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Com Líquidos Iônicos da Família das Colinas	73
5.8. Parâmetros de Extração	74
6. Resultados e Discussão	76
6.1. <i>Caracterização do Colorante Vermelho Produzido por T. amestolkiae</i>	77
6.1.1. Solubilidade do Colorante Vermelho em Diferentes Solventes	77
6.1.2. Extração com Solvente Orgânico e Análise das Fases obtidas por Cromatografia em Camada Delgada	78
6.1.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear	80
6.2. Estudo de Estabilidade do Colorante Vermelho Produzido por <i>T. amestolkiae</i>	85
6.2.1. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho em Diferentes Temperaturas.....	86
6.2.2. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença do Surfactante Não-Iônico TX-114	89
6.2.3. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos	91

Sumário

6.2.3.1. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios	91
6.2.3.2. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos da Família das Colinas	94
6.3. Extração dos Colorantes Naturais Empregando Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas	99
6.3.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos Somente por TX-114	100
6.3.1.1. Curva Binodal	100
6.3.1.2. Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentado	102
6.3.2. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos por Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios	105
6.3.2.1. Curva Binodal	105
6.3.2.2. Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentando	109
6.3.2.3. Influência da Temperatura no Coeficiente de Partição	115
6.3.2.4. Dispersão dos Líquidos Iônicos	116
6.3.3. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos por Líquidos Iônicos da Família das Colinas	117
6.3.3.1. Curvas Binodais.....	117
6.3.3.2. Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentado	119
6.3.3.3. Dispersão dos Líquidos Iônicos	123
7. Conclusões	124
8. Bibliografia.....	127
9. Material Suplementar	149
10. Artigos.....	191

Introdução

Colorantes naturais são compostos com a capacidade não somente de aumentar a comercialização dos produtos nos quais são aplicados, mas também são vantajosos por poderem apresentar atividades biológicas, tais como, atividade antimicrobiana e antioxidante, as quais podem ser transmitidas aos compostos nos quais são inseridos (MALIK et al., 2012). Os colorantes provenientes de microrganismos trazem vantagens, como por exemplo, produção em grande escala, pois o bioprocessamento de obtenção apresenta alta taxa de crescimento do microrganismo, alto rendimento da biomolécula de interesse e grande variedade de compostos produzidos; esta diversidade está associada à estrutura química das moléculas produzidas e sua grande diversidade de cores (MAPARI et al., 2009b; VENTURA et al., 2013).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos aparecem em destaque. Cepas de *Talaromyces amestolkiae* (ant. *Penicillium purpurogenum*) são conhecidas por serem não micotoxigênicas, não patogênicas para humanos (DUFOSSÉ et al., 2014) e não produtoras de citrinina (toxina produzida principalmente por fungos do gênero *Monascus*), o que faz desta espécie uma potencial fonte de colorantes naturais com valor comercial (ARAI et al., 2013). Dentre algumas características dos colorantes produzidos por *T. amestolkiae* pode-se citar: atividade antimicrobiana (ZACCARIM et al., 2018), ausência de toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* (TEIXEIRA et al., 2012) e estabilidade em condições alcalinas e na presença de sais e polímeros (SANTOS-EBINUMA et al., 2013a).

O processo de *downstream* convencional de produtos naturais, em particular sua recuperação e separação, geralmente é realizado utilizando solventes orgânicos, seguido por etapas cromatográficas (DERMIKI et al., 2009). O uso de solventes orgânicos traz algumas desvantagens, como baixa recuperação, baixa seletividade e extração dispendiosa (SANTOS et al., 2011). Além disso, é de conhecimento que o uso extensivo de solventes orgânicos apresenta certas limitações devido a sua toxicidade e impacto ambiental, além de terem baixa biocompatibilidade e, por consequência, podem levar a degradação das moléculas de interesse. Adiciona-se a isso o alto custo para se realizar técnicas cromatográficas (AMID et al., 2013). Capello e colaboradores (2007) apresentam o que seria a idéia de solventes “verdes”, com menos impacto ambiental, que consiste em quatro direções (a) solventes com

propriedades como alta biodegradabilidade ou potencial reduzido de destruição de ozono, **(b)** uso de solventes produzidos por fontes renováveis como o etanol obtido da fermentação de mostos, **(c)** uso de fluidos supercríticos; **(d)** uso de líquidos iônicos (LI) (CAPELLO et al., 2007).

A técnica de extração líquido-líquido com solventes orgânicos é bastante empregada quando se trabalha com uma molécula cuja estrutura química não está elucidada. Após a extração e purificação da biomolécula alvo, torna-se necessário realizar a caracterização química para determinar sua estrutura. A geometria molecular é importante para determinar as propriedades físico-químicas da molécula/composto de interesse, tais como polaridade, ponto de fusão e ebulição, solubilidade, entre outras. Levando a importância da caracterização química em consideração, trabalhos recentes relatam diferentes tipos de caracterização para diversas biomoléculas que vão desde proteínas até colorantes (PORRAS-LOAIZA et al., 2013; CHAN-BACAB et al., 2015; FOURNIER et al., 2016; MARTELLI-TOSI et al., 2017; VENKATACHALAM et al., 2018).

Considerando o processo de extração de biomoléculas, técnicas alternativas a extração líquido-líquido com solvente orgânico vem sendo estudadas, dentre elas, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) (FREIRE et al., 2012). Estes sistemas formam duas fases imiscíveis ricas em água por combinação de, pelo menos, dois compostos estruturalmente diferentes - polímeros, sais, surfactantes, açúcares ou LI - em determinadas condições (PEREIRA et al., 2013). Ambas as fases destes sistemas são compostas, principalmente, por água, fazendo com que estes sistemas causem menor degradação da biomolécula alvo quando comparado aos sistemas convencionais que empregam solventes orgânicos. Como existem diversas possibilidades de combinação dos agentes formadores das fases, pode-se aumentar o rendimento da extração e a seletividade de diversos compostos (VICENTE et al., 2014; OOI et al., 2011). Dentre esses sistemas, pode-se destacar os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), os quais são compostos por surfactantes.

Quando SMDFA são formados pela mistura de dois tipos diferentes de surfactantes (geralmente um não-iônico e outro iônico), pode ocorrer a formação de micelas mistas. A presença de um surfactante iônico faz com que

ocorra um distúrbio no equilíbrio termodinâmico do sistema e a temperatura de *cloud point* (T_{cp}), a temperatura na qual inicia-se a separação das fases, pode variar, geralmente ocorrendo um aumento no seu valor devido à repulsão das cargas do surfactante iônico no interior das micelas (RODRIGUEZ-ESCONTRELA et al., 2016). Desta maneira, o uso de aditivos ou surfactantes iônicos nestes sistemas pode modificar tanto as interações intermicelares como as intramicelares por causa de efeitos eletrostáticos (ALBERTSSON, 1986).

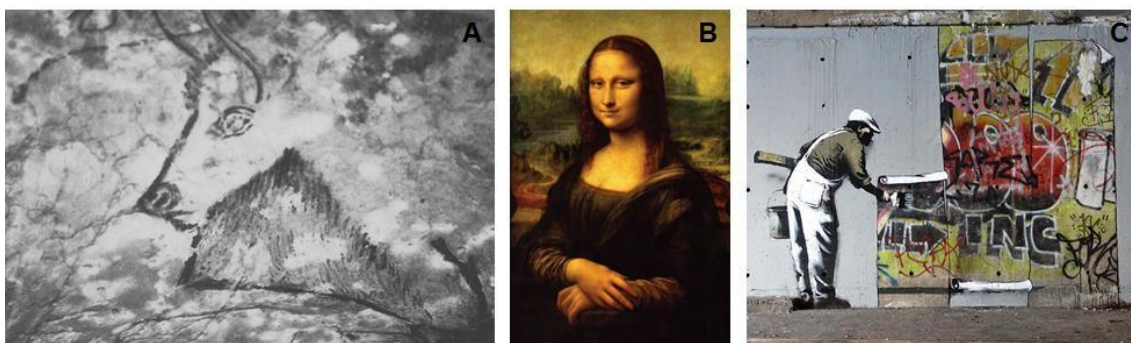
Revisão da Literatura

2.1. História dos Colorantes

Cores sempre fascinaram os homens e, além disso, apresentam um importante papel na aceitação de produtos de diferentes setores industriais, uma vez que os consumidores julgam a qualidade do produto pela sua cor (WROLSTAD & CULVE, 2011). Por décadas, a indústria utilizou aditivos para melhorar ou restaurar a cor original de seu produto ou para garantir sua uniformidade entre lotes (MEDEIROS et al. 2012; FERNÁNDEZ-LOPEZ et al. 2013). Tais aditivos utilizados podem ser chamados de colorantes e podem ser classificados em pigmentos ou colorantes; a diferença básica entre estes são seu tamanho e solubilidade, uma vez que pigmentos são praticamente insolúveis no meio ao qual são incorporados e apresentam partícula de 1-2 μm enquanto os colorantes são solúveis e apresentam partículas menores (0,5 μm); além disso os pigmentos mudam as características físico-químicas dos materiais nos quais são inseridos enquanto os colorantes somente transmitem a cor ao material sem a alteração da estrutura química do mesmo (SARON & FELIZBERI, 2006; PATEL et al., 2012).

Desde a pré-história, homens deixaram sua marca nos ambientes através de imagens pintadas, seja na forma de simples marcas de mãos, obras de arte ou “graffiti” (Figura 1). Muitas tribos indígenas americanas utilizavam cores no corpo e cabelos para se comunicarem. As cores amarelo ocre, vermelho ocre e preto foram obtidas da fuligem da queima de gordura animal e carvão (BARNETT et al., 2006). Colorantes naturais como bixina, genipina e andirobina eram utilizados com propósitos estéticos, religiosos e de proteção (SARON et al., 2006).

Figura 1. (A) Retrato de um bisão do Salon Noir na caverna de Niaux (~10500 AC); (B) Mona Lisa (1503-1506) por Leonardo da Vinci; (C) *Graffiti* por Banksy (Dezembro de 2009).



Fonte: MENU e WALTER, 1992; KEYGHOBADI, 2014; www.banksy.co.uk/out.asp

O povo egípcio começou a desenvolver colorantes naturais em 4000 antes de Cristo (AC). Tais colorantes produzidos eram utilizados para pintar as tumbas de faraós da quarta dinastia (2613-2495 AC) e também apareceram em pinturas europeias dos séculos XV e XVI (BARNETT et al., 2006).

O primeiro colorante a ser comercializado globalmente foi o púrpura tíria, proveniente de caramujos marinhos, que era negociado pelo povo fenício (aproximadamente 3000 AC) (BECHTOLD & MUSSAK, 2009). Centuriões romanos utilizavam colorantes vermelhos extraídos do molusco *Murex* sp. para tingir suas túnicas, enquanto egípcios e bretões utilizavam índigo extraído da planta *Isatis tinctoria*. Outros colorantes utilizados neste mesmo período foram o açafrão, extraído de plantas e o carmim cochonilha, obtido de animais (ZHANG et al., 2006). Até a metade do século XIX, colorantes eram essencialmente obtidos de plantas e animais (HILL, 1997).

Em 1856, o químico inglês William H. Perkin sintetizou o colorante *mauve* (também conhecido como anilina roxa). Em 1862, houve a criação de uma fábrica que produzia este colorante, o que marcou o início da indústria moderna de colorantes (SOUSA et al., 2008; CAÑAMARES & LOMBARDI, 2015). Desde então, e com o desenvolvimento da química, vários compostos coloridos inorgânicos foram criados e usados extensivamente como colorantes (ZHANG et al., 2006). Então, colorantes naturais foram sendo rapidamente substituídos pelos quimicamente sintetizados devido a seu baixo custo, produção em larga escala, fácil localização, composição homogênea, entre outros fatores (BECHTOLD & MUSSAK, 2009).

Apesar destas vantagens, colorantes quimicamente sintetizados foram utilizados, durante muitos anos, sem preocupação em relação a sua segurança. Então com o surgimento de agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América, iniciaram-se testes de toxicidade em colorantes empregados no mercado. Os resultados demonstraram que na concentração empregada para colorir diferentes compostos, estes colorantes sintéticos apresentavam efeitos tóxicos. Assim, as agências reguladoras começaram a exigir uma série de testes toxicológicos e, somado a isso, estudos têm constatado que alguns colorantes sintéticos podem causar significativa poluição ambiental e apresentar efeitos tóxicos (MALIK et al., 2012), como reações alérgicas e intolerância (WANG et al.,

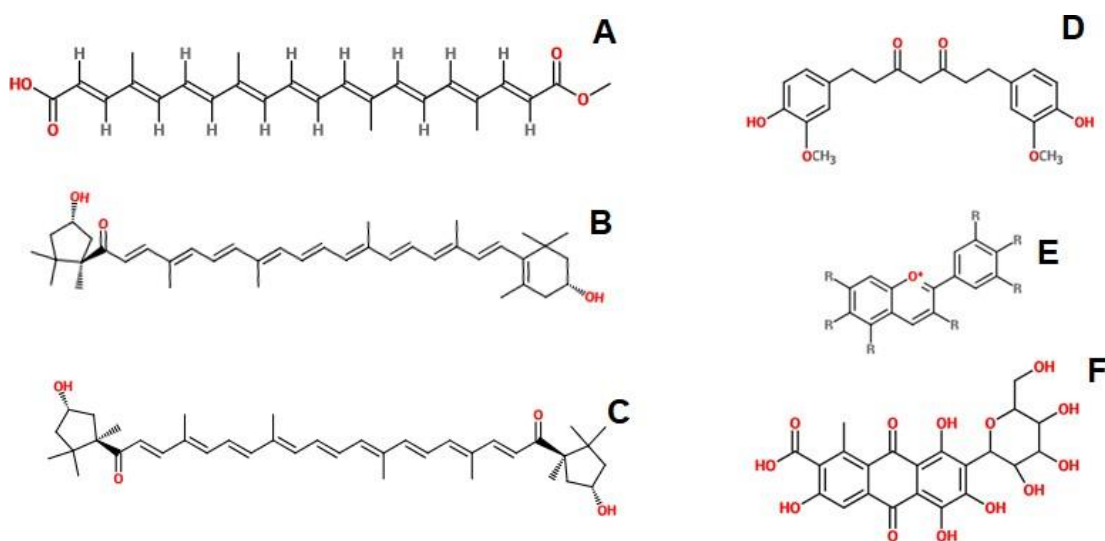
2006), efeitos carcinogênicos (PAN et al., 2009) e afetar o comportamento de crianças, causando, por exemplo, a hiperatividade (MASONE & CHANFORAN, 2015). Nos EUA, o FDA proibiu o uso dos colorantes sintéticos *alloxan*, preto carbono, ácido carmico, azul cobalto, cochonilha, grafite, entre outros. (FDA, 2018).

Como resultado, a atenção em relação a segurança de colorantes naturais cresceu, gerando a implementação de inúmeros regulamentos em diferentes países para a redução no número de colorantes sintéticos aprovados para uso em alimentos (PAN et al., 2009; RYMBAL et al., 2011).

2.1.1 Colorantes Naturais

Colorantes naturais são, por definição, produtos sintetizados e acumulados e excretados por células vivas (DABAS et al., 2011). Podem ser extraídos de plantas, insetos, microrganismos e animais. Formam um grupo de moléculas biossinteticamente não relacionadas e heterogêneas que estão unidas por uma característica em comum: sua estrutura eletrônica contém um cromóforo que é responsável pela cor característica de cada composto (PEREIRA et al., 2014). Entre eles, alguns são considerados como os mais importantes para o mercado global, sendo estes **(a)** bixina; **(b)** capsantina; **(c)** capsorrubina **(d)** curcumina; **(e)** antocianinas e **(f)** carmim cochonilha (**Figura 2**).

Figura 2. Estruturas químicas dos mais importantes colorantes para o mercado global. (A) bixina; (B) capsantina; (C) capsorrubina; (D) curcumina; (E) estrutura comum para antocianinas; (F) carmin cochonilha. Estruturas B e C são derivadas do extrato de páprica.



A empresa *Transparency Market Research* realizou uma pesquisa e verificou que o mercado de colorantes tinha um valor estimado de U\$ 27 bilhões no ano de 2016; com um crescimento de 2 a 3% por ano na última década. A região da Ásia-Pacífico foi a que mais contribuiu para este crescimento; enquanto a Índia contribuiu aproximadamente com 6% de todo o mercado global de colorantes e pigmentos (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2018).

Existem estudos utilizando microrganismos como produtores de colorantes naturais, além disso, pesquisas estão em desenvolvimento para se reduzir o custo de produçao de tais compostos em comparaçao com colorantes sintéticos ou aqueles extraídos de outras fontes naturais (DUFOSSE et al., 2014). Além disso, o uso de fungos como produtores de colorantes está aumentando, uma vez que muitos ascomicetos naturalmente sintetizam e secretam colorantes e podem ser considerados como uma fonte confiável de colorantes naturais com funcionalidade melhorada (MAPARI et al., 2009a).

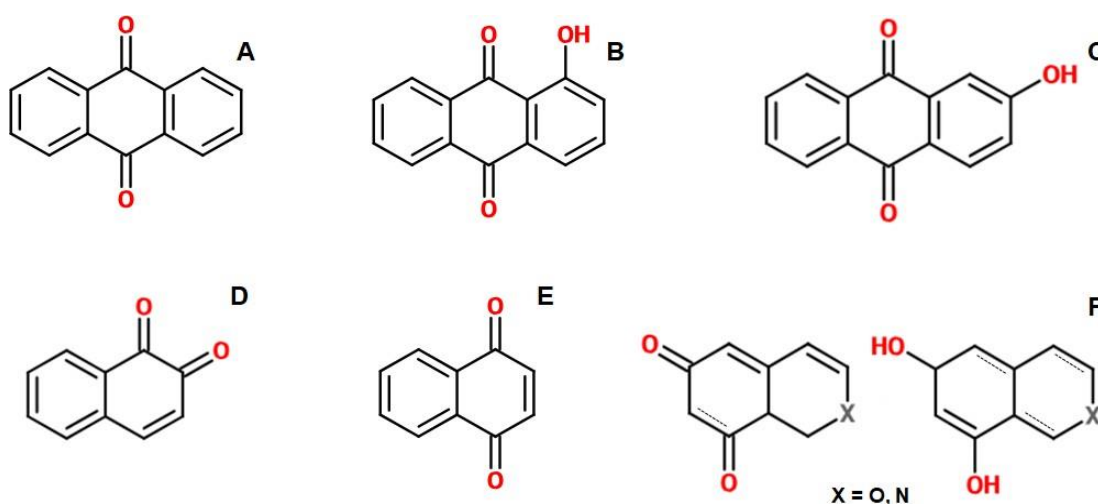
2.1.2. Colorantes Naturais Produzidos por Fungos

Fungos produzem uma grande quantidade de metabólitos secundários que são importantes para a indústria, incluindo colorantes. Colorantes produzidos por fungos são uma fonte de moléculas orgânicas naturais com

funcionalidade melhorada, como por exemplo sua fotoestabilidade (MAPARI et al., 2009a). A diversidade de colorantes não está baseada somente nas diferentes estruturas químicas, mas também em sua ampla gama de cores, que podem adicionar novas matizes a paletas de cores de colorantes já existentes (MAPARI et al., 2009a; SANTOS-EBINUMA et al., 2013b).

Colorantes fúngicos podem ser classificados quimicamente como carotenoides e policetídeos (MAPARI et al., 2010). Pigmentos policetídeos variam na estrutura em tetra a octacetídeo, cada tendo quatro ou oito unidades de C₂ que contribuem para a cadeia policetídica. Classe representativas deste tipo de pigmento são as antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftoquinonas e azafilonas, cada uma com uma ampla gama de cores (**Figura 3**) (MAPARI et al., 2010). Estas moléculas geralmente apresentam sistemas de anéis condensados, um ou mais grupos carbonila, ácido carboxílico, grupos éster ou amida que absorvem no espectro UV-Visível. Além disso, policetídeos podem apresentar ação antibiótica, anticancerígena, imunossupressora, antifúngica e como agente cardiovascular (MAPARI et al., 2009a).

Figura 3. Estruturas base dos colorantes policetídeos (A) antraquinona; (B) 1-hidroxiantraquinona; (C) 2-hidroxiantraquinona; (D) 1,2-naftoquinona; (E) 1,4-naftoquinona; (F) azafilonas.



O colorante mais antigo ainda em uso é denominado de angkak, também chamado de koji vermelho, proveniente de arroz fermentado pelo

fungo *Monascus*. Na Europa, o primeiro relato de produção, com sucesso, de corante produzido por microrganismos foi através do fungo *Blakeslea*, que produzia β -caroteno (DUFOSSÉ et al., 2005). Os fungos *Blakeslea trispora*, *Mucor circinelloides* e *Phycomyces blakesleeanus* são microrganismos que produzem β -caroteno, que é um corante carotenoide amarelado, também conhecido como pró-vitamina A (KUMAR et al., 2015).

Fungos do gênero *Monascus* são conhecidos como grandes produtores de corantes naturais. Os corantes produzidos por espécies de *Monascus* são em sua grande maioria azafilonas; sendo monascina, ancaflavina, monascorubina, rubropunctaina, monascorubramina e rubropunctamina os mais produzidos (FRISVAD et al., 2013). A espécie *M. purpureus* (SHI & PAN; 2011, PRAJAPATI et al., 2014) e *M. ruber* (MEINICKE et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2013) são as mais estudadas em termos de produção de corantes. Estudos anteriores demonstraram que corantes produzidos por fungos deste gênero apresentam atividade biológica como propriedades antimutagênica e anticancerígena, atividade antimicrobiana, atividade anti-obesidade (FENG et al., 2012), anti-inflamatória (CHENG et al., 2012), antioxidante (HSU & PAN, 2012) e como um suplemento dietético à hiperlipidemia, melhora a hipertensão e hipercolesterolemia (LIN et al., 2008). Porém, certas cepas de *Monascus* também foram reportadas como coprodutores da micotoxina citrinina e outros metabólitos potencialmente tóxicos (MAPARI et al., 2010), em determinadas condições de cultivo. Apesar de esforços de diversos grupos de pesquisa para minimizar a produção da micotoxina, ela ainda se encontra presente no processo fermentativo, demonstrando a necessidade de se encontrar novos produtores de corantes naturais.

Mapari e colaboradores (2008) realizaram screening de cepas de *Talaromyces* (antes *Penicillium*) que são potenciais produtores de corantes naturais com estrutura policetídea e cromóforos similares aos de *Monascus*. As espécies em análise foram *T. purpurogenus*, *T. pinophilus*, *T. aculeatus*, *T. funiculosus* e *T. minioluteus*. Xantosamina A e derivados de rubropunctatina foram encontrados em extratos de *T. aculeatus* e monascorubrina foi identificado tanto em *T. aculeatus* como em *T. pinophilus*. A vantagem destes microrganismos é que nenhum extrato apresentou a produção de citrinina. No

ano de 2009, Mapari e colaboradores identificaram 10 cepas de fungos pertencentes a quatro espécies de fungos, sendo estes *Talaromyces purpurogenus*, *T. aculeatus*, *T. funiculosus* e *T. pinophilus* como potenciais produtores de pigmentos parecidos com aqueles produzidos por *Monascus* mas com a vantagem de não produzirem micotoxinas (MAPARI et al., 2009b).

Frisvad e colaboradores (2013) também estudaram espécies de *Talaromyces*, dentre eles, *Talaromyces amestolkiae*, como produtores de colorantes idênticos aos produzidos por *Monascus*. As espécies estudadas não produziam citrinina, porém algumas cepas podem ser patogênicas para humanos (*T. stollii*) ou produtores de outras classes de micotoxinas como a rubratoxina A e B (FRISVAD et al., 2013).

2.1.3 Aplicação de Colorantes Naturais

Colorantes naturais são amplamente utilizados na indústria têxtil (ISLAM et al., 2013), de papel (MALIK et al., 2012), couro (GUILLÉN et al., 2012), cosmética (SIGURDSON et al., 2017) e madeireira (ALI, 2010). Alimentos são frequentemente coloridos com colorantes naturais ou sintéticos aprovados por agências reguladoras (CAROCHO et al., 2014). Os colorantes também são utilizados para dar cor a derivados de petróleo, como ceras, óleos lubrificantes, pomadas e gasolina, além de plásticos, resinas e produtos de borracha (KUMARI et al., 2012). Um dos principais problemas na aplicação dos colorantes é a segurança, o que leva a muitas limitações e normatizações sobre o uso de colorantes em diferentes países (NIKFAR & JABERIDOOST, 2014).

Em 2010, os colorantes naturais representaram 31% do mercado de colorantes, enquanto os sintéticos somaram 40% e colorantes idênticos aos naturais representaram 29% do mercado (MAPARI et al., 2010). Existe uma crescente demanda por colorantes não-tóxicos na indústria, particularmente para aqueles que são utilizados na área de saúde, brinquedos infantis e peças de couro (VELMUGURAN et al., 2010).

Colorantes naturais provenientes de algas ou extraídos de plantas em período de floração foram utilizados em alimentos e suplementos nutricionais, demonstrando a importância de nichos do mercado nos quais consumidores estão dispostos a pagar determinado preço por um ingrediente natural

saudável (DUFOSSÉ et al., 2014). Na indústria farmacêutica, colorantes produzidos por fungos filamentosos são interessantes porque podem não somente dar cor, mas também possuem aplicação com potencial clínico, uma vez que podem atuar como anticancerígenos, antiproliferativos, antibióticos etc. Na indústria têxtil, o uso de colorantes naturais não-alergênicos, não tóxicos e amigáveis ao meio ambiente aumentou devido à maior regulamentação a fim de evitar alguns colorantes sintéticos com características perigosas (SAMANTA & AGARWAL, 2009).

A maioria dos colorantes produzidos por fungos está em estágio de desenvolvimento ou pesquisa, e, é vital, a aprovação de suas aplicações pelas agências reguladoras é essencial. Desta forma, há um vasto campo de estudo a ser explorado envolvendo novas espécies que produzam diferentes moléculas e, também, que não produzam micotoxinas, além de novas técnicas de extração e purificação de tais compostos.

2.2 Downstream

Produtos biológicos são importantes para muitas aplicações que incluem desde sua utilização em alimentos até a indústria farmacêutica. Porém, para alguns tipos de aplicação, tais produtos podem ser utilizados como extratos brutos, com pouca ou nenhuma purificação enquanto alguns outros, como aqueles voltados para a indústria farmacêutica, necessitam de um processo de downstream mais complexo (CARTA & JUNGBAUER, 2010).

Um processo típico de produção em biotecnologia pode ser dividido nas seguintes etapas: **(a) upstream** (preparação do meio de cultivo e fermentação); **(b) downstream** (purificação); **(c) formulação**. O processo de downstream inclui etapas de **(i)** preparação; **(ii)** isolamento de sua molécula de interesse; **(iii)** purificação e **(iv)** polimento. O número de processos utilizados em cada etapa depende da **(I)** localização de sua molécula de interesse (extracelular ou intracelular); **(II)** natureza da molécula (tamanho, carga, solubilidade); **(III)** quantas etapas de purificação serão necessárias (por exemplo, produtos farmacêuticos necessitam de mais etapas) (STRUBE et al., 2011; MEITZ et al., 2014). Os processos de *downstream* são constituídos, na sua maioria, de várias etapas com baixos rendimentos tornando os custos altos do ponto de vista industrial (PESSOA JR & KILIKIAN, 2005).

Dentre os métodos de isolamento, a extração líquido-líquido é uma das técnicas mais clássicas e amplamente empregadas em diversos processos em escala industrial. Esta técnica consiste em um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira (SANTOS et al., 2011). A eficiência da extração depende principalmente da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. O emprego de solventes orgânicos é amplo, porém apresenta algumas limitações para aplicação em larga escala, devido à toxicidade dos solventes, seu custo, seu impacto ambiental e ao fato que solventes orgânicos podem levar à degradação dos metabólitos (DERMIKI et al., 2009).

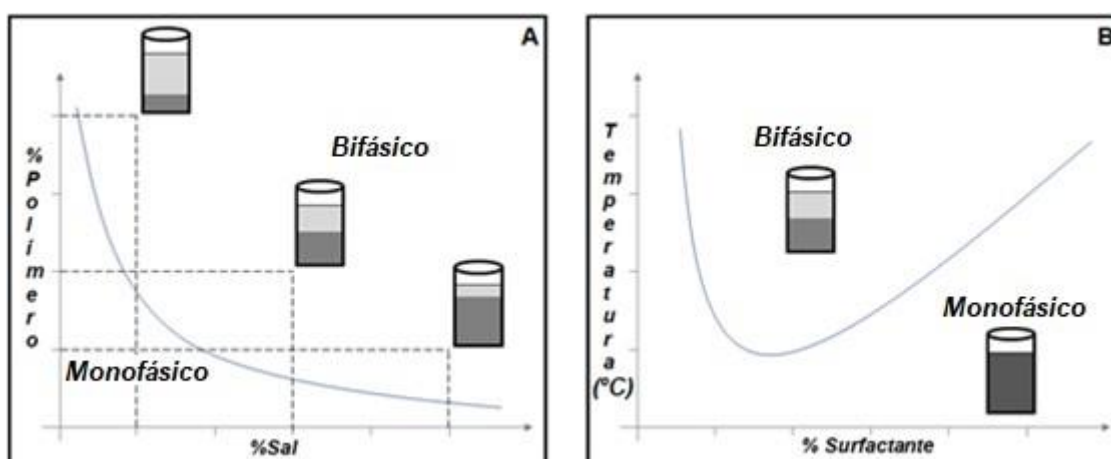
Para a obtenção do composto puro é fundamental o desenvolvimento de técnicas mais econômicas, de forma a incrementar os parâmetros de purificação e ao mesmo tempo reduzir os custos operacionais. Desta maneira, técnicas alternativas como a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásicos (SAB) tem sido largamente estudadas visando a extração de biomoléculas. Estes sistemas podem ser utilizados como processos de etapa única que permitem a remoção de moléculas indesejadas e a obtenção de sua molécula alvo (YAU et al., 2015). Além disso, as vantagens de tais sistemas residem no seu potencial para scale-up, rápida transferência de massa, equilíbrio de fases, possibilidade de processamento contínuo, baixo consumo de energia, entre outras (AMID et al., 2015).

Em 1896 deu-se a descoberta dos SAB. Martinus Willem Beijerinck misturou uma solução aquosa de amido com uma solução de gelatina e percebeu que desta mistura não resultava uma solução homogênea, ao invés disso, uma emulsão se formou (VIS, 2015; IQBAL et al., 2016). Tais sistemas podem ser formados pela combinação de pelo menos dois compostos estruturalmente diferentes, como por exemplo: **(a)** polímero; **(b)** sais; **(c)** surfactantes; **(d)** açúcares ou **(e)** líquidos iônicos (LI) (PEREIRA et al., 2013; YAU et al., 2015). Como ambas as fases destes sistemas são compostas principalmente, por água, estes acabam se tornando excelentes para a manutenção da conformação nativa e das propriedades biológicas de biomoléculas. Por existirem diversas possibilidades de combinação dos

agentes formadores das fases, pode-se aumentar a extração e a seletividade de diversos compostos (VICENTE et al., 2014; OOI et al., 2011).

Basicamente, a separação de fases é dependente de parâmetros que estão relacionados com as propriedades do sistema (ROSA et al., 2010). Concentração e peso molecular dos componentes, presença de aditivos, temperatura e pH são alguns fatores que influenciam a separação (YAU et al., 2015; IQBAL et al., 2016). Para se determinar quando a separação de fases irá ocorrer, existem os diagramas de fase. Estes diagramas apresentam informações como por exemplo, a concentração de cada componente e/ou a temperatura necessária para que ocorra a separação, além disso, é possível extrair dados como o volume de componente em cada fase e o volume entre estas (RAJA et al., 2011). A **Figura 4** apresenta um típico diagrama de fases para um sistema formado por um polímero e um sal (**A**) e de um surfactante em relação a temperatura (**B**). Estes sistemas são denominados Sistemas Polímeros de Duas Fases Aquosas (SPDFA) e Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), respectivamente.

Figura 4. Diagrama de fases para um sistema aquoso bifásico composto por polímero e sal (**A**) e outro para um sistema micelar de duas fases aquosas (**B**). Demonstração da região onde há formação de duas fases e a relação de volume entre as fases de acordo com a porcentagem de cada componente.



2.3. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas são um tipo de SAB compostos por surfactantes. Tais sistemas apresentam um ambiente favorável

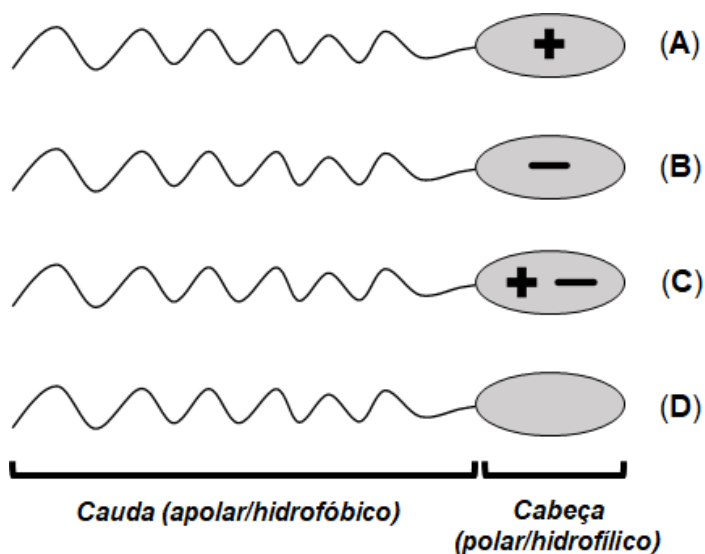
para biomoléculas devido a característica anfifílica dos surfactantes, mantendo a configuração nativa e atividade da biomolécula alvo, e seu desempenho pode ser controlada e otimizada através de variações nas condições de incubação ou de seus componentes (LIU et al., 1996).

2.3.1 Surfactantes

Surfactantes são agentes que diminuem a tensão superficial de líquidos, permitindo uma propagação mais fácil, e podem diminuir a tensão interfacial entre dois líquidos. São uma classe de compostos anfifílicos, que contém grupos hidrofóbicos (cauda) e hidrofílicos (cabeça), sendo solúveis em compostos orgânicos e água (MISHRA et al., 2009).

Em relação a sua classificação, ela é baseada na natureza e no tipo de grupo de superfície ativa presente na molécula. São classificados em (a) catiônico, apresenta sua cabeça carregada positivamente; (b) aniônico, apresentam sua cabeça carregada negativamente; (c) zwitteriônico, quando ambos os centros catiônico e aniônico estão presentes na mesma molécula e (d) não-iônico, apresentam cabeças não carregadas. A **Figura 5** apresenta uma representação simplificada dos surfactantes supracitados (SCHRAMM & MARANGONI, 2000; RAPP, 2017).

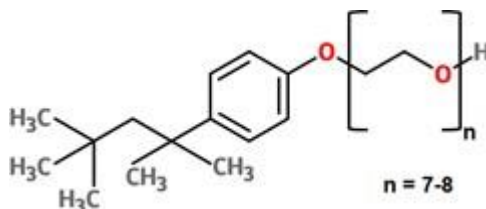
Figura 5. Representação gráfica da estrutura de surfactantes e suas cargas. (A) catiônico, (B) aniônico, (C) zwitteriônico e (D) não-iônico.



Quanto a sua aplicação, os surfactantes podem ser utilizados em shampoos (CHIU et al., 2008; IM et al., 2008), cosméticos (HANNO et al., 2015) como agente estabilizante (TAKAHARA et al. 2005; BINKS & DESFORGES, 2006), recuperação de óleo (DEMIRBAS et al., 2015) e diversas biomoléculas (PAULUS et al., 2014; VICENTE et al., 2014, 2016), em processos de purificação (SHOW et al., 2015; AMID et al., 2016; DING et al., 2016; GUO et al., 2017) e extração de diferentes biomoléculas (SHARMA et al., 2015; AMIRI-RIGI & ABBASI, 2016; WAN et al., 2016; TORRES et al., 2018).

Nesta tese trabalhou-se com o surfactante não-iônico Triton X-114 (TX-114) (**Figura 6**), produzido a partir de octilfenol polimerizado com óxido de etileno. Este surfactante é amplamente utilizado para extração e purificação de diferentes moléculas como proteínas da membrana microssomal do fígado de rato (MATHIAS et al., 2011), fragmentos de cadeia simples de anticorpos (MALPIEDI et al., 2014), proteína verde fluorescente (WANG et al., 2014), colorantes naturais (TORRES et al., 2018), entre outras.

Figura 6. Estrutura química do surfactante não-iônico (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-poli(etilenoglicol).



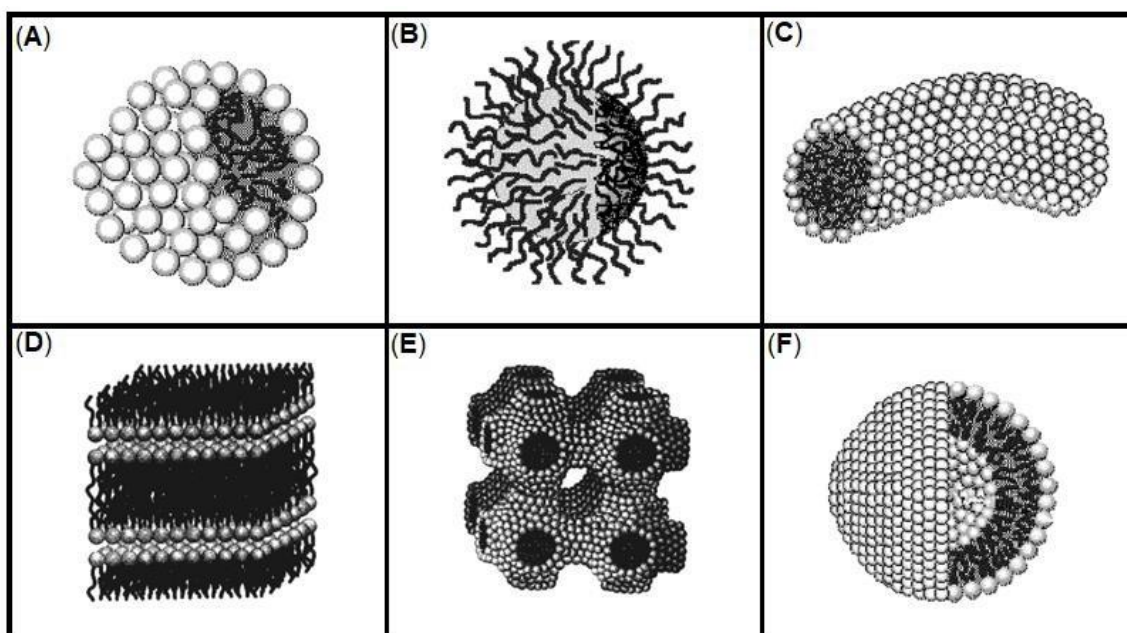
Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/x114?lang=pt®ion=BR>

2.3.2 Concentração Micelar Crítica

Em solução aquosa, os surfactantes podem apresentar comportamentos diversos, dependendo de sua concentração. Quando, em solução, o surfactante pode se encontrar abaixo da concentração micelar crítica (CMC) (concentração mínima na qual o surfactante forma micelas), acima da CMC, formando monômeros do surfactante e micelas que coexistem em um equilíbrio dinâmico (DOMINGUEZ et al., 1997). A CMC é influenciada por vários fatores como (a) estrutura química do surfactante; (b) temperatura; (c) presença de co-solutos como sais, surfactantes iônicos, LI, entre outros; (d) pH. Além disso, a concentração do surfactante, fatores energéticos e estruturais e a presença de

aditivos influenciam no tamanho e forma das micelas (HOLMBERG et al., 2002; SCHRAMM, 2000; RAPP, 2017). A **Figura 7** apresenta a forma de algumas micelas encontradas na literatura. A adição de surfactante acima da CMC não só acarreta um aumento no número de micelas como também o tamanho das micelas formadas (RUCKENSTEIN & NAGARAJAN, 1975).

Figura 7. Representação gráfica dos diferentes tipos de micelas. (A) esférica, (B) reversa, (C) cilíndrica, (D) lamelar, (E) bicontínua e (F) vesícula.



Fonte: Holmberg et al., 2002

2.3.3 Micelas

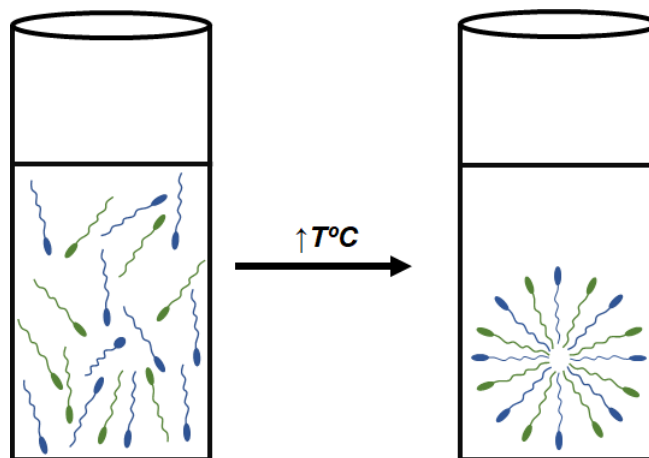
A principal força por trás da associação dos monômeros de surfactantes é a diminuição da energia livre do sistema, que resulta na remoção dos fragmentos hidrofóbicos do ambiente aquoso (caudas apolares), minimizando seu contato e levando a formação de um núcleo estabilizado com blocos hidrofílicos expostos à solução aquosa (cabeças polares), maximizando seu contato. Geralmente, as micelas são formadas por 50 a 200 monômeros (KULTHE et al., 2012) como resultado de um balanço entre forças atrativas e repulsivas intermoleculares. Entre as interações que ocorrem no processo de micelização estão: ligação de (a) hidrogênio; (b) hidrofóbica; (c) eletrostática; (d) estérica; (e) van der Waals (NUSSELDER & ENGBERTS, 1992;

VENKATESAN et al., 1994; RICCERI et al., 1996; MAIBAUM et al., 2004; PENFOLD et al., 2005; SANTOS et al., 2017).

2.3.4 Micelas Mistas

A teoria molecular de micelas mistas como representado na **Figura 8** foi desenvolvida por Nagarajan em 1985 a partir de extensões e variações na teoria formulada por este autor e Ruckenstein em 1979 para sistemas compostos por um único surfactante (NAGARAJAN, 1992). Na literatura é possível encontrar a teoria por trás da formação deste tipo de micelas (MITAL, 1979; MOROI, 1992; CLINT, 1992; ROSEN & ZHOU, 2001; PAN et al., 2015; RUB et al., 2015; POSA et al., 2017) as quais podem incrementar o conhecimento sobre o processo de formação de micelas mistas e sua importância.

Figura 8. Representação gráfica da formação de micelas mistas com o aumento de temperatura em um sistema composto por dois surfactantes diferentes.



O uso de mistura de surfactantes permite controlar propriedades de soluções micelares para incrementar sua aplicação em áreas distintas como cosméticos, biologia e farmacologia (LETELLIER et al., 2011). Além disso, uma das melhores maneiras de se melhorar a *performance* do uso de surfactantes é através da adição de um segundo surfactante ao primeiro (ROSEN & ZHOU, 2001; CUI et al., 2010). A tendência de diferentes surfactantes em formar micelas mistas é governada por interações de atração (sinergismo) (onde o

CMC da mistura é menor do que o para cada surfactante) ou repulsão (antagonismo) (onde o CMC é maior que o dos surfactantes puros) (ROSEN & KUNJAPPU, 2012). Geralmente, surfactantes não-iônicos e iônicos formam micelas mistas por interações de atração, aumentando sua capacidade de solubilizar diferentes solutos (SEHGAL et al., 2009).

Micelas mistas podem ser formadas por surfactantes zwitterionicos e não-iônicos (THAKKAR et al., 2015), zwitterionicos e catiônicos (NAQVI & KABIR-UD-DIN, 2015), zwitterionico e aniônico (PAN et al., 2015), aniônico e não-iônicos (SAHU et al., 2014) iônico e não-iônico (YORDANOVA et al., 2017) e catiônico e aniônico (XU et al., 2016). Outro ponto importante para se destacar são os estudos que demonstram a incorporação de LI com características surfactantes em micelas mistas (MISKOLCZY et al., 2004; SMIRNOVA et al., 2009; COMELLES et al., 2012; CHEN & BERMUDEZ, 2013; WANG et al., 2017).

As micelas mistas são empregadas para a extração de diferentes tipos de moléculas. Hemavathi e colaboradores (2010) utilizaram sistemas de micelas mistas reversas, compostos por bis (2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio (AOT) e pelos surfactantes não-iônicos Tween 20, Tween 80, Tween 85 e Triton X-100 (TX-100) em iso-octano para extração e purificação primária de β -glucosidase do extrato aquoso de cevada (HEMAVATHI ET AL., 2010). Kukusamude e colaboradores (2010) utilizaram TX-114 e brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) para extrair antibióticos baseados em penicilina (ampicilina, penicilina G, oxacilina e cloxacilina) em amostras de leite (KUKUSAMUDE et al., 2010). Santos e colaboradores (2011) procederam com a recuperação de ácido clavulânico de meio fermentado de *Streptomyces clavuligerus*, utilizando sistemas de extração baseados em micelas mistas compostas pelo surfactante TX-114 e por AOT (SANTOS et al., 2011). Os surfactantes Tween 85 e AOT foram utilizados para formarem um sistema de micelas mistas reversas como um novo método de extração de amoxicilina (CHUO et al., 2014).

Bhattacharjee e colaboradores (2010) verificaram o uso de micelas mistas compostas pelos surfactantes aniônicos Tween 80 e desoxicolato de sódio como meio para a entrega do fármaco catiônico cloridrato de doxorrubicina (BHATTACHARJEE et al., 2010).

Rupp e colaboradores (2010) utilizaram micelas mistas formadas por laurato de sacarose e fosfatidilcolina hidrogenada ou 1,2-dipalmitoil-fosfatidilcolina para verificar a solubilidade de fármacos não solúveis em água (diazepam, tetrazepam e estradiol); verificou-se que micelas compostas por laurato de sacarose e fosfatidilcolina hidrogenada apresentaram capacidade de solubilização melhor do que outros sistemas já utilizados (RUPP et al., 2010). Wei et al. (2011) utilizaram o surfactante catiônico brometo de N₁-dodecil-N₁, N₁, N₂, N₂-tetrametil-N₂-octileno-1,2-diamino, os não-iônicos Brij35 e TX-100 e os catiônicos cloreto de cetilpiridínio e brometo de lauriltrimetilamônio, para formarem sistemas de micelas mistas e verificar a solubilização de fenantreno (hidrocarboneto aromático policíclico composto por três anéis de benzeno) (WEI et al., 2011). Maswal e colaboradores (2015) verificaram que sistemas binários e ternários formados por colato de sódio, polissorbato não-iônico (Tween 20 e 40) e polioxietileno (Brij30, 35, 56 e 58) são biocompatíveis e podem ser utilizados para a solubilização e como veículos para os fármacos carbamazepina e nifedipina (MASWAL et al., 2015).

Além disso, Pourreza e colaboradores (2011) realizaram um estudo com micelas mistas formadas pelos surfactantes catiônico brometo de cetrimônio e os surfactantes não-iônicos TX-110 e 114 para pre-concentração e determinação espectrofotométrica do corante vermelho *allura* em amostras de doces, bebidas e geleias (POURREZA et al., 2011).

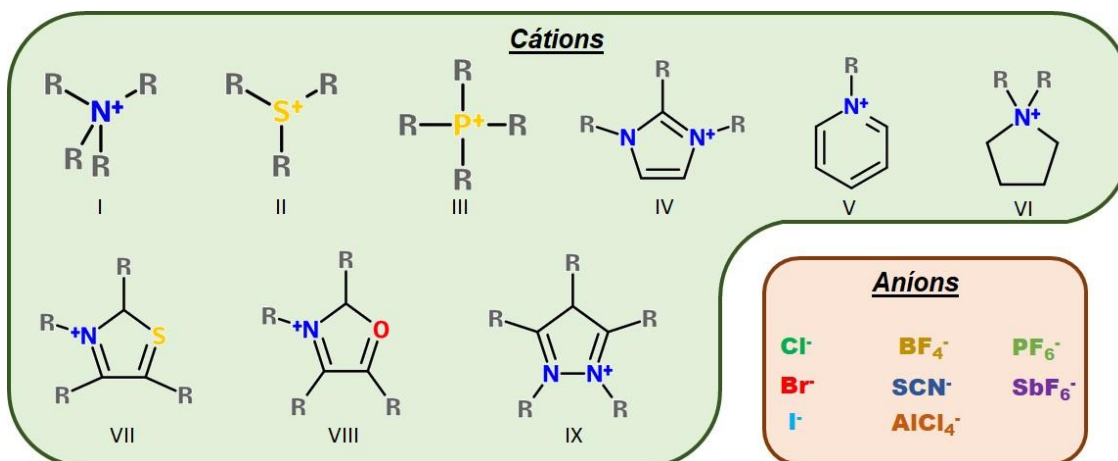
Como é possível verificar, o uso de micelas mistas é de grande importância para a extração/purificação de biomoléculas por melhorarem os parâmetros de extração, além de serem constituídas por compostos que apresentam um ambiente favorável para a molécula de interesse. Levando tais vantagens em consideração, um dos sistemas avaliados no presente trabalho empregou o surfactante não-iônico TX-114 e LI da família dos imidazólios como surfactantes iônicos.

2.3.5 Líquidos Iônicos

O campo de estudos com LI se iniciou com Paul Walden em 1914, quando reportou as propriedades físicas do nitrato de etilamônio ([EtNH₃]NO₃), um sal que se apresenta líquido, sem odor e com ponto de ebulição de 12°C (WALDEN, 1914; PLECHKOVA & SEDDON, 2008). LI são sais com ponto de

fusão abaixo de 100°C e compostos inteiramente por íons, ânions orgânicos ou inorgânicos e um cátion orgânico associado a um ou mais substituintes em sua cadeia alquílica. A **Figura 9** apresenta as principais famílias de LI.

Figura 9. Cátions (I – amônio; II – Sulfônio; III – Fosfônio; IV – Imidazólio; V – Piridino; VI – Pirrolidínio; VII – Tiazólio; VIII – Oxazólio; IX – Pirazólio) e alguns ânions (cloreto, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, brometo, tiocianato, ácido fluorantimônico, iodeto e tetracloroaluminato) que podem compor diferentes LI.



A classificação dos LI, geralmente, é baseada em sua estrutura química, apesar de um único LI poder ser classificado em diferentes categorias (devido a suas características estruturais de sais líquidos, surfactantes iônicos, cátions, ânions e seus grupos iônicos) sendo que a mais aceita são dois grandes grupos, os LI próticos (LIP) e os apróticos (LIA) (HAYES et al., 2015). LIP são preparados através de uma reação estequiométrica de certos ácidos e bases de Brønsted e o que os diferencia de outros LI é a transferência do próton do ácido para a base, gerando locais de doação/acepção de prótons, que são utilizados para formar uma corrente de ligações de hidrogênio; sendo utilizados como solventes para proteínas, biocatálise, antimicrobianos, detecção de endósporos bacterianos e eletrólitos não aquosos (GREAVES & DRUMMOND, 2008 e 2015). A preparação de LIA é mais custosa e complicada, geralmente envolvendo várias etapas. Isso se dá pelo fato de que os íons são formados por ligações covalentes entre dois grupos funcionais, o que leva a um solvente que é mais termo e eletroquimicamente estável que os LIP; geralmente são

utilizados como eletrólitos em baterias de lítio (ANGELL, C.A. et al., 2007; HAYES et al., 2015).

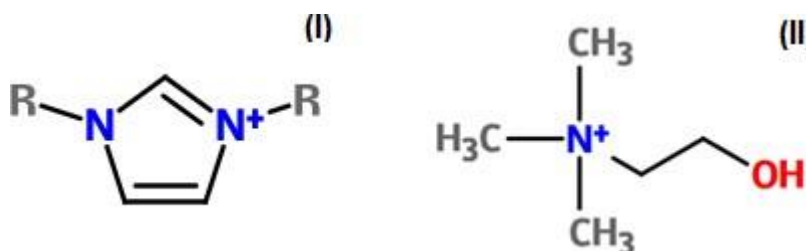
Algumas famílias de LI apresentam como características: **(a)** alta condutividade iônica; **(b)** alta condutividade térmica; **(c)** alta polaridade; **(d)** baixo ponto de fusão; **(e)** estabilidade térmica; **(f)** baixa pressão de vapor; **(g)** alta capacidade de solvatação; **(h)** grandes possibilidades de *design* relacionadas a sua propriedade devido a quantidade de cátions orgânicos e ânions orgânicos/inorgânicos que podem ser utilizados para sua preparação (GHANDI, 2014; SINGH et al., 2014; LEI et al., 2017). Além destas características, LI de algumas famílias apresentam a propriedade de auto-agregação quando apresentam cadeias alquílicas longas ($n > 8$) (BLESIC et al., 2007) e podem ser inseridos em SMDFA de surfactantes não-iônicos, o que pode acarretar em aumento (PRAMANIK et al., 2011; CHEN & BERMUDEZ, 2013) ou diminuição (BEHERA & PANDEY, 2009) da CMC da micela formada pelo surfactante não-iônico.

Os LI possuem grande gama de aplicação, podendo ser utilizados em cromatografia líquida (HE et al., 2003), como eletrólito para baterias (ISHIKAWA et al., 2006), células solares (WANG et al., 2003, 2004) e supercapacitores (TSAI et al., 2013), síntese orgânica (ZHAO et al., 2002; MIAO & CHAN, 2006) e inorgânica (FREUDENMANN et al., 2011), transferência de calor (VALKENBURG et al., 2005), dissolução de celulose (ZHU et al., 2006), extração de lignina (TAN et al., 2009), de proteínas (PEI et al., 2009), de tanino (CHOWDHURY et al., 2010), lubrificante (ZHOU et al., 2009), sistemas de duas fases aquosas para extração de diferentes tipos de moléculas (LI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2014; FLIEGER & CZAJKOWSKA-ZELAZKO, 2015; SANTOS et al., 2016), entre outras aplicações.

Neste trabalho, um estudo com duas famílias de LI foi relatizado. Os primeiros foram LI da família dos imidazólios, os quais são os mais estáveis, comuns e utilizados, de acordo com ZHENG e colaboradores (2014). LI da família dos imidazólios são formados pelo cátion orgânico imidazolato e por ânions orgânicos/inorgânicos (WANG & WANG, 2016; DICKINSON et al., 2016). Análises da relação entre a estrutura e a atividade de um LI típico da família dos imidazólios levou à suposição de que estes LI podem possuir propriedades de superfície ativa semelhante à dos surfactantes e, portanto,

permite que estes formem micelas em soluções aquosas; este fenômeno ocorre em cadeias alquílicas com mais de 8 carbonos (ŁUCZAK et al., 2008). Desta maneira, estes LI apresentam propriedade de solvatação, alta condutividade e estabilidade eletroquímica, fazendo com que sejam excelentes candidatos para uma grande gama de aplicações (NGO et al., 2000). A segunda família utilizada no presente trabalho foi a das colinas; LI desta família são formados por sais de amônia quaternários, também conhecidos como surfactantes catiônicos (PERNAK et al., 2007). LI desta família estão atraindo a atenção de diferentes áreas de pesquisa pois apresentam propriedades e características interessantes, como sua não-toxicidade e biodegradabilidade. Além disso, estão sendo aplicados extensivamente no campo da química verde e sustentável e em diferentes processos químicos (GADILOHAR & SHANKARLING, 2017). A **Figura 10** apresenta a estrutura química dos LI da família dos imidazólios e das colinas.

Figura 10. Estrutura química base dos LI da família dos imidazólios (I) e das colinas (II).



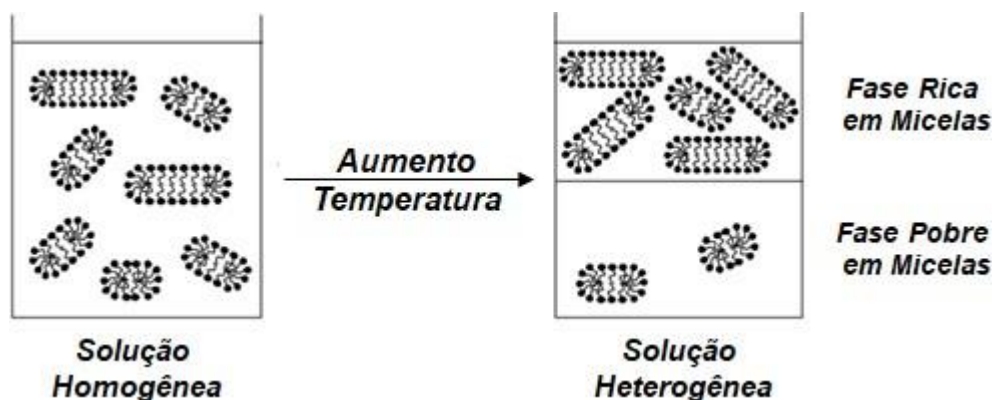
Fonte: Campetella, et al., 2015; Shimomura et al., 2017

2.3.6 Separação de Fases

A separação de fases nos SMDFA ocorre quando se tem a aplicação de um estímulo como, por exemplo, o aumento de temperatura (ASENJO & ANDREWS, 2012); nesta condição, há uma maior interação entre o aglomerado micelar através, principalmente, de interações intermicelares. Esse processo faz com que a solução fique turva, e temperaturas acima da temperatura de turvação denominada T_{cp} ou ponto de névoa (HUANG & GU, 1990) leva a formação espontânea de duas fases aquosas imiscíveis (sendo uma fase rica em micelas e outra pobre em micelas). A **Figura 11** mostra uma representação esquemática da separação de fases em SMDFA (SHOW et al.,

2015; GUTWOSKI et al., 2003). O valor da T_{cp} depende da estrutura e concentração do surfactante, bem como a presença de outros aditivos (VIDAL et al., 2012). Este processo é reversível se o sistema for resfriado em temperatura abaixo de seu T_{cp} .

Figura 11. Esquema de separação de fases de sistemas micelares de duas fases aquosas demonstrando o efeito do aumento de temperatura na separação do sistema em duas fases, sendo uma rica e outra pobre em micelas.



Fonte: Rangel-Yagui et al., 2004

A presença de um surfactante iônico faz com que ocorra um distúrbio no equilíbrio termodinâmico do sistema e a T_{cp} pode variar, ocorrendo um aumento no seu valor devido à repulsão das cargas do surfactante iônico (RODRIGUEZ-ESCONTRELA et al., 2016). Desta maneira, o uso de aditivos ou surfactantes iônicos nestes sistemas pode modificar tanto as interações intermicelares como as intramicelares por causa dos efeitos eletrostáticos (ALBERTSSON, 1986).

A influência de diferentes sais na T_{cp} já está bem descrita na literatura e, embora alguns sais reduzam a T_{cp} (SANTOS-EBINUMA et al., 2013c), outros a aumentam (VIDAL et al., 2012) devido a diferentes interações intra e intermicelares. Por outro lado, tais modificações nas interações não são exclusivamente induzidas por sais, elas também podem ser obtidas através da formação de micelas mistas como citado anteriormente. Em relação à adição de sais inorgânicos, o uso de diferentes LI e sua influência na T_{cp} dos SMDFA apresenta poucos relatos na literatura (VIDAL et al., 2012; BUTTERWORTH, 1984; SILVA et al., 2015).

2.3.7 Características dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Liu e colaboradores (2000) citaram algumas características e vantagens que os SMDFA apresentam em relação aos SAB e entre elas estão incluídas (a) a característica das micelas de se agregarem, permitindo controlar e otimizar o comportamento da partição através de variações nas condições de incubação do sistema, o que acarretará em diferentes tamanhos e formas micelares; (b) micelas são simultaneamente hidrofóbicas e hidrofílicas, permitindo uma maior seletividade das moléculas baseando-se em sua hidrofobicidade; (c) a seletividade da partição pode ser aumentada a se utilizar micelas mistas; (d) após o término da partição as micelas podem ser facilmente removidas de sua molécula de interesse (LIU et al., 1996).

2.3.8 Aplicação dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

O primeiro estudo da aplicação de SMDFA foi realizado por Bordier em 1981 na partição de proteínas utilizando soluções de TX-114 (BORDIER, 1981). Tal trabalho demonstrou que na análise das duas fases do sistema, as proteínas hidrofílicas particionaram para a fase pobre em micelas enquanto as proteínas hidrofóbicas particionaram para a fase rica em micelas. A partir deste trabalho, muitos outros surgiram.

Jaramillo e colaboradores (2013) utilizaram TX-114 e tampão sódio-fosfato para extrair a enzima pectinase produzida por *Aspergillus oryzae* (JARAMILLO et al., 2013). Amid e colaboradores (2015) utilizaram sistemas compostos por TX-100 e sorbitol para purificar a enzima pectinase produzida por *Psidium guajava* (goiabeira); além disso, também demonstraram a influência de diferentes parâmetros na partição e recuperação da enzima, como por exemplo o tipo e a concentração de surfactante utilizado e a razão de surfactante/sorbitol utilizado (AMID et al., 2015). Em 2016, Amid e colaboradores fizeram uso de Tween 80 e manitol para purificação da enzima poligalacturonase produzida por *Durio zibethinus Murry* (AMID et al., 2016). Rangel-Yagui e colaboradores (2004) verificaram a partição da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em sistemas compostos somente pelo surfactante não-iônico éter monodecílico de tetraetilenoglicol (C₁₀E₄) e compostos pela mistura de C₁₀E₄ e do surfactante catiônico brometo de deciltrimetilamônio (C₁₀TAB) (RANGEL-YAGUI et al., 2004).

Jozala e colaboradores (2008) realizaram a extração do antibiótico nisina produzido por *Lactobacillus lactis* utilizando SMDFA compostos por TX-114 (JOZALA et al., 2008). Mohd-Setapar e colaboradores (2014) publicaram uma revisão sobre recuperação de antibióticos utilizando-se sistemas de micelas reversa (MOHD-SETAPAR et al., 2014).

Sistemas micelares também foram utilizados para a extração de ácido clavulânico, um fármaco β -lactâmico utilizado em combinação com antibióticos para inibir resistência bacteriana. Silva e colaboradores (2015) utilizaram sistemas compostos por TX-100 e X-114 na presença e ausência de sulfato de dextran como primeira etapa de purificação de ácido clavulânico (SILVA et al., 2015).

Liu e colaboradores (1998) realizaram a purificação e concentração de proteínas e vírus utilizando sistemas compostos pelo surfactante não-iônico *n*-decil tetra (óxido de etileno) (LIU et al., 1998). Kamei e colaboradores (2002) demonstraram o padrão de partição do bacteriófago P22 e da proteína citocromo C em sistemas compostos pelo líquido iônico *n*-decil tetra (óxido de etileno), gerando uma nova teoria de como este fenômeno ocorre (KAMEI et al., 2002). Mashayekhi e colaboradores (2010) demonstraram a combinação de um sistema micelar composto por TX-114 e tampão fosfato-salino (PBS) com um imunoenensaio de fluxo lateral para melhorar os limites de detecção do bacteriófago M13 (MASHAYEKHI et al., 2010).

Tong e colaboradores (1998) fizeram o uso de sistemas misturando o surfactante catiônico brometo de dodeciltrietilamônio e o surfactante aniônico dodecilsulfato de sódio, em diferentes concentrações e razões molares para extração de porfirinas e metaloporfirinas (TONG et al., 1998).

Sistemas compostos por TX-114 e PBS também foram utilizados para particionar fragmentos de DNA, como uma etapa de purificação antes de ensaios de detecção, o que poderia facilitar a descoberta precoce de algumas doenças, como por exemplo câncer (MASHAYEKI et al., 2009).

Justificativa

No setor industrial moderno, em todas as suas áreas e, também, devido a uma maior conscientização por parte da população, há uma busca pela substituição de colorantes sintéticos por aqueles de origem natural, além da criação/inação de novas metodologias que sejam mais baratas, acessíveis, voltadas para a química verde, e que tenham melhor desempenho na extração e/ou purificação de tais biomoléculas.

Diante destes aspectos, autores demonstram a importância e a ampla escala de aplicação de colorantes naturais na indústria (ABEROUMAND, 2011; RYMBAL et al., 2011; LOPES et al., 2013; SHAHID et al., 2013; AKILANDESWARI & PRADEEP, 2015; YUSUF et al., 2017), enquanto outros apresentam a importância do desenvolvimento, uso e futuro de novas técnicas de recuperação, extração e/ou purificação de biomoléculas, como os SAB (BENAVIDES & RITO-PALOMARES, 2008; ROSA et al., 2010; ROSA et al., 2011; SHOW et al., 2015; IQBAL et al., 2016; PATEL et al., 2018).

Tendo em vista a necessidade de novas metodologias de extração de biomoléculas e a busca por novas fontes e/ou moléculas de colorantes naturais, este projeto visou a busca por métodos de extração para otimizar o *downstream* para colorantes naturais através do uso de SMDFA baseados em LI.

Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Extrair o corante vermelho produzido pelo fungo filamentoso *Talaromyces amestolkiae* utilizando extração líquido-líquido em sistemas micelares de duas fases aquosas e caracterizar quimicamente os colorantes utilizando-se técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

4.2. Objetivos Específicos

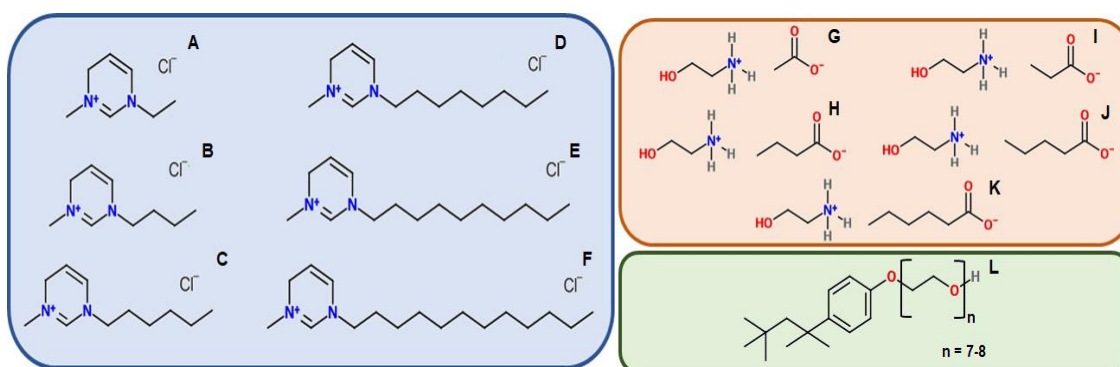
- Identificar estruturas químicas de colorantes naturais;
- Determinar a estabilidade do corante vermelho produzido por *T. amestolkiae* na presença de diferentes compostos;
- Construção das curvas binodais para os sistemas avaliados;
- Extrair os colorantes com sistemas micelares de duas fases aquosas com líquidos iônicos da família dos imidazólios como co-surfactantes;
- Extrair os colorantes com sistemas micelares de duas fases aquosas com líquidos iônicos da família das colinas como adjuvantes.

Materiais e Métodos

5.1. Materiais

O surfactante não-iônico (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietileno glicol (TX-114) foi adquirido da Merck®. Os LI da família dos imidazólios cloreto de 1-etil-3-metilimidazol ([C₂mim]Cl), cloreto de 1-butil-3-metilimidazol ([C₄mim]Cl), cloreto de 1-hexil-3-metilimidazol ([C₆mim]Cl), cloreto de 1-octil-3-metilimidazol ([C₈mim]Cl), cloreto de 1-decil-3-metilimidazol ([C₁₀mim]Cl) e cloreto de 1-dodecil-3-metilimidazol ([C₁₂mim]Cl) foram doados pela Ionic Liquids Technology (IoLiTec, Heilbronn, Alemanha). Os LI acetato de colina ([Ch][Ac]), propanoato de colina ([Ch][Prop]), butanoato de colina ([Ch][But]), pentanoato de colina ([Ch][Pent]) e hexanoato de colina ([Ch][Hex]) foram sintetizados na usina do prédio da Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara. Para tanto, empregou-se hidróxido de colina ([Ch]OH) e os ácidos acético (≥ 99,7%), butírico (≥ 99,0%), propiônico (≥ 99,5%), valérico (≥ 99,0%) e hexanoico (≥ 99,0%) adquiridos da Sigma-Aldrich®. Nos ensaios de extração, empregou-se o tampão McIlvaine pH 6,5 composto de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) (0,2M) e ácido cítrico (C₆H₈O₇) (0,1M) adquiridos da Sigma-Aldrich®. A **Figura 12** apresenta a estrutura química dos LI empregados no presente trabalho.

Figura 12. Estruturas químicas dos LI da família dos imidazólios ([C₂mim]Cl (A), [C₄mim]Cl (B), [C₆mim]Cl (C), [C₈mim]Cl (D), [C₁₀mim]Cl (E) e [C₁₂mim]Cl (F) e das colinas ([Ch]Cl (G), [Ch][Ac] (I), [Ch][But] (H), [Ch][Prop] (J) e [Ch][Hex] (K)) e do surfactante não-iônico TX-114 (L).



Para os ensaios de extração líquido-líquido com solventes orgânicos, foram utilizados os solventes hexano (≥ 98,5%), acetato de etila (≥ 99,5%) adquiridos da Synth®.

Os solventes orgânicos utilizados para análises em HPLC e UPLC foram acetonitrila ($\geq 99,9\%$) e metanol ($\geq 99,9\%$) grau HPLC adquiridos da Merck® e ácido fórmico ($\geq 98,0\%$) adquirido da Sigma-Aldrich®. Para as análises em espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) foram utilizados os solventes óxido de deutério (D_2O) (99,9%) e deuterometanol (CD_3OD) adquiridos da Sigma-Aldrich®. Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. Para a limpeza das vidrarias utilizou-se solução 1M de ácido nítrico e em seguida solução alcoólica 50% de hidróxido de sódio 1M, ao final enxaguou-se com água deionizada e as vidrarias foram secas.

5.2. Microrganismo, Cultivo Submerso e Composição do Meio

O fungo *T. amestolkiae* foi cedido pela Coleção de Culturas da Universidade Federal do Amazonas, AM, Brasil. A cultura foi reativada em agar Czapeck (CYA) e mantida a 25 °C por sete dias e após este período conservada em geladeira a 4 °C.

O inóculo foi preparado em placas de Petri (90 x15 mm) contendo o meio Ágar batata dextrose (39,0 g/L) suplementado com extrato de levedura (5,0 g/L) e mantido a 30 °C durante 7 dias para crescimento da colônia.

O primeiro cultivo submerso (**A**) foi realizado com 10 discos de micélio (8 mm de diâmetro) do inóculo que foram transferidos para 100 mL do meio de cultivo em frasco tipo Erlenmeyer de 500 mL. O meio foi composto por glicose (20 g/L), peptona de carne (10 g/L) e extrato de carne (3 g/L). O pH do meio foi ajustado para 7,9 com hidróxido de sódio (NaOH) (1,0 M) e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

O segundo cultivo submerso (**B**) foi realizado com 30 discos de micélio (8 mm de diâmetro) do inóculo os quais foram transferidos para 100 mL do meio de cultivo em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL. O meio de cultivo submerso foi composto por glutamato de sódio (25 g/L), glicose (10 g/L), sulfato de ferro ($FeSO_4$) (10 mg/L), cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (15 mg/L) e sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (12 mg/L). A solução de glutamato de sódio foi preparada separada da solução de sais e glicose. A solução de glicose e sais (50 mL) foi adicionada nos frascos tipo Erlenmeyers e autoclavada a 121 °C por 15 minutos; o mesmo procedimento foi realizado para a solução de glutamato de sódio, porém, em frasco reagente graduado. Antes da adição dos

discos de micélio, 50 mL da solução de glutamato de sódio esterilizada foi transferida para os frascos tipo Erlenmeyers que já continha a solução de glicose e sais.

Ambos os cultivos submersos foram conduzidos em agitador orbital a 30°C, 150 rpm por 7 dias. Ao fim do processo de fermentação, o meio fermentado foi filtrado com papel filtro 80 g/m² (Whatman, UK). O meio filtrado foi empregado nos ensaios de caracterização dos colorantes naturais e extração dos colorantes naturais do meio de cultura.

5.3. Síntese de Líquidos Iônicos da Família das Colinas

Os passos descritos a seguir foram empregados para a síntese dos LI da família das colinas, nomeadamente, [Ch][Ac], [Ch][Prop], [Ch][But], [Ch][Pent] e [Ch][Hex]. Primeiramente, adicionou-se uma barra magnética (5 mm x 15 mm) dentro de um balão volumétrico de 250 mL, em seguida vedou-se a boca deste balão com um septo de borracha. Encheu-se uma bexiga com nitrogênio e a conectou no balão para que se criasse uma atmosfera de nitrogênio dentro deste. Com o balão já preparado, adicionou-se o equivalente a 1 M de [Ch]OH; levou-se o balão para banho de gelo e iniciou-se a agitação. Em seguida, adicionou-se, gota a gota, 1,1 M do ácido desejado para a síntese. O balão ficou em banho de gelo até que a temperatura reacional estive próxima a 0 °C, após essa etapa, retirou-se o banho de gelo. A mistura permaneceu em agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se limpeza do líquido iônico com acetato de etila (AcOEt), para remoção de impurezas e água. Acetato de etila e água foram removidos em rotaevaporador (Heidolph, HEI-VAP Precision), a 60 °C e 150 rpm, até total remoção da água.

Para confirmação da estrutura e da pureza dos LI sintetizados, amostras dos LI sintetizados foram diluídas em água deuterada (2 mg/700 µL) e analisadas por RMN (Espectrômetro Bruker 300 Fourier (7,1T), sonda Easy Probe Dul 300 MHz S1 5 mm z Gradient) de hidrogênio (¹H). As **Figuras S1 a S5 do Material Suplementar** apresentam os espectros RMN de ¹H e a estrutura química dos LI sintetizados.

5.4. Caracterização Química do Colorante Vermelho Produzido por *T. amestolkiae*

5.4.1. Solubilidade do Meio Fermentado

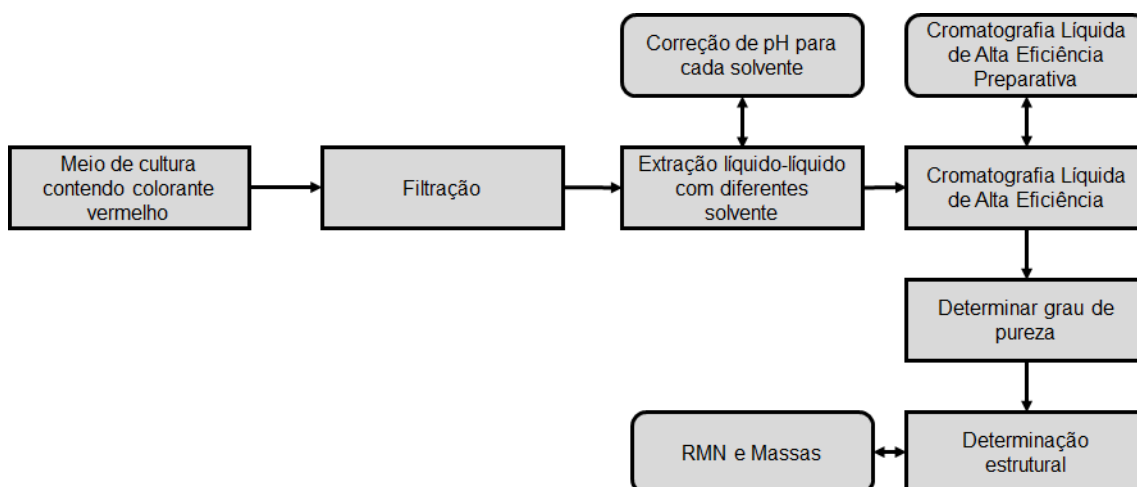
Para o ensaio de solubilidade do meio fermentado (**A**) produzido por *T. amestolkiae*, 100 mL do meio foram liofilizados (Alpha 1-2 LDplus, Christ®). Em seguida, 1 mg do meio liofilizado foi adicionado a 1 mL de diferentes solventes (**Tabela 1**) e homogeneizados durante 15 segundos para se verificar a ocorrência ou não da solubilização do meio.

Tabela 1. Solventes utilizados para o ensaio de solubilidade do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Solvente
2-propanol
acetato de etila
acetona
ácido clorídrico 5%
ácido fórmico
ácido nítrico 65%
água
benzeno
butanol
diclorometano
dimetilsufóxido
etanol
éter etílico
etilenoglicol
formaldeído
hexano
hidróxido de amônio 30%
isopropanol
metanol
<i>N,N</i> -dimetilformamida
toluol

Após a etapa de verificação da solubilidade do meio fermentado em diferentes solventes orgânicos, a caracterização da molécula do colorante vermelho deu-se conforme o fluxograma apresentado na **Figura 13**.

Figura 13. Processo de *downstream* para obtenção do corante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae*.



5.4.2. Partição Líquido-Líquido

A partição foi realizada em um funil de separação de 250 mL, onde inicialmente foram adicionados 50 mL do meio fermentado contendo o corante vermelho e o solvente orgânico hexano (50 mL/3 etapas), para a remoção de substâncias apolares. Juntou-se toda a fração hexânica utilizada na partição e o solvente foi evaporado em rotaevaporador (Heidolph Hei-VAP Advantage) a 35 °C, 150 rpm e 250 bar, para a obtenção do extrato seco de hexano.

Após a extração com hexano, corrigiu-se o pH do meio para 3,0 com solução de HCl 3 M. Prosseguiu-se com nova partição, em funil de separação, utilizando-se AcOEt (50 mL/3 vezes). Juntou-se todo o AcOEt utilizado na partição e este foi evaporado em rotaevaporador (Heidolph Hei-VAP Advantage) a 40 °C, 150 rpm e 250 bar, para a obtenção do extrato seco de AcOEt.

5.4.3. Cromatografia em Camada Delgada

Soluções de 1 mg/mL da fração de AcOEt foram preparadas e aplicadas, com ajuda de uma seringa, em placas de sílica gel (0,25 mm de espessura). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (2,9:6,1:1). O volume de aplicação foi de 10 µL. Não foi necessário o uso de revelador para verificar-se a presença de manchas.

5.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) Analítica

O extrato bruto de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* foi primeiramente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em modo analítico. A análise foi realizada em equipamento Shimadzu, injetor manual, equipado com uma controladora CBM-20A, uma bomba LC 20AD xr, detector DAD-SPD M20A, degaseificador DGU-20Asr. A separação dos compostos foi realizada em coluna cromatográfica Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da Thermo Scientific. O volume de amostra injetado foi de 20 µL, a vazão da fase móvel foi de 1 mL/min. A fase móvel utilizada foi água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (Fase B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente: 5 a 95% de B em 28 minutos e 95% a 5% de B em 33 minutos. O monitoramento dos compostos foi realizado nos comprimentos de onda de 280 e 500 nm.

5.4.5. Separação dos Picos Majoritários

Para a separação dos picos majoritários obtidos no ensaio anterior utilizou-se CLAE-UV em modo preparativo em equipamento Shimadzu, equipado com uma controladora CBM-20A, duas bombas LC-6AD e injetor de amostra manual de seis pórticos Rheodyne, detector UV-Vis SPD-20A, degaseificador DGU-20A5 e coletor automático de frações. Utilizou-se também uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 9,4 mm, 5 µm) da Agilent. O volume de amostra injetado na coluna foi de 200 µL e a vazão da fase móvel foi de 4 mL/min. A fase móvel utilizada foi água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente: 30 a 100% de B em 15 minutos e 100% de B até 25 minutos, em seguida as condições iniciais foram restabelecidas com 30% de solvente B. O tempo total de análise foi de 31 minutos. O monitoramento dos compostos foi realizado nos comprimentos de onda de 280 e 500 nm.

5.4.6. Análise das Substâncias Purificadas por Espectrometria de Massas

As soluções correspondentes aos picos coletados na purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em modo preparativo foram secos com

auxílio de um cooler e solubilizados em 1,0 mL de metanol (grau HPLV) obtendo-se uma concentração de 1,0 g/L. A solução estoque foi diluída para obter uma concentração final de 10 µg/mL e, posteriormente, analisada por espectrometria de massas via inserção direta (EM-ID) em espectrômetro de massas (EM) quadrupolo *tandem* Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, Estados Unidos), equipado com uma fonte de ionização Z-spray (electrospray ionization – ESI) operando em modo positivo e negativo de análise. Cerca de 5 µL de amostra foram injetadas dentro da fonte de ionização Z-spray em modo de análise Full-Scan. A faixa de massas analisada foi de 150 a 1300 unidades de massa (u).

Os picos também foram analisados pela técnica hifenada CLAE-DAD-EM. Um volume de 5 µL da amostra na concentração de 100 µg/mL foi injetado em coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm, 5 µm) da Agilent. A fase móvel utilizada foi água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B). A eluição dos compostos foi realizada em fluxo de 500 µL/min em modo gradiente de 30 a 90% de B em 25 minutos, mantendo-se em 90% por 5 minutos; em seguida, as condições iniciais foram reestabelecidas. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar = 3,2 kV em modo positivo e 2,5 kV em modo negativo, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte Z-spray = 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 700 L/h. A faixa de massas monitorada no modo de análise Full-Scan foi de 150 a 1200 u. Os perfis cromatográficos foram monitorados em uma faixa de comprimentos de onda no DAD de 220-600 nm. Os experimentos de espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) foram realizados por dissociação induzida por colisão (DIC) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ([M + H]⁺).

5.4.7. Ressonância Magnética Nuclear

Espectrometria de RMN de ¹H e ¹³C de correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC) foram realizadas. As análises foram realizadas em Espectrômetro Bruker Avance III HD 600, com sonda de 5 mm BBFO Plus, com detecção direta. O solvente utilizado para análise foi deuterometanol. A concentração de amostra analisada foi de 2 mg/ 200 µL.

5.5. Estabilidade do Colorante Natural Vermelho

Inicialmente, avaliou-se a estabilidade dos colorantes vermelhos produzidos por *T. amestolkiae* variando a temperatura de incubação (25, 35, 45, 55 e 65 °C). Nestes ensaios, o meio fermentado foi colocado em banho termostaticado (Ethiktechnology, SP, Brasil) na temperatura desejada desde o início do experimento.

Posteriormente, estudou-se a estabilidade dos colorantes vermelhos produzidos por *T. amestolkiae* na presença de diferentes concentrações do surfactante TX-114 (1-15% m/m) e dos LI da família dos imidazólios, [C₂mim]Cl, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl e [C₁₀mim]Cl e da família das colinas, [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex]. Para os ensaios na presença de TX-114, as concentrações finais foram calculadas em relação ao volume final do sistema que foi de 4 mL e incubados a 10 °C para garantir que não houvesse separação de fases. Para os ensaios de estabilidade com os diferentes LI empregou-se uma solução mãe para cada LI (3 M), a qual foi diluída para a molaridade final desejada no sistema (0,1, 0,5 e 1,0 M). Estes ensaios também foram realizados a 10°C.

Em todos os ensaios foram retirados pontos após 0, 3, 6, 9, 24, 48 e 120 h de incubação. Calculou-se a absorvância relativa (%Abs_{rel}) empregando a **Equação 1**.

$$\% \text{Abs}_{\text{rel}} = \frac{\text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} * 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde Abs_{inicial} e Abs_{final} referem-se a absorvância do colorante vermelho no início do ensaio (0 horas) e sua absorvância ao final do ensaio.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e determinou-se a absorvância dos colorantes conforme metodologia descrita no item 5.6.1.

5.6. Metodologias Analíticas

5.6.1. Análise dos Colorantes Vermelhos

A concentração de colorantes vermelhos foi estimada pela leitura da absorvância a 490 nm, que corresponde à máxima absorvância para os colorantes vermelhos (JOHNS & STUART, 1991), em leitor de placa UV-Vis

(Multimode Plate Reader Enspire – PerkinElmer). O resultado foi expresso em termos de Unidade de Absorbância (UA_{490nm}). Foram realizadas também varreduras das amostras (230-650 nm) para confirmar a presença da banda com máximo de absorbância a 490 nm, no espectro visível (**Figura S6 do Material Suplementar**).

Nos ensaios de extração dos colorantes vermelhos do meio fermentado de *T. amestolkiae* empregando SMDFA, as absorbâncias das fases superior e inferior contendo as amostras foram lidas contra o valor do branco, composto por ambas as fases de um sistema de partição preparado nas mesmas condições, onde a única diferença é a ausência de colorante, objetivando a eliminação de alguma influência com origem na presença do LI, TX-114 ou do tampão.

Para os ensaios de caracterização química do colorante vermelho, como houve modificações na composição do meio de cultivo submerso, novas varreduras (330-650 nm) foram realizadas para se confirmar a faixa de absorção do colorante vermelho; portanto, para estes ensaios considerou-se a banda com máximo de absorbância para o colorante vermelho a 500 nm, no espectro visível (**Figura S7 do Material Suplementar**).

5.7. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

5.7.1. Construção e Caracterização das Curvas Binodais

A construção e caracterização das curvas binodais para os sistemas utilizados para a extração do colorante do meio fermentado foi realizada através do método de *cloud-point* (ponto de névoa) (LIU et al., 1996), onde a temperatura em que ocorre a separação das fases é conhecido como ponto de névoa (GU & GALERA-GÓMEZ, 1995).

Foram construídas curvas binodais para sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114 (1-15% m/m) e diferentes concentrações de LI da família dos imidazólios (0,1-0,5% m/m) e das colinas (0,05 M, 0,1 M e 0,5 M) e também na presença e ausência do meio fermentado contendo o colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*. Os sistemas com LI da família dos imidazólios foram preparados com tampão McIlvaine pH 6,5 e os com LI da família das colinas em água.

Os ensaios foram realizados em tubos de vidro graduados (15 mL) com volume total de 5 mL, que foram homogeneizados por 1 hora em homogeneizador rotativo (Homogeneizador de Amostras NH2200 – Norte Científica) e em seguida foram colocados em banho termoregulado com temperatura inicial de 10 °C. Aumentou-se a temperatura do banho de 0,1 em 0,1 °C até que fosse obtida a T_{cp} . A relação entre a concentração de TX-114 e a temperatura de *cloud point* gerou a curva binodal para cada um dos sistemas, que foram plotados no software Microsoft Excel 2017®. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas para obtenção dos desvios padrões.

5.7.2. Estudo da Extração de Colorantes Naturais Vermelhos com Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Todos os sistemas foram preparados em tubos graduados de vidro de 15 mL com o surfactante não-iônico TX-114, LI da família das colinas ou dos imidazólios, como será especificado a seguir, tampão McIlvaine pH 6,5 ou água e o meio fermentado contendo o colorante vermelho em volume tal que a absorbância final fosse de 0,8 Unidades de Absorbância (UA) (a 490 nm), para que erros associados a quantificação fossem reduzidos. Todos os componentes foram adicionados por pesagem para massa final de 5,0 g.

5.7.2.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas sem Líquidos Iônicos

Os SMDFA foram compostos por TX-114 nas concentrações de 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 % (m/m), meio fermentado contendo o colorante vermelho e tampão McIlvaine pH 6,5 para uma massa final de 5,0 g. Os sistemas foram homogeneizados em agitador (Homogeneizador de Amostras NH2200 – Norte Científica) por 1 hora a 10 rpm e deixados em banho termoregulado, em temperatura determinada através das curvas binodais, por 24 horas para separação e equilíbrio das fases. Após as 24 horas, as fases superior (*top*) e inferior (*bottom*), de cada sistema, foram coletadas cuidadosamente com ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro a fim de se determinar a absorbância das mesmas (item 5.8.1). As temperaturas empregadas para separação das fases estão apresentadas na **Tabela S1 Material Suplementar**.

5.7.2.2. *Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Com Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios*

Para os SMDFA compostos por LI da família dos imidazólios utilizou-se o surfactante não-iônico TX-114 nas concentrações de 3,5, 7, 9, 11, 13 e 15% (m/m), os LI, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl nas concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5% (m/m), meio fermentado contendo o colorante vermelho e tampão McIlvaine pH 6,5 para uma massa final de 5,0 g. Os sistemas foram homogeneizados em agitador orbital (Homogeneizador de Amostras NH2200 – Norte Científica) por 1 hora a 10 rpm e deixados em banho-maria, em temperatura determinada através das curvas binodais, por 24 horas para separação e equilíbrio de fases. Após as 24 horas, as fases superior (*top*) e inferior (*bottom*), de cada sistema foram coletadas cuidadosamente com ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro a fim de se determinar a absorvância das mesmas (item 5.8.1). As temperaturas empregadas para separação das fases estão apresentadas nas **Tabelas S2-4 do Material Suplementar**.

5.7.2.3. *Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Com Líquidos Iônicos da Família das Colinas*

Para os SMDFA compostos por LI da família das colinas utilizou-se o surfactante não-iônico TX-114 nas concentrações de 1, 5, 9 e 13% (m/m), os LI, [Ch][Pent] e [Ch][Hex] para concentrações finais de 0,05, 0,1 e 0,5 M, meio fermentado contendo o colorante vermelho e água para uma massa final de 5,0 g. Os sistemas foram homogeneizados em agitador orbital (Homogeneizador de Amostras NH2200 – Norte Científica) por 1 hora a 10 rpm e deixados em banho termoregulado, em temperatura determinada através das curvas binodais, por 3 horas para separação e equilíbrio das fases. Em seguida os sistemas foram centrifugados por 2 minutos a 112 g (Sorvall RT Legend). As fases superior e inferior, de cada sistema foram coletadas cuidadosamente com ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro. A quantificação do colorante foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 5.8.1. As temperaturas empregadas para separação das fases estão apresentadas nas **Tabelas S5-6 do Material Suplementar**.

5.8 Parâmetros de Extração

Os parâmetros de extração avaliados foram coeficiente de partição do colorante (K) baseado na razão entre a absorvância do colorante na fase *bottom* e *top*, como demonstrado na **Equação 2**.

$$K = \frac{Abs_{bottom}}{Abs_{top}} \quad \text{Eq. 2}$$

onde Abs_{bottom} refere-se a absorvância do colorante na fase inferior do sistema (rica em micelas) e Abs_{top} refere-se a absorvância do colorante na fase superior do sistema (pobre em micelas).

Calculou-se a Eficiência da extração na fase *bottom* – rica em micelas (EE (%)), como demonstrado na **Equação 3**.

$$\%EE = \frac{Abs_{bottom} \cdot V_{bottom}}{Abs_{bottom} \cdot V_{bottom} + Abs_{top} \cdot V_{top}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

onde Abs_{bottom} e V_{bottom} referem-se a absorvância do colorante e o volume da fase inferior do sistema, respectivamente, enquanto Abs_{top} e V_{top} referem-se a absorvância do colorante e ao volume da fase superior do sistema, respectivamente.

Também se calculou o Balanço de Massa (BM) para cada sistema, empregando a **Equação 4**.

$$BM = \frac{Abs_{inicial} \cdot V_{inicial}}{Abs_{bottom} \cdot V_{bottom} + Abs_{top} \cdot V_{top}} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

onde $Abs_{inicial}$ e $V_{inicial}$ referem-se a absorvância e ao volume inicial dos sistemas, respectivamente.

A razão entre os volumes (R) das fases *top* e *bottom* também foi calculada de acordo com a **Equação 5**.

$$R = \frac{V_{top}}{V_{bottom}} \quad \text{Eq. 5}$$

onde V_{bottom} e V_{top} referem-se aos volumes da fase *bottom* e *top*, respectivamente.

Resultados e Discussão

6.1. Caracterização do Colorante Vermelho Produzido por *T. amestolkiae*

6.1.1. Solubilidade do Colorante Vermelho em Diferentes Solventes

Antes de realizar-se a extração líquido-líquido do meio fermentado para obtenção do colorante vermelho, realizou-se um ensaio inicial com diferentes solventes orgânicos para se verificar a solubilidade do meio fermentado. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na **Tabela 2** e na **Figura S7 do Material Suplementar**.

Tabela 2. Solubilidade do meio fermentado liofilizado produzido por *T. amestolkiae* em diferentes solventes.

Solvente	Solúvel?
2-propanol	Não
acetato de Etila	Não
acetona	Não
ácido Clorídrico 5%	Parcial
ácido Fórmico	Sim
ácido Nítrico 65%*	Sim
água	Sim
benzeno	Não
butanol	Não
diclorometano	Não
dimetilsufóxido	Parcial
etanol	Sim
éter Etilico	Não
etilenoglicol	Parcial
formaldeído	Sim
hexano	Não
hidróxido de amônio 30%	Sim
isopropanol	Não
metanol	Parcial
<i>N,N</i> -dimetilformamida	Parcial
toluol	Não

*Ácido Nítrico 65% - Alteração na cor para amarelo

Como pode-se verificar na **Tabela 2**, o meio fermentado liofilizado apresentou baixa solubilidade, sendo insolúvel na maioria dos solventes utilizados. Em outros, era parcialmente solúvel, como no caso do metanol e *N,N*-dimetilformamida. Na minoria dos solventes testados, o meio fermentado foi totalmente solúvel. Porém, o ácido nítrico 65% merece destaque, pois, apesar de o meio ser completamente solúvel neste solvente, o ácido causou alteração da cor característica, fazendo-o passar de vermelho para amarelo. A

escolha dos solventes para a partição líquido-líquido com solventes orgânicos foi baseada tanto nos resultados apresentados na **Tabela 2**, como na literatura.

6.1.2. Extração com Solvente Orgânico e Análise das Fases obtidas por Cromatografia em Camada Delgada

Através da busca de metodologias de extração de colorantes vermelhos na literatura, a extração líquido-líquido foi realizada com hexano e acetato de etila. A **Figura 14** mostra as partições realizadas com acetato de etila. Venkatachalam e colaboradores (2018), utilizaram solventes de diferentes polaridades para separar os colorantes do meio fermentado produzido por *Talaromyces albobiverticillius* 30548 e verificaram que o solvente acetato de etila foi o que apresentou os melhores resultados para extração do colorante vermelho (VENKATACHALAM et al., 2018). Jayakrishnan e Benjamin (2016) realizaram a extração de metabólitos de *Purpureocillium lilacinum* BP13 ajustando o pH do meio fermentado para 3,0 e realizando a extração com acetato de etila, o que levou a identificação do composto flavoglaucina (JAYAKRISHNAN & BENJAMIN, 2016). O solvente orgânico acetato de etila foi escolhido para a extração do colorante vermelho do meio fermentado pois após a acidificação do meio fermentado, a molécula, está na sua forma não-ionizada e tornou-se mais solúvel neste solvente quando comparado a outros estudados pois a molécula apresenta dois grupos de ácido carboxílico, que são ionizáveis em meio básico.

Figura 14. Extração líquido-líquido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* utilizando o solvente orgânico acetato de etila. Adicionaram-se 50 mL de acetato de etila para 50 mL de meio fermentado, em três etapas (etapa **A**, etapa **B** e etapa **C**), para extrair o máximo possível de colorante do meio fermentado.



O extrato de acetato de etila foi seco em rotaevaporador e, em seguida, preparou-se uma solução aquosa de 2 mg/mL que foi aplicada em uma placa de sílica gel para verificar o perfil cromatográfico desta amostra. Como é possível verificar na **Figura 15**, duas manchas (uma vermelha e outra roxa) apareceram, indicando que o extrato de acetato de etila possuía duas moléculas de colorantes distintas. Os dados obtidos por CCD foram importantes para a etapa de CLAE-DAD.

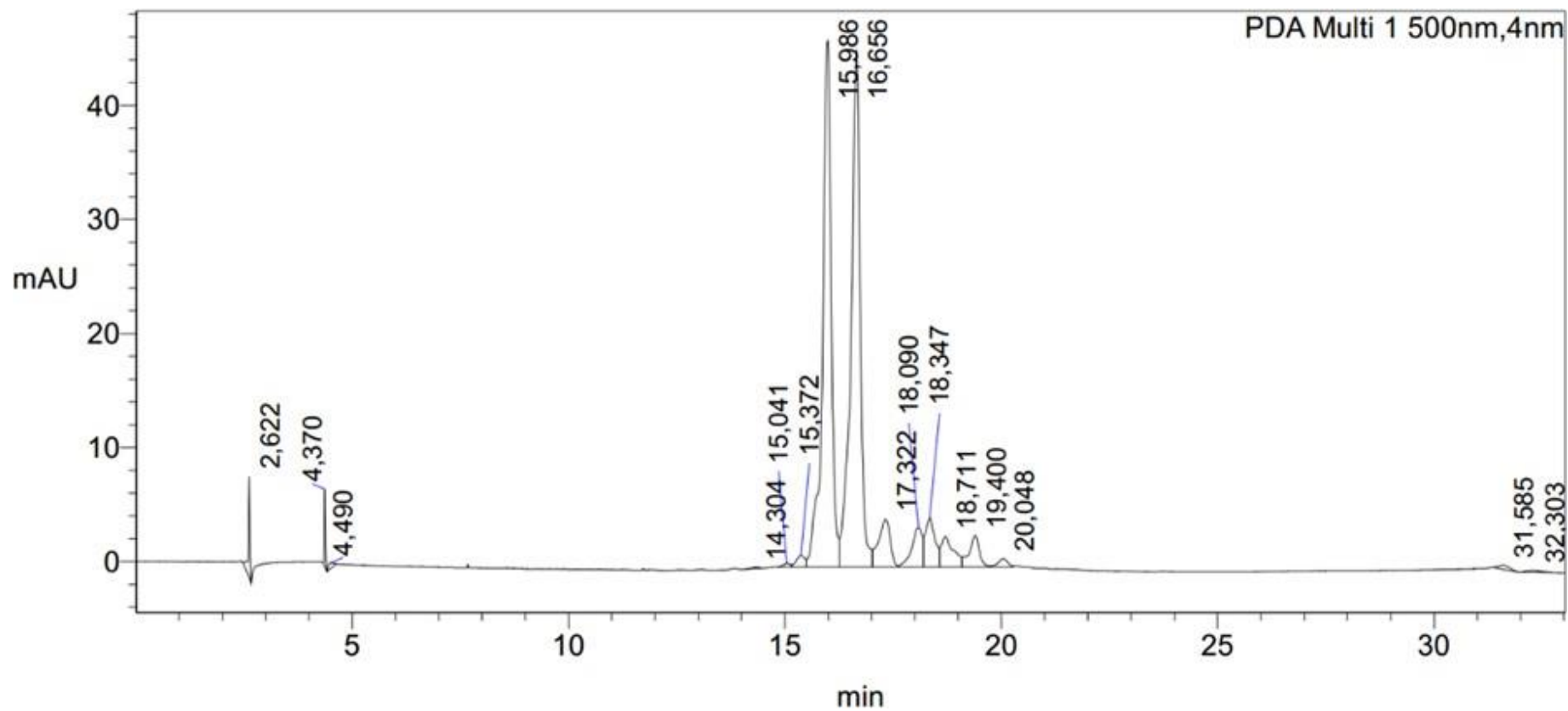
Figura 15. Cromatoplaça (sílica gel, 025 mm) do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*, indicando a presença de duas substâncias colorantes. Fase móvel: tolueno: acetato de etila:ácido fórmico (2,9:6,1:1). Visualização sob luz visível.



6.1.3. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Ressonância Magnética Nuclear

Com os resultados obtidos pela CCD, partiu-se para a análise do extrato de acetato de etila por CLAE-DAD para determinar qual a melhor condição de separação dos picos de interesse em menor tempo. Os picos majoritários apresentaram tempos de retenção (t_R) 15,98 e 16,65 min, o que torna o método rápido e com baixo gasto de solventes. Na **Figura 16** é possível verificar a presença de outras substâncias no extrato acetato de etila.

Figura 16. Cromatograma do extrato de acetato de etila do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Análise em CLAE-DAD em coluna Hypersil C18 (250 x 4 mm, 5 µm), modo gradiente com água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (Fase A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B) 5 a 95% de B em 28 minutos e 95% a 5% de B em 33 minutos; vazão de 1mL/min; volume de injeção 20 µL.



Após a otimização das condições de separação em modo analítico, o extrato acetato de etila foi injetado em CLAE-DAD em modo preparativo para a coleta dos picos de interesse e, como pode-se observar na **Figura 17**, os picos coletados foram nomeados de Subfração 3 ($t_r = 15,9$ minutos) e 4 ($t_r = 16,6$ minutos), respectivamente, e apresentaram coloração similar às bandas obtidas por CCD, indicando que os picos majoritários correspondem às bandas observadas em CCD.

Figura 17. Subfrações 3 (vermelha) e 4 (roxa) obtidas do extrato de acetato de etila, do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* por CLAE-UV/Vis em modo preparativo.



As subfrações 3 e 4 foram analisadas, novamente, em CLAE-DAD a 500 nm para verificar o grau de pureza de cada uma e foi possível verificar que cada subfração apresentava um grau de pureza de aproximadamente 90%. A porcentagem de pureza de um pico em CLAE-UV é calculada através da relação entre a sua área e a somatória das áreas de todos os picos em determinado comprimento de onda.

Ambas as subfrações foram analisadas por CLAE-DAD-MS e os espectros de massas obtidos em modo negativo (**Figura S8 e S9 do Material Suplementar**) apresentaram pico base com valor de m/z de 496 e um pico com valor de m/z de 540, indicando que estas subfrações possivelmente são isômeros. Além disso, na análise por UV-Vis foi possível verificar que as subfrações apresentam um espectro parecido (**Figura S10 e S11 do Material Suplementar**), com um pico de absorção em 231 e outro em 431 nm, porém, a

subfração 3 apresenta uma banda em 515 nm e a subfração 4 uma banda de 544 nm.

Após estas análises, as subfrações foram secas por secagem convectiva e obteve-se um pó vermelho e outro roxo. Estas amostras foram diluídas em deuterometanol para análise por RMN. Os dados obtidos para a subfração 4 estão presentes na **Tabela 3** e nas **Figuras S12 e S13 do Material Suplementar**. Não foi possível obter os espectros de RMN para a subfração 3 pois esta não possuía massa suficiente para estas análises. A substância semipurificada apresentou em seu espectro de massas de alta resolução (CLAE-DAD-EM) no modo positivo (**Figura S9 do Material Suplementar**) pico relativo ao íon $[M+H]^+$ com valor de m/z de 541. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais com baixa intensidade, dificultando a atribuição dos carbonos. Além disso, tanto pelo espectro de RMN de 1H quanto de ^{13}C fica evidente que a substância se apresenta em mistura, o que também dificultou a atribuição dos sinais. De qualquer forma, os sinais demonstraram coerência em grande parte com aqueles apresentados para o núcleo fundamental da substância N-GABA-PP-V (VENKATACHALAM et al., 2018), da classe das azafilonas. Os dados da **Tabela 3** não apresentam uma atribuição completa da substância, mas permitiram realizar a atribuição dos carbonos e hidrogênios com base nos valores de δ , multiplicidades dos sinais e valores de J (RMN de 1H) e nas correlações carbono-hidrogênio observadas no espectro HMBC.

Tabela 3. Dados espectrométrico de RMN obtidos para a subfração 4 a 600 MHz para ^{13}C e ^1H em deuterometanol.

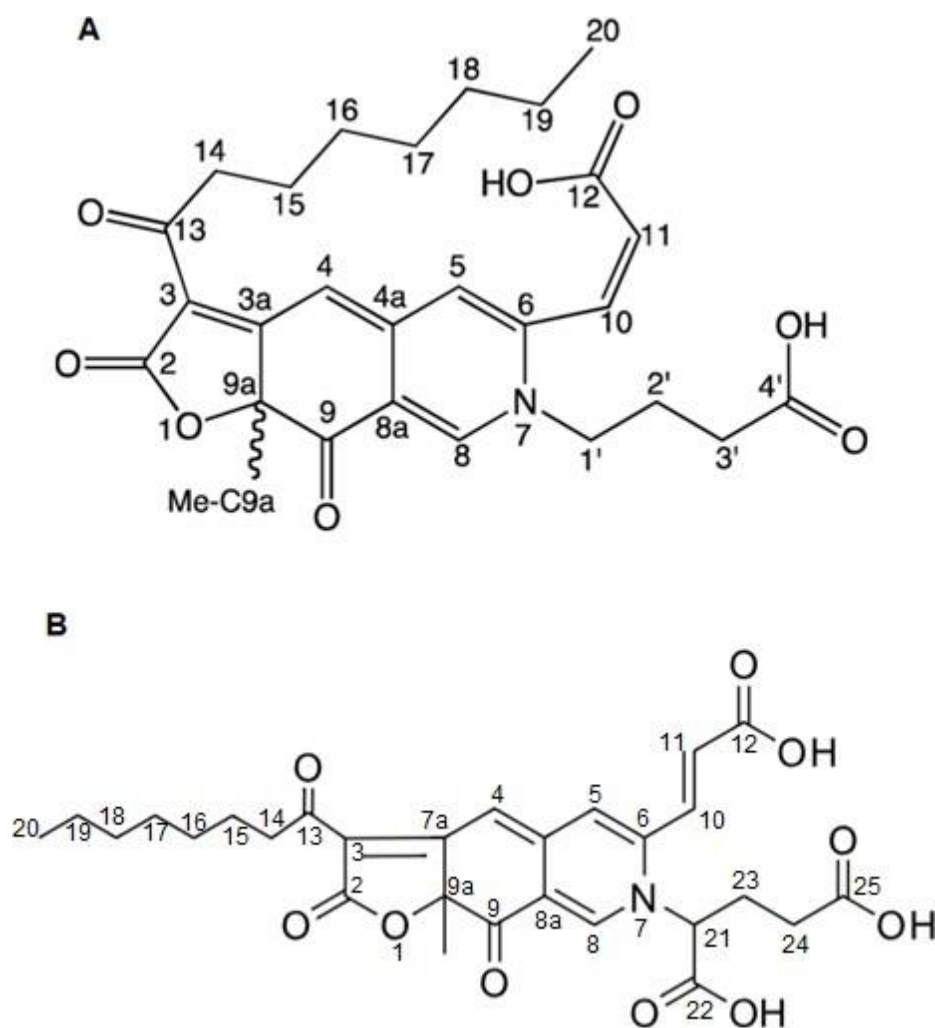
C ²	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ J (Hz)	HMBC
2	173,5 s	----	
3	103,9 s	----	
3a	nd ¹	----	
4	99,8 d	6,77 s	119,5; 87,3
4a	152,5 s	----	
5	121,0 d	7,21 s	119,5; 99,8
6	152,5 s	----	
8	nd	8,25 s	
8a	119,5 s	----	
9	196,0 s	----	
9a	87,3 s	1,66 s	
10	129,2 d	7,60 d (15,0)	
11	135,0 d	6,62 d (15,0)	129,2
12	173,6 s	----	
13	195,7 s	----	
14	41,4 t	2,78 m	195,7; 30,2; 26,1
15	30,2 t	1,58 m	
16	26,1 t	1,26-1,36 m	
17	30,5 t	1,26-1,36 m	
18	32,9 t	1,26-1,36 m	
19	23,6 t	1,26-1,36 m	
20	14,4 q	0,90 t (6,9)	23,6
21	nd	2,40 t (6,6)	174,8
22	174,8 s	----	
23	nd	2,83 td (7,8; 4,2)	
24	nd	----	
25	175,9 s	----	
26	30,5 q	1,69 s	196,0; 173,5; 87,3

¹valor não determinado ; ²numeração não oficial.

A estrutura obtida por Venkatachalam e colaboradores (2018) está apresentada na **Figura 18A**. Com análise dos dados de RMN obtidos para a subfração 4, bem como análise de seu espectro de massas, revela-se que a molécula N-GABA-PP-V tem estrutura química similar à da molécula presente na subfração 4. Considerando que ambas as moléculas são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Talaromyces*, a rota metabólica dos microrganismos pode ser a mesma, gerando moléculas com estruturas químicas similares. A diferença pode estar nas fontes de carbono e nitrogênio empregadas para a obtenção de tais moléculas. A proposta de estrutura química do corante vermelho produzido por *T. amestolkiae* (subfração 4 do meio fermentado) está apresentada na **Figura 18B**. Pode-se observar uma similaridade entre ambas as moléculas, que por sua vez diferem em um grupamento de ácido glutâmico na molécula presente na subfração 4. Como a fonte de nitrogênio empregada para a obtenção desta molécula é o glutamato monossódico, a variação no meio de cultura pode ter promovido a inserção de

um grupamento na molécula do colorante. Ensaios estruturais adicionais serão realizados para confirmar a estrutura proposta.

Figura 18. Estrutura química da molécula N-GABA-PP-V (A) e estrutura química proposta da substância obtida da subfração 4 (B) do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado de *T. amestolkiae*.



*(A) Fonte: Venkatachalam et al., 2018

6.2. Estudo de Estabilidade do Colorante Vermelho Produzido por *T. amestolkiae*

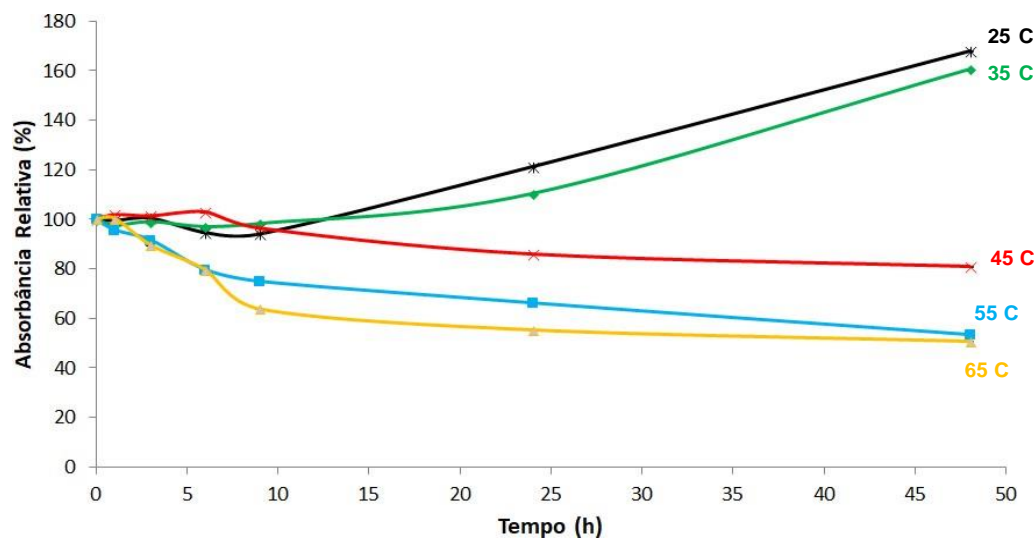
Um produto que apresente uma cor estável e atraente é uma característica muito importante para a indústria (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2013). No entanto, o uso de colorantes naturais, especialmente na indústria alimentícia, apresenta inúmeros desafios, como estabilidade da cor

relativamente baixa nas condições de processamento e armazenamento, alterações nas características organolépticas dos alimentos, pois muitos colorantes são sensíveis a mudanças de pH, aquecimento, exposição à luz, oxigênio e outros (WALLACE & GIUSTI 2008; CAI et al., 1998; ABEROUMAND, 2011). Dessa maneira, a seguir serão apresentados os resultados de estabilidade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* em relação a diferentes temperaturas e presença de surfactante e LI da família dos imidazólios e colinas.

6.2.1. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho em Diferentes Temperaturas

Segundo Fernández-López e colaboradores (2013), a instabilidade dos extratos naturais em relação à temperatura resulta em mudanças estruturais que afetam as propriedades de coloração e o espectro de absorção. Essa mudança depende de dois fatores, temperatura e tempo de exposição. Para analisar a estabilidade da cor do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, o colorante foi exposto a diferentes temperaturas (25 – 65 °C) e a estabilidade da cor foi avaliada durante 48 horas de exposição conforme exibido na **Figura 19**. Estes ensaios foram realizados com o intuito de verificar quais temperaturas poderiam ser utilizadas para que o SMDFA se separem em duas fases.

Figura 19. Estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*, exposto a diferentes (25, 35, 45, 55 e 65 °C) por 48 horas. As barras de erro representam limites de confiança de 95% para cada medida (encobertas pelos marcadores).

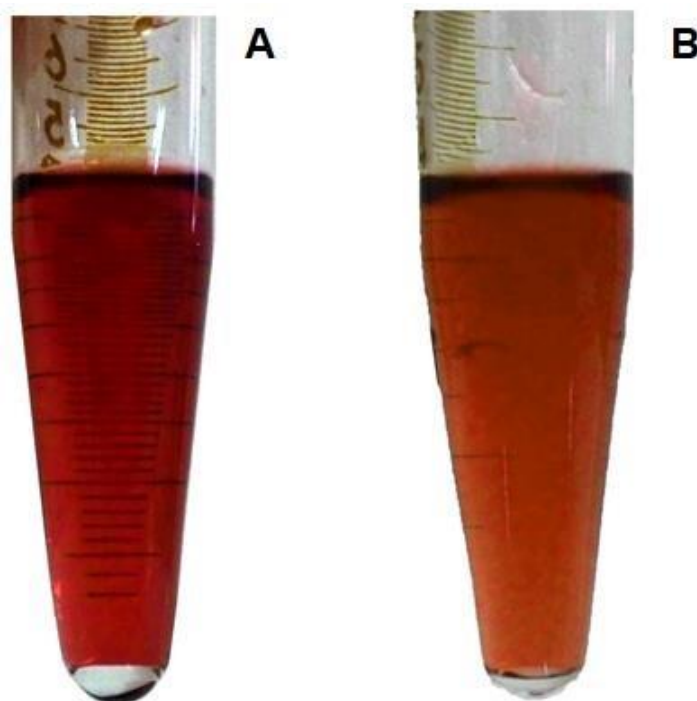


A análise da **Figura 19** mostra que a temperatura tem grande influência sobre a estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae*. Nas primeiras nove horas de estudo, houve uma baixa variação da absorbância relativa do colorante vermelho (aproximadamente 2%) nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C demonstrando que nessas condições não há uma perturbação do cromóforo do colorante. Considerando a aplicação do colorante, este resultado indica que processos com o binômio temperatura:tempo de até 45 °C por nove horas podem ser empregados sem prejuízo da estabilidade da cor do colorante. Porém, após as nove primeiras horas de ensaio há uma diferença marcante entre as temperaturas de 25 e 35°C em relação às demais. Nesta condição, ocorre um aumento de aproximadamente 68% na absorbância, relativa indicando um incremento da cor vermelho nestas condições. O mesmo perfil não foi observado na temperatura de 45 °C no qual ocorreu uma perda de absorbância relativa de, aproximadamente, 15% após 48 horas de incubação. Já para as temperaturas de 55 e 65 °C, há uma diminuição de aproximadamente 20% na absorbância relativa do colorante nas primeiras nove horas de ensaio, alcançando 40% de perda da cor após 48 horas de exposição.

Estes resultados indicam que, independentemente do tempo de exposição, as temperaturas de 55 e 65 °C não são indicadas para aplicação ou

extração dos colorantes naturais pois há uma perda da cor nestas condições. O colorante tem uma alteração de sua coloração de vermelho-púrpuro para vermelho-alaranjado, como pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20. Colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* em 0 horas a 55 °C (A) e após 48 horas de exposição a 55 °C (B).



Os resultados obtidos estão de acordo com o apresentado por Vendruscolo e colaboradores (2013), cujo pigmentos vermelho e laranja produzidos por *Monascus ruber* CCT foram inoculados em diferentes temperaturas (53,7-96,2 °C) e demonstraram que, à medida que a temperatura e o tempo de exposição aumentavam, a degradação do colorante aumentava (VENDRUSCOLO et al., 2013). Experimentos realizados por Loypimai et al. (2015) com antocianinas mostraram que quanto maior a temperatura e o tempo de exposição, mais acentuada fora a degradação das moléculas analisadas (LOYPIMAI et al., 2015). Gimenez e colaboradores (2015) testaram a degradação térmica de diferentes colorantes amarelos (luteína, β -caroteno, curcumina, riboflavina, gardênia amarela e opuntia betaxantinas) em diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90 °C) e verificaram que alguns colorantes não apresentaram um padrão de alta degradação independente da temperatura e

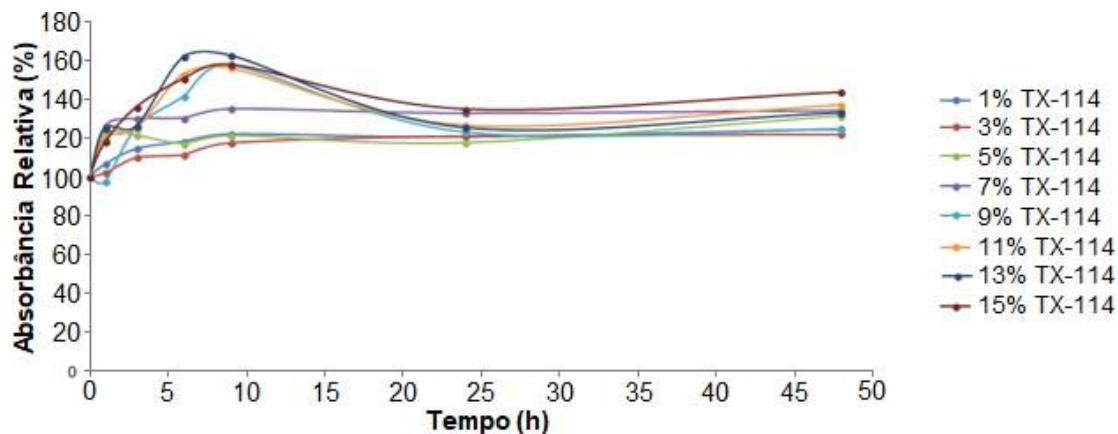
do tempo de exposição (luteína e beta-caroteno), enquanto para outros, quanto maior a temperatura e o tempo de exposição, maior a sua degradação (GIMÉNEZ et al., 2015).

Rakkimuthu e colaboradores (2016) realizaram ensaios de estabilidade em antocianinas de *Cocculus hirsutus*; entre os testes realizados estava o de estabilidade em relação a temperatura. Os autores verificaram que extratos de antocianinas eram estáveis nas temperaturas de 4 a 37 °C, tanto na presença como na ausência de luz e, com o aumento da temperatura, houve aceleração na alteração destas mesmas moléculas (RAKKIMUTHU et al., 2016). Arici e colaboradores (2016) também estudaram a estabilidade de antocianinas provenientes da flor *Tulipa gesneriana* L. em diferentes temperaturas e tempos de exposição e observaram que conforme a temperatura aumenta, acelera-se a cinética de degradação da biomolécula (ARICI et al., 2016).

622. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença do Surfactante Não-Iônico TX-114

Surfactantes são aplicados em diversos setores industriais como na produção de fármacos, emulsificações, alimentos e como agentes extratores de SMDFA. Assim, em diversos processos nos quais os colorantes podem ser aplicados pode haver a presença de surfactantes. Desta forma, conhecer a estabilidade destes biocompostos frente ao TX-114 é importante antes de considerar um sistema de extração do colorante. Desta maneira, avaliou-se a estabilidade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* frente a diferentes concentrações (1 – 15% (m/m)) de TX-114. Os resultados são apresentados na **Figura 21**.

Figura 21. Estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* incubado, a 10 °C, na presença de 1-15% (m/m) do surfactante não-iônico TX-114 durante 48 horas. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).



É possível verificar na **Figura 21** que até as primeiras nove horas de estudo não há uma estabilidade no perfil de absorbância dos colorantes vermelhos pois há um pico de absorbância nas concentrações mais altas (9, 11, 13 e 15% m/m) e somente após 24 horas de incubação o sistema provavelmente entra em equilíbrio mostrando que, independentemente da concentração estudada, a presença do TX-114 permite um aumento da absorbância relativa, alcançando um incremento de 40% na presença de 15% (m/m) de surfactante. Nas demais concentrações, este aumento da absorbância ficou próximo a 20%.

Estudos de estabilidade de uma série de biomoléculas na presença de surfactantes da classe do Triton já foram realizados. Em relação a colorantes, na presença de dodecil sulfato de sódio e Tween 80, o colorante natural *Roselle* perdeu toda a sua cor, enquanto o colorante *Lac* demonstrou ser estável na presença dos mesmos surfactantes (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Além disso, o uso de laurel sulfato de sódio apresentou ter grande influência sobre a fluorescência e estabilidade fotoquímica de cianinas, que teve seus valores incrementados (ARZOUMANIAN et al., 1978).

Como pode se verificar, os resultados obtidos através deste ensaio corroboram com aqueles encontrados na literatura e indicam que o surfactante não-iônico TX-114 é um agente que não interage fortemente com as biomoléculas provavelmente porque a força de interação entre as suas frações

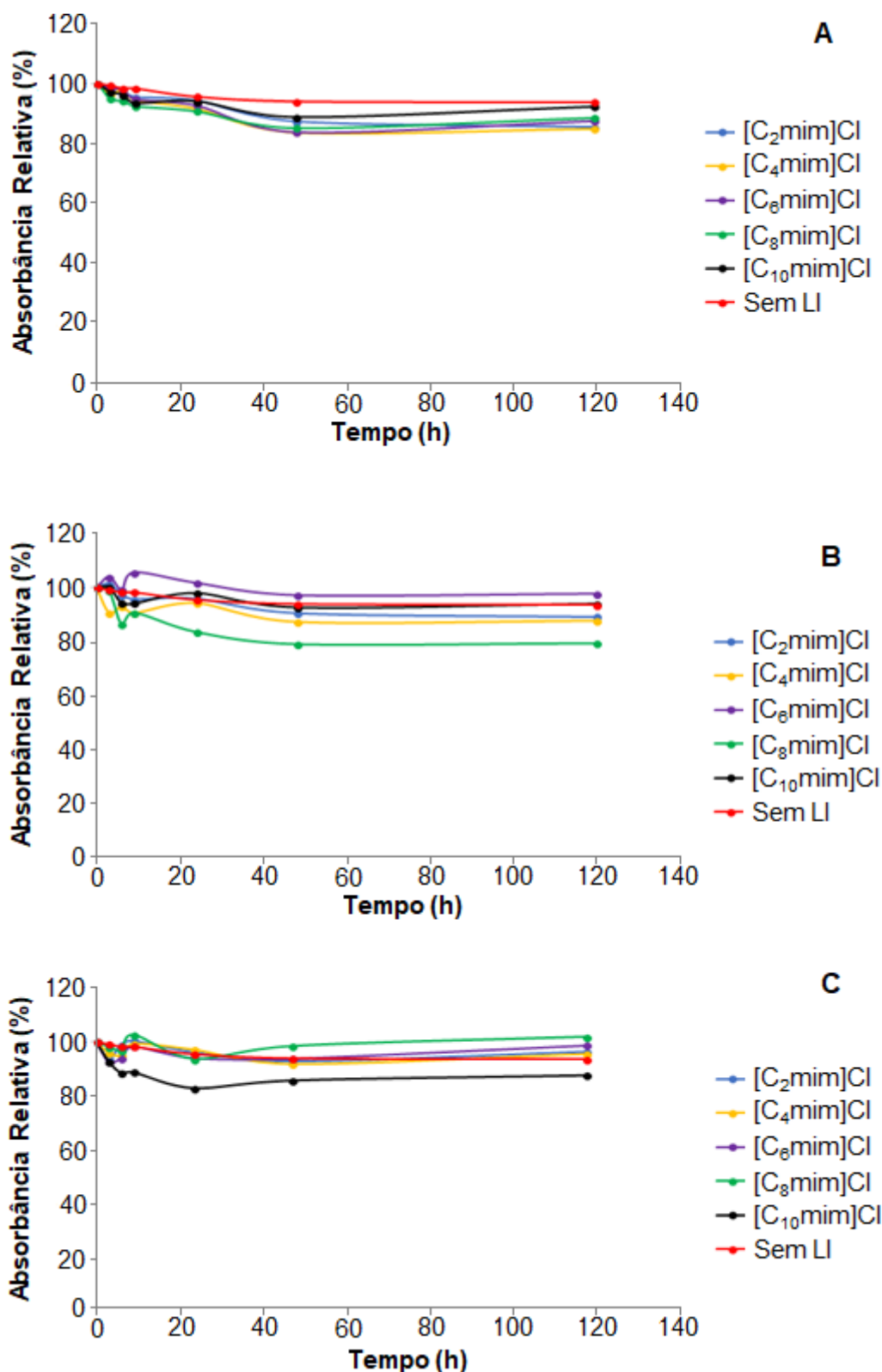
(cauda – apolar e cabeça – polar) é superior, não acarretando em influência na estabilidade das biomoléculas.

623 Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos

6231. Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios

Nos estudos de estabilidade dos colorantes vermelhos avaliou-se diferentes concentrações de LI (0,1, 0,5 e 1,0 M) e o comprimento da cadeia carbônica mantendo o Cl⁻ como o ânion durante 120 horas como apresentado na **Figura 22**.

Figura 22. Estabilidade do colorante vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* na presença dos LI [C₂mim]Cl, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₈mim]Cl e [C₁₀mim]Cl nas concentrações de 0,1 M (A), 0,5 M (B) e 1,0 M (C), durante o período de 120 horas a 10 °C. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).



A análise da **Figura 22A**, referente a estabilidade na presença de 0,1 M de LI da família dos imidazólios, mostra que, para esta concentração, a estabilidade do colorante apresenta a mesma forma de variação, com sua menor absorvância relativa ($\approx 85\%$) em 48 horas e se mantendo estável até o fim do experimento. Para a concentração de 0,5 M (**Figura 22B**), ocorre uma diferença nas formas de variação das absorvâncias relativas dos diferentes LI utilizados. Os LI [C₂mim]Cl, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl e [C₁₀mim]Cl apresentam absorvância relativa maior que 87% durante todo o ensaio, indicando que estes LI em concentrações um pouco maiores (0,5 M) apresentam pouca influência na estabilidade do colorante; já na presença LI [C₈mim]Cl a absorvância relativa do colorante chega ao seu mínimo em 48 horas ($\approx 79\%$) e se mantém estável até o final do ensaio. E por último, a **Figura 22C** apresenta a estabilidade do colorante vermelho na presença de 1,0 M dos LI. A análise desta figura permite verificar que na presença dos LI [C₂mim]Cl, [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl e [C₈mim]Cl o colorante apresenta a mesma forma de variação, com sua absorvância relativa ficando acima de 95% durante todo o experimento; já para o LI [C₁₀mim]Cl, a estabilidade do colorante apresenta uma queda de 19% logo nas primeiras 24 horas do experimento e, após este período, se mantém estável até o fim das 120 horas.

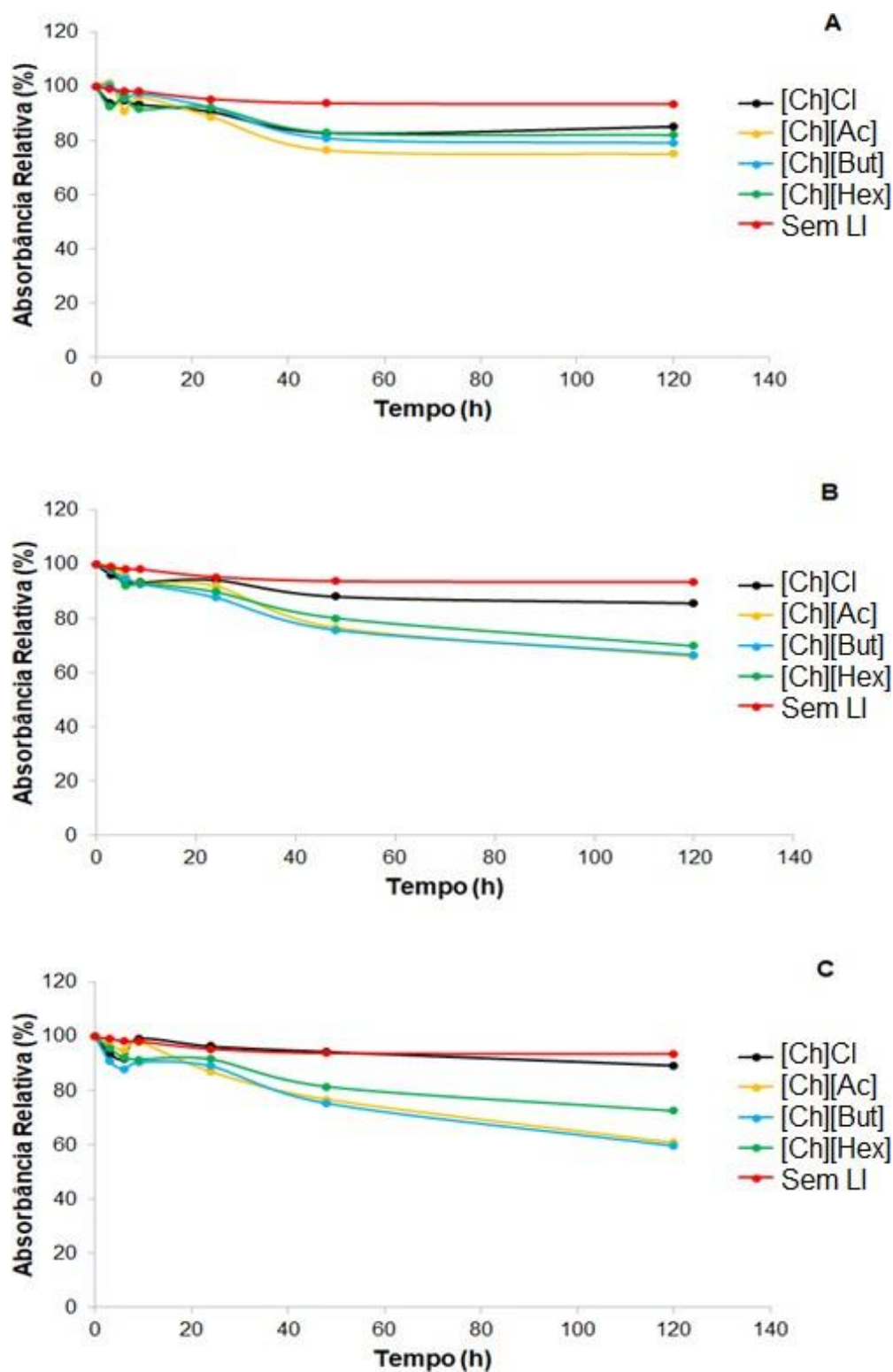
É possível verificar que para os LI com cadeia carbônica de dois a seis carbonos, à medida que sua concentração aumenta, há uma variação menor na absorvância relativa do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, como por exemplo o LI [C₂mim]Cl, onde a absorvância relativa final do colorante vermelho na presença de 0,1 M deste LI foi 85% e 89% e 96% na presença de 0,5 M e 1,0 M, respectivamente. Estes dados indicam que concentrações maiores destes três LI apresentam um efeito protetivo na molécula do colorante vermelho, mantendo sua estabilidade por um período maior. Entretanto, para o LI [C₁₀mim]Cl ocorre o inverso, o colorante na presença de 0,1 M desta IL tem uma absorvância relativa de 92% e, para concentrações de 0,5 M e 1,0 M, as absorvâncias relativas são 93% e 87%, respectivamente. Já o LI [C₈mim]Cl ocorre um padrão de variação totalmente diferente dos demais LI testados. Com 0,1 e 0,5 M as absorvâncias relativas foram de 88 e 79%, respectivamente; porém, quando o ensaio foi realizado com 1,0 M deste mesmo LI, a absorvância relativa ao final do ensaio foi de \approx

101%. Essas variações que ocorreram para os LI [C₈mim]Cl e [C₁₀mim]Cl podem ser explicadas pelo fato de LI com cadeia alquílica com mais de oito carbonos apresentarem característica de surfactante (JUNGNICKEL et al., 2008). Enquanto o [C₈mim]Cl se apresenta em um estado de transição entre sal e surfactante, o LI [C₁₀mim]Cl já apresenta a característica de surfactante, o que faz com que estes LI tenham uma maior interação com o colorante, promovendo uma maior variação em sua absorbância relativa, seja ela maior ou menor. A CMC dos LI [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl são 200, 62 e 14 mM (BAI et al., 2008), respectivamente. Portanto, nas condições estudadas, não houve a formação de micelas, já que se trabalhou com concentrações inferiores a CMC de cada um dos LI.

6.2.3.2. *Estudo da Estabilidade do Colorante Vermelho na Presença de Líquidos Iônicos da Família das Colinas*

Os LI da família das colinas são compostos por um sal de amônia quaternário que é biodegradável, com baixo custo e solúvel em água. Além disso, despertaram o interesse de diversas áreas de pesquisa pois são LI não-tóxicos e biodegradáveis; e estão sendo amplamente utilizados no campo da química verde e sustentável (GADILOHAR et al., 2017). A **Figura 23** apresenta a estabilidade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* na presença de diferentes concentrações (0,1, 0,5 e 1,0 M) dos LI [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex].

Figura 23. Estabilidade do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* na presença dos LI [Ch]Cl, [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex] nas concentrações de 0,1 M (A), 0,5 M (B) e 1,0 M (C), durante o período de 120 horas. Todos os sistemas foram incubados a 10 °C. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).

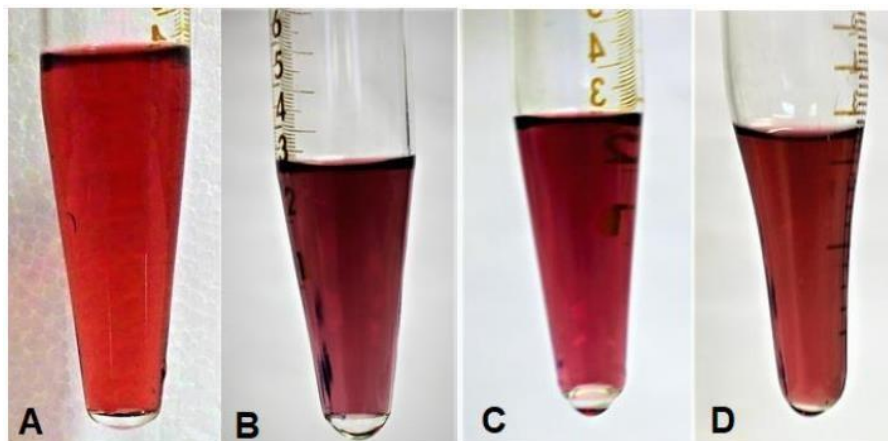


A **Figura 23A** apresenta a estabilidade do colorante vermelho na presença de 0,1 M de LI da família das colinas. A variação da estabilidade do colorante é menor do que 8% durante as primeiras 24 horas de experimento, para todos os LI; porém, com 48 horas de ensaio a absorvância relativa destes LI apresentam os menores valores e estes se mantêm até o final das 120 horas. O [Ch][Ac] é o LI que apresenta maior influência sobre o colorante, na concentração de 0,1 M, fazendo com que sua absorvância relativa tenha uma queda de 25% durante o ensaio. Já para a concentração de 0,5 M deste mesmo LI (**Figura 23B**) é possível verificar que o cloreto de colina apresenta pouco influência sobre a molécula do colorante vermelho, apresentando uma variação de 15% da absorvância relativa durante toda a duração do experimento; já os LI [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex] tem grande influência sobre a molécula do colorante vermelho, fazendo com que sua absorvância relativa tivesse uma queda de aproximadamente 33% durante as 120 horas. E, por último, a **Figura 23C** demonstra os resultados obtidos para a estabilidade do colorante vermelho na presença de 1,0 M dos LI da família das colinas. É possível verificar, novamente, que o [Ch]Cl é o composto que menos influencia a estabilidade do colorante vermelho, fazendo com que sua absorvância relativa varie em apenas 11% durante todo o experimento, independente da concentração utilizada. Neste ponto, é importante ressaltar que o [Ch]Cl não é considerado um LI pois possui um alto ponto de fusão, o que está em desacordo com a definição dos LI; porém, para fins de comparação entre o íon da família dos imidazólios e de moléculas com cadeias pequenas, ele foi empregado no presente estudo.

O [Ch][Hex] possui uma influência mediana sobre a molécula do colorante quando comparado aos outros LI estudados, fazendo com que a absorvância decaia 28% durante o ensaio, enquanto que o [Ch][But] e o [Ch][Ac] são os LI que apresentam maior influência sobre o colorante vermelho, fazendo com que sua absorvância relativa varie em mais de 40%. Um fator importante para se ressaltar é que, ao final das 120 horas de experimento, o colorante vermelho que estava em contato com 1,0 M de [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex] apresentou uma variação em sua cor, passando de vermelho para púrpura escuro, como pode ser observado na **Figura 24**. Essa variação de

coloração indica que possivelmente houve um deslocamento do comprimento de onda fazendo com que a absorbância relativa a 500 nm reduzisse.

Figura 24. Comparação entre o colorante na ausência de LI no tempo de 0 horas (A) e após 120 horas na presença de acetato de colina (B), butanoato de colina (C) e hexanoato de colina (D).



É possível verificar que conforme se aumenta a concentração de LI a qual o colorante foi exposto, maior a influência deste sobre a molécula do mesmo, como se pode verificar para os LI [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex]. Tomando como exemplo o LI [Ch][But] 0,1 M em solução, provoca uma queda de 21% da absorbância relativa do colorante vermelho, enquanto 1,0 M em solução deste mesmo LI apresenta uma diminuição de mais de 40% na absorbância relativa do colorante. Outro ponto que é importante ressaltar é que, assim como acontece para os LI da família dos imidazólios, o [Ch]Cl também mantém a cor da molécula do colorante vermelho em concentrações maiores, mantendo a sua cor natural durante todo o experimento. Diferente dos LI da família dos imidazólios, nenhum dos LI da família das colinas estudados tem capacidade de formação de micelas, assim comportam-se como um sal que pode interagir com o cromóforo do colorante. Em relação a este efeito protetor, é necessário ressaltar a importância da série de sais de Hofmeister, que classifica a influência relativa destes íons sobre o comportamento físico de uma grande variedade de processos aquosos que varia desde a montagem coloidal até o dobramento de proteínas (ZHANG & CREMER, 2006). No caso do LI da família das colinas, tem-se um anión cosmotrópico (favorece interações entre moléculas de água) e um cátion caotrópico (rompe as ligações

de hidrogênio entre as moléculas de água). O [Ch][Ac] é formado pela combinação do cátion de amônio quartenário e o ânion acetato. Em alguns casos, conforme aumenta a força iônica do sistema, podem ocorrer interações específicas entre os íons e as macromoléculas, o que, talvez, esteja resultando neste efeito de “proteção” com alguns LI. Comparando os resultados obtidos com os LI da família das colinas e dos imidazólios, há uma condição ao qual o íon cloreto é comum em ambas ([Ch]Cl para a família das colinas e em todos os LI da família dos imidazólios). LI que apresentaram efeito protetor foram aqueles que apresentavam o íon Cl⁻ em sua estrutura química, indicando que este íon pode apresentar um efeito protetor no cromóforo. Na família das colinas, conforme se aumentou a cadeia carbônica, alterou-se a coloração do colorante, interferindo em sua estabilidade, que aqui é representada pela absorvância. Esta alteração na cor pode ter ocorrido por desestabilização do cromóforo vermelho ou por outro fenômeno.

Líquidos iônicos podem ser utilizados como agentes dispersantes, que servem para dar estabilidade a pastas e tintas que contém pigmentos (ZHAO, 2006). Weyvershausen e Lehmann (2005) demonstraram o uso de quatro LI não convencionais (Tego[®] IL T16ES, K5MS, P9 e Dispers 662 C) e um convencional (1,3-dimetilimidazolium metilsulfato) como aditivos de desempenho, incorporando-os como dispersantes secundários em pastas de pigmentos ou tintas de base branca para serem matizadas; os LI ajudaram na estabilização dos pigmentos em diferentes condições e resolveram problemas causados pelo uso de revestimento à base de solvente (WEYERSHASUN & LEHMANN, 2005).

Levando em consideração os resultados obtidos para os ensaios de estabilidade e, também, a aplicação do colorante em questão, o surfactante não iônico TX-114 e os LI da família das colinas seriam altamente viáveis para utilização em SMDFA para extração do colorante vermelho de seu meio fermentado. Porém, os LI [Ch][Ac], [Ch][But] e [Ch][Hex] afetaram a estabilidade do colorante, fazendo com que sua cor vermelha característica transformasse-se em púrpura, quando os períodos de incubação foram maiores que 48 horas. Tais resultados indicam que os SMDFA poderiam ser empregados por um período de 24 horas para extração, sem prejuízo da molécula do colorante.

6.3. Extração dos Colorantes Naturais Empregando Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

A extração e/ou purificação de diferentes biomoléculas utilizando-se SMDFA envolve uma série de diferentes condições que podem influenciar diretamente na partição do soluto para uma das fases co-existentes, como por exemplo, a influência da composição química, temperatura, pH, ou a adição de adjuvantes específicos, ligantes de afinidade ou estruturas anfifílicas (LIU et al. 2016).

O padrão de partição de moléculas orgânicas é altamente dependente da curva binodal dos SMDFA e, em muitos casos, a curva pode ser encontrada na literatura e, portanto, o experimento pode ser realizado diretamente. Entretanto, como demonstrado na seção anterior, o objetivo deste trabalho foi a extração de uma molécula derivada de um meio fermentado, então tornou-se necessário a investigação da influência dos compostos residuais do meio no diagrama de fases.

Trabalhos presentes na literatura demonstram que o ponto de névoa sofre variações na presença de diferentes compostos. Bhatt e colaboradores (2013) demonstraram que o ponto de névoa é muito sensível a presença de aditivos (BHATT et al., 2013). Gu e Galera-Gómez (1995) verificaram que a adição de 0,1 M de diferentes eletrólitos em solução de 1% (m/m) de TX-114 levou a uma diminuição de seu ponto de névoa (GU & GALERA-GÓMEZ, 1995). Gu e Galera-Gómez (1999) demonstraram que a adição de aditivos líquidos orgânicos polares que são miscíveis em água levam a um aumento da T_{cp} de TX-100 enquanto aqueles aditivos que são parcialmente solúveis em água levam a um aumento de sua T_{cp} (GU & GALERA-GÓMEZ, 1999). Santos-Ebinuma e colaboradores (2013) também apresentaram resultados onde a adição de eletrólitos inorgânicos, como por exemplo, NaCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, levou a uma diminuição da T_{cp} de sistemas compostos por TX-114 (SANTOS-EBINUMA et al., 2013c).

6.3.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos Somente por TX-114

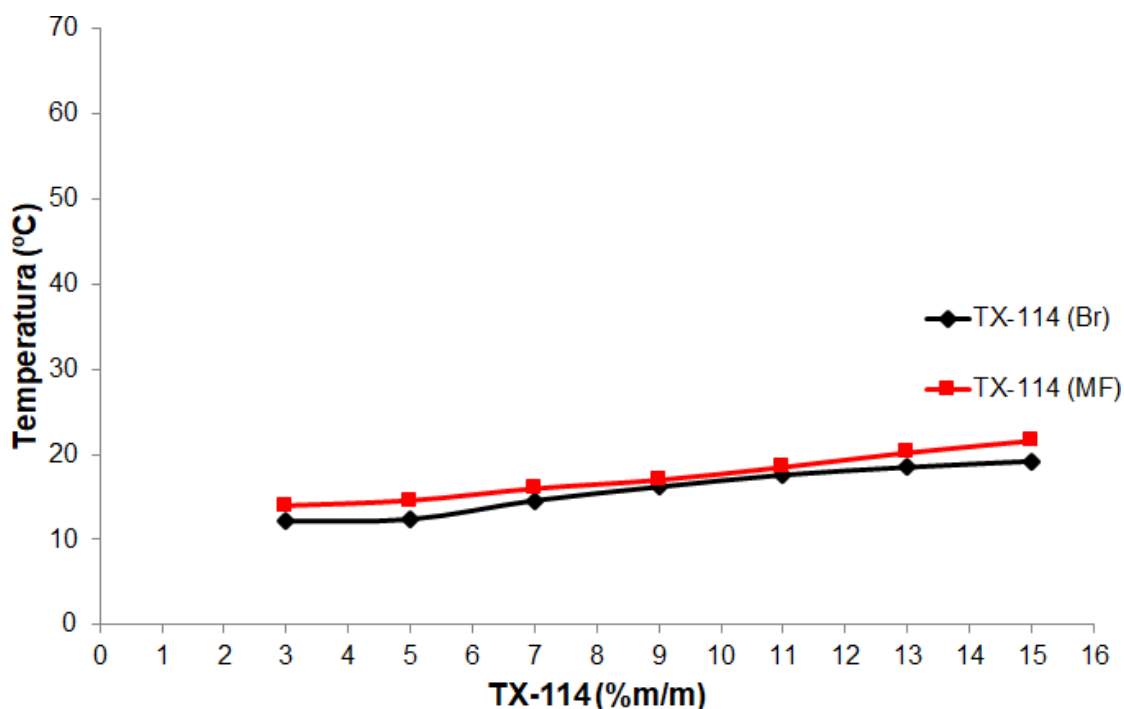
6.3.1.1. Curva Binodal

A primeira etapa deste trabalho foi focada na determinação das curvas binodais dos SMDFA. Acima da T_{cp} duas fases são formadas, então é fundamental determinar este parâmetro antes de qualquer processo de extração ou separação. Na literatura, a influência de diferentes sais no T_{cp} é bem descrita, e sabe-se que enquanto determinados sais reduzem o valor do ponto de nuvem, outros podem aumentar essa temperatura (LOPES et al., 2014), como resultado de uma modificação nas interações intramicelar e intermicelar. Por outro lado, a mudança nas interações não é exclusiva da adição de sais, mas pode ser obtida pela formação de sistemas micelares mistos, que também podem promover modificações e induzir diferentes valores de pontos de nuvem. Ao contrário da influência dos sais inorgânicos, amplamente descrita na literatura (LOPES et al., 2014; KOSHY et al., 1996; GU & GALERA-GÓMEZ, 1995); o uso de diferentes LI e sua influência nas curvas binodais dos SMDFA ainda é escassa. Vicente et al. (2014) estudaram o efeito de LI de famílias de imidazólio, fosfônio e amônio quartenário na curva binodal de TX-114 em tampão McIlvaine em pH 7,0. O trabalho anterior desses autores nos encorajou a realizar uma série de experimentos para a extração de colorantes diretamente do meio fermentado usando SMDFA. É amplamente sabido que a adição de um meio complexo como um caldo fermentado pode afetar o equilíbrio de fases e, conseqüentemente, alterar a curva binodal (VICENTE et al., 2014).

Para avaliar o particionamento do colorante vermelho, realizou-se a determinação das curvas binodais para os SMDFA compostos por TX-114 e LI das famílias das colinas e dos imidazólios na presença e ausência do meio fermentado contendo o colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*. Além disso, levou-se em consideração a estabilidade e a razão de purificação do colorante vermelho e por tais motivos as curvas foram determinadas em pH diferente daquele utilizado por Vicente e colaboradores (2014). As curvas binodais para os diferentes sistemas serão apresentadas em um bloco junto com a partição dos colorantes naturais. A seguir, será apresentado os resultados de curva binodal e da extração dos colorantes naturais em SMDFA

composto somente pelo surfactante não-iônico TX-114. A **Figura 25** apresenta a curva binodal para os sistemas compostos somente por TX-114 e a **Tabela S7 do Material Suplementar** as temperaturas brutas nas quais os sistemas turvam.

Figura 25. Curva binodal para os sistemas compostos apenas por TX-114 e tampão McIlvaine pH 6,5 na ausência (linha preta) e presença do meio fermentado de *T. amestolkiae* (linha vermelha). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).

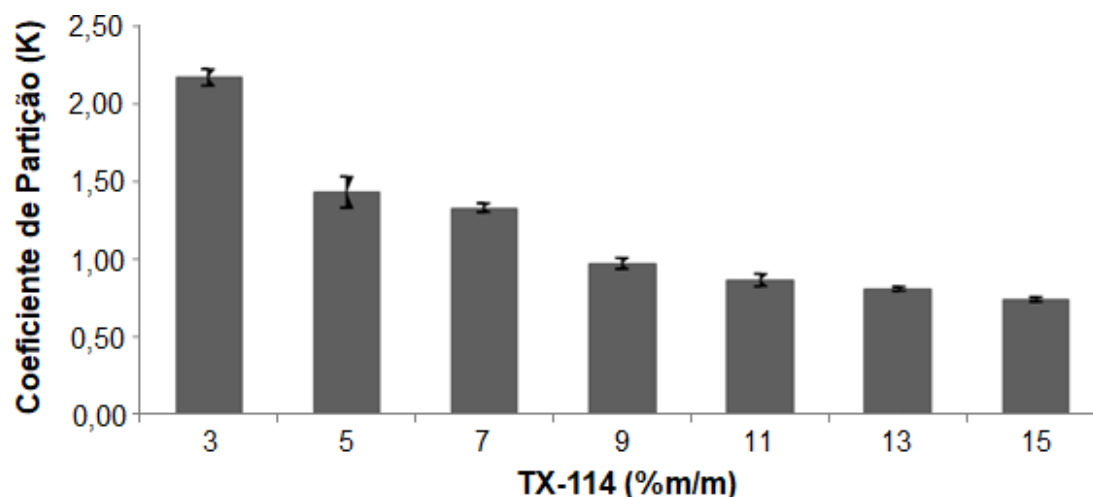


Para os sistemas compostos apenas por TX-114 e tampão (**Figura 25**), a T_{cp} aumentou em maiores concentrações do surfactante não-iônico, pois, nestas condições há formação de uma rede água-surfactante estruturado, onde as moléculas de água estão ligadas a mais de um sistema micelar, formando “barreiras” entre as micelas e as separando. Portanto, temperaturas maiores são necessárias para mover estas moléculas de água e facilitar a interação micela-micela (KOSHY et al., 1996).

6.3.1.2. Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentado

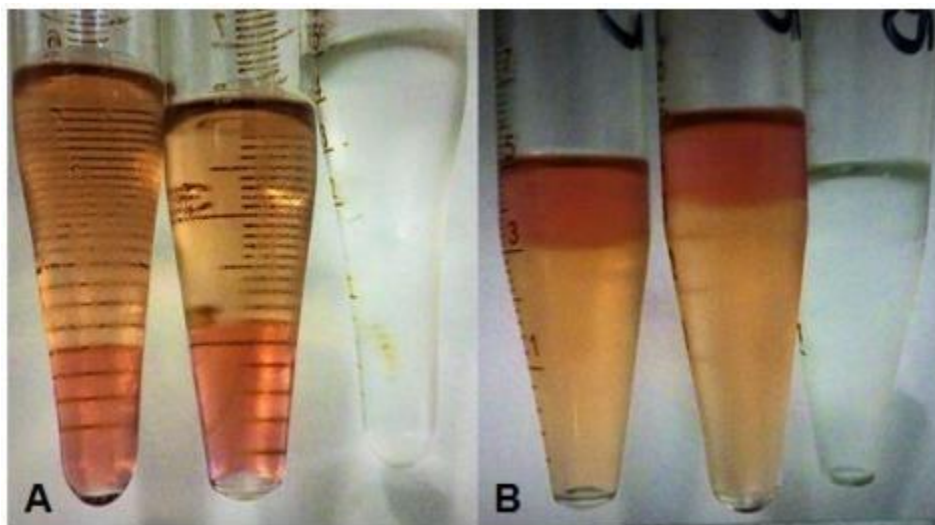
Realizou-se um primeiro ensaio sobre a partição do colorante vermelho utilizando-se SMDFA compostos de diferentes concentrações de TX-114 (3-15% m/m) e tampão McIlvaine pH 6,5, sem adição de quaisquer LI. Os resultados estão apresentados na **Figura 26** e na **Tabela S10 do Material Suplementar**. A temperatura de incubação para cada sistemas está apresentada na **Tabela S7 do Material Suplementar**.

Figura 26. Coeficiente de partição do colorante (K) vermelho presente no meio fermentado de *T. amestolkiae* em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)) em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições.



A análise da **Figura 26** demonstra que o colorante particionou para a fase rica em micelas ($K > 1,0$) para os sistemas com menor concentração de TX-114 (3-7% (m/m)), enquanto para os sistemas com maior concentração (9-15% (m/m)), o colorante se distribuiu igualmente entre as ambas as fases ($K \approx 1,0$) (**Figura 26**). Este particionamento pode ser explicado pois, quando se aumenta a concentração de TX-114 nos sistemas, a hidrofobicidade da fase *bottom* (rica em micelas) também aumenta, o que acarreta em um aumento da afinidade do colorante pela fase *top* (fase pobre em micelas) (**Figura 27**) (TORRES et al., 2018).

Figura 27. Sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por 3% (m/m) (A) e por 15% (m/m) (B) de TX-114, tampão McIlvaine pH 6,5 e meio fermentado de *T. amestolkiae* contendo o colorante vermelho.



Resultados reportados por (SANTOS-EBINUMA et al., 2016) demonstraram que o colorante vermelho em meio fermentado de *T. amestolkiae* tem coeficiente de partição octanol/água negativo em pH 6,5, o que caracteriza um biocomposto hidrofílico; porém, a estrutura química do colorante (**Figura 18B**) demonstra grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos. Quando o colorante é produzido pelo microrganismo, a molécula do colorante pode estar associada a outros compostos hidrofílicos, tais como açúcares, fazendo com que o colorante apresente características hidrofílicas. Nos resultados de extração aqui reportados, observou-se que, quando a hidrofobicidade da fase rica em micelas aumentou (neste caso ao se aumentar a concentração de TX-114), o colorante migrou para a fase mais hidrofílica (pobre em micelas). Entretanto, por ambas as fases serem aquosas, outros tipos de interação podem influenciar a partição do colorante, como repulsão eletrostática e exclusão por volume. Deste modo, fica claro que, em menores concentrações de TX-114, o mecanismo que rege a migração do colorante vermelho não está relacionado com hidrofilicidade (interações do tipo ligação de hidrogênio), pois a molécula particiona preferencialmente para a fase rica em micelas (apesar de sua característica hidrofílica). O SMDFA com apenas 3% (m/m) de TX-114 apresentou a maior capacidade para concentrar o colorante vermelho, com um $K = 2,17$. Este sistema foi três vezes mais

eficiente para extrair o corante vermelho quando comparado com o sistema composto por 15% (m/m) de TX-114.

O valor de condutividade para ambas as fases do sistema composto por 3% (m/m) de TX-114 demonstra que a fase *top* (pobre em surfactante) é duas vezes mais condutiva que a fase rica em surfactante. Comparando-se a condutividade com os valores de K é possível verificar que a partição do corante vermelho para a fase mais hidrofóbica (rica em surfactante) é resultado de interações eletrostáticas de repulsão (**Tabela 4**).

Tabela 4. Condutividade das fases *top* e *bottom* dos SMDFA compostos por TX-114 (3 e 15% (m/m)).

Triton X-114 (% m/m)	Condutividade Fase <i>Top</i> (mS/cm)	Condutividade Fase <i>Bottom</i> (mS/cm)
3	16,86	6,97
15	17,24	7,04

Ademais, o aumento na partição do corante vermelho para a fase *top* (pobre em micelas), observada em concentrações maiores de TX-114, pode ser influenciado por algum efeito de volume de exclusão ou por aumento na hidrofobicidade relativa da fase. Em relação ao volume de exclusão, o TX-114 apresenta uma massa molecular ($536 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), e, com o aumento de sua concentração, um maior número de micelas será criado. Com mais micelas na fase rica em micelas, o espaço disponível para as moléculas do corante vermelho diminui (tornando-se mais dificultoso sua permanência nesta fase), e as moléculas irão particionar para a fase pobre em micelas, levando a uma diminuição do K quando se aumenta a concentração de TX-114.

Em relação ao BM (**Tabela 5**), que descreve o fluxo de massa de entrada e de saída dos sistemas, é possível verificar que, para os sistemas com $K > 1$ (3-9% (m/m)), o BM se apresenta maior que 75%, indicando que, ao final do ensaio de partição do corante vermelho com SMDFA compostos apenas por TX-114, foi possível recuperar 75% da massa de corante adicionada aos sistemas; por outro lado, sistemas com $K < 1$ (9-15% (m/m)) apresentam BM inferior a 75%.

Tabela 5. Balanço de massa para os SMDFA compostos por 3-15% (m/m) de TX-114.

Triton X-114 (%m/m)	Balanço de Massa
3	75,15 ± 3,79
5	78,78 ± 0,93
7	90,57 ± 2,06
9	73,88 ± 1,27
11	72,61 ± 1,76
13	67,76 ± 2,41
15	67,40 ± 2,34

Quanto a eficiência de extração (EE (%)) dos SMDFA compostos por TX-114 (**Tabela S16 do Material Suplementar**), estes valores foram em sua grande maioria inferiores a 50%, porém, foi possível verificar que conforme se aumenta a concentração de TX-114 no sistema, maior é sua EE (%) (EE (%)_{3%TX-114} = 40,62; EE (%)_{15% TX-115} = 54,72).

Os resultados obtidos indicam que a concentração de TX-114 é um fator muito importante para a partição do corante vermelho, sendo que, quanto menor a concentração de TX-114, maior o K; além disso, foi possível obter um BM superior a 75% para o SMDFA com melhor K (3% TX-114 = 2,17), demonstrando que teve-se uma perda de massa pequena quando comparado a outros sistemas.

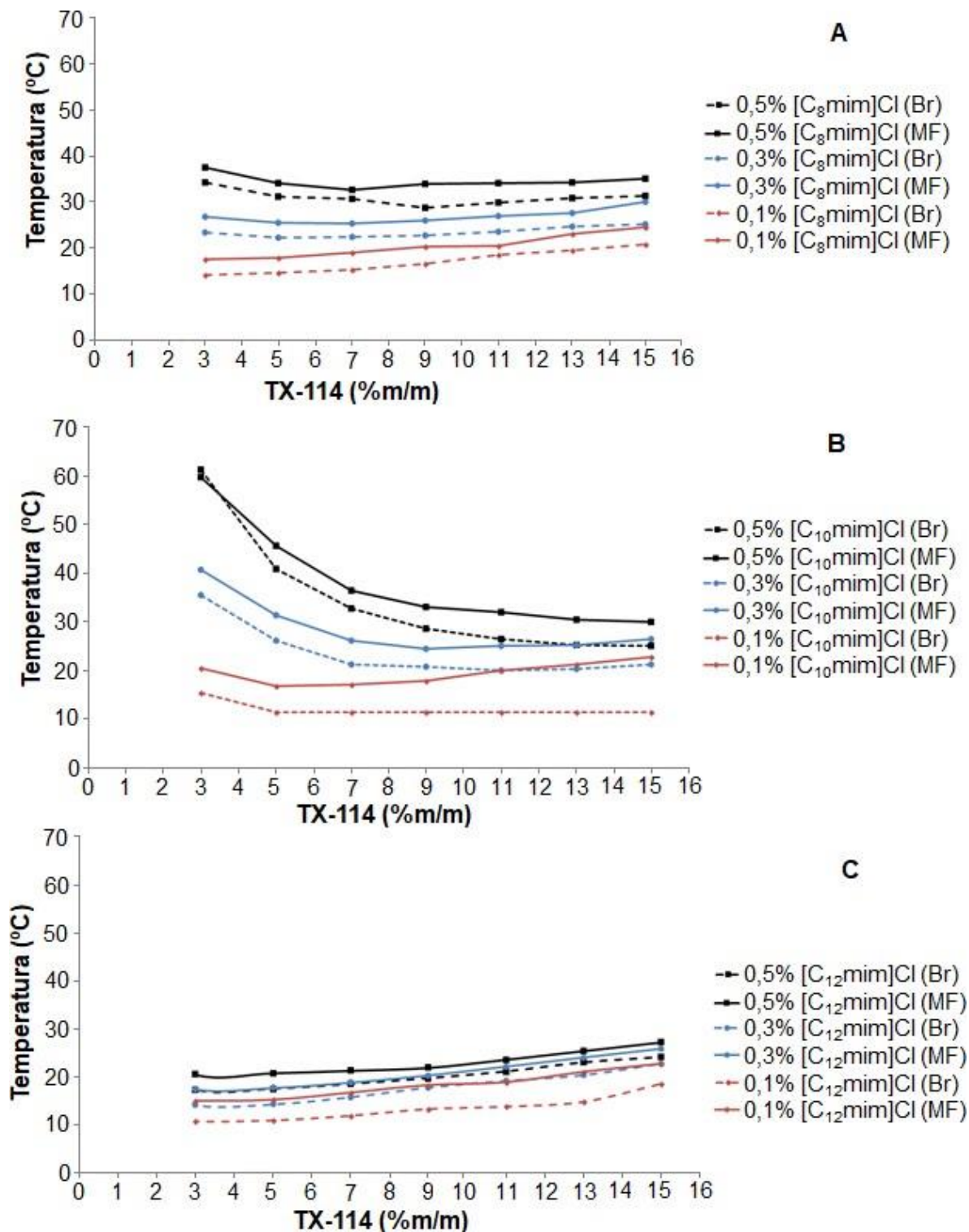
Na literatura não se há estudos de recuperação de corantes naturais utilizando-se SMDFA, sendo este trabalho uma primeira tentativa de realizá-lo tanto na presença de TX-114 como na presença de diferentes LI.

6.32. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos por Líquidos Iônicos da Família dos Imidazólios

6.3.2.1. Curva Binodal

Baseado em resultados da literatura, e objetivando o estudo da partição do corante vermelho, determinaram-se as curvas binodais para SMDFA compostos por TX-114 e LI [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl como adjuvantes, na presença, também, do meio fermentado. Os resultados estão apresentados na **Figura 28**. Além disso, considerando a estabilidade e a recuperação do corante vermelho, as curvas binodais foram determinadas em pHs diferentes daqueles utilizados por Vicente e colaboradores (2014).

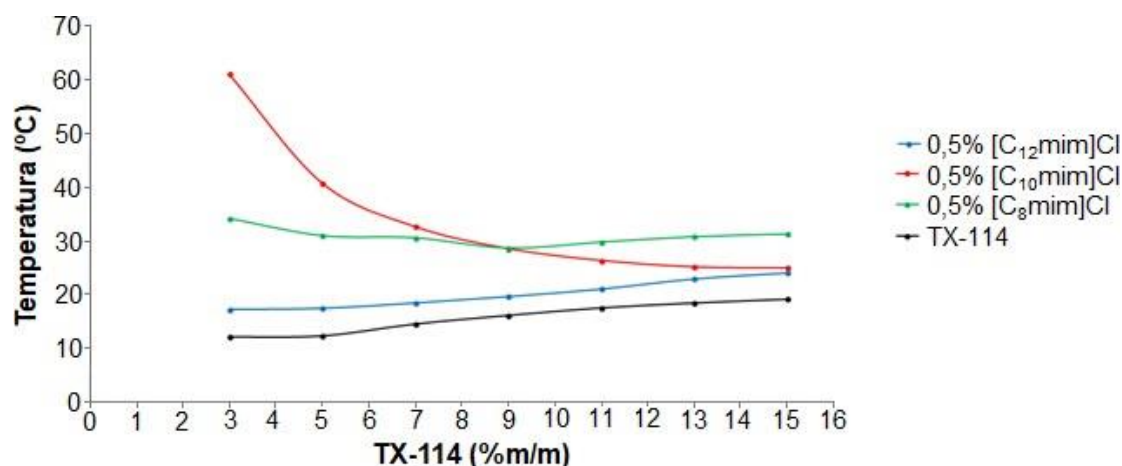
Figura 28. Curva binodal para os sistemas compostos por TX-114, Tampão McIlvaine pH 6,5 e os LI (A) [C₈mim]Cl, (B) [C₁₀mim]Cl e (C) [C₁₂mim]Cl na presença (linhas cheias) e ausência (linhas pontilhadas) de meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* contendo os colorantes vermelhos. Br – Branco; MF – Meio Fermentado. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).



As curvas binodais apresentadas na **Figura 28** demonstram que a adição de meio fermentado afeta o equilíbrio de fases, sendo observado um aumento na T_{cp} de aproximadamente 12%, para todas as condições testadas. Este fenômeno é esperado, já que o meio fermentado apresenta em sua composição diferentes sais inorgânicos, composições residuais de açúcar e outros compostos, os quais podem estabelecer algumas interações com as moléculas de surfactantes, afetando a estrutura micelar e, conseqüentemente, reduzindo as forças de interação entre as moléculas de surfactantes. A influência dos LI nas curvas binodais foram dependentes da concentração de TX-114. $[C_8mim]Cl$ (**Figura 28A**) gerou uma baixa variação na temperatura provavelmente porque este LI apresenta uma cadeia alquílica menor quando comparado aos demais LI avaliados. $[C_{10}mim]Cl$ (**Figura 28B**) apresentou a maior variação da T_{cp} , sendo que para os sistemas compostos por 3% (m/m) de TX-114 e 0,5% (m/m) de $[C_8mim]Cl$ e $[C_{10}mim]Cl$, a diferença na T_{cp} foi de, aproximadamente, 55%. Porém, em concentrações maiores de TX-114, o efeito do $[C_{10}mim]Cl$ foi menor.

A fim de obter mais informações sobre o efeito de cada LI nas curvas binodais dos SMDFA baseados em TX-114, a **Figura 29** compara o T_{cp} dos sistemas compostos de 0,5% em peso de cada LI estudado. É possível notar que um aumento da cadeia alquílica acarreta em maiores T_{cp} . No entanto, dependendo da concentração de surfactante, pode ocorrer uma inversão sobre a influência na curva binodal. $[C_8mim]Cl$ é o LI que promove a menor variação de temperatura, corroborando a predominância de um efeito *salting-out* característico (um efeito diminuído no equilíbrio micelar e de agregação). Por outro lado, $[C_{10}mim]Cl$ está em um estado misto entre sal e surfactante, e, por causa disso, mostra um T_{cp} mais alto para o SMDFA com composições entre 3 a 7% (m/m) de TX-114. Na maior concentração de TX-114 o efeito de $[C_{10}mim]Cl$ no T_{cp} foi menos pronunciado. Neste ponto (TX-114 > 9% (m/m)), o sistema com o LI $[C_{12}mim]Cl$, que funciona como co-surfactante, exibe o mais alto T_{cp} , uma vez que exibe um comportamento semelhante a um surfactante, afetando mais as estruturas das micelas.

Figura 29. Comparação das curvas binodais dos SMDFA compostos por TX-114 e 0,5% (m/m) dos LI [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl e [C₁₂mim]Cl.



Outro fenômeno importante observado na **Figura 28** é que conforme a concentração de LI aumenta, a temperatura necessária para se atingir o ponto de névoa também aumenta. Bhatt e colaboradores (2013) afirmaram que o fenômeno do ponto de névoa é muito sensível à presença de aditivos e, neste caso, quando se utilizam sistemas baseados em imidazólios, mesmo em concentrações muito baixas, a região de turvação aumentou. Aparentemente, a adição de LI induziu uma modificação na CMC e, conseqüentemente, afetou o tamanho das micelas (BHATT et al., 2013). Líquidos iônicos hidrofóbicos de cadeia alquílica longa podem formar agregados micelares nas soluções aquosas, da mesma forma que as moléculas de surfactante (HEMMATEENEJAD et al., 2011). Há relatos mostrando diferentes tipos de agregações nas soluções de LI, em particular, para os LI da família dos imidazólios (GARCIA et al., 2013; ŁUCZAK et al., 2008; MODARESSI et al., 2007; PATRASCU et al., 2006). [C₁₂mim]Cl e [C₁₀mim]Cl são constituídos por um cátion orgânico anfifílico (grande cadeia alquílica ligada a um anel aromático) e um pequeno ânion inorgânico, e devido a sua estrutura semelhante à de um surfactante, espera-se que eles formem micelas e exibam um comportamento de auto-agregação quando estes LI são misturados com soluções aquosas (MODARESSI et al., 2007). Por outro lado, Thakkar e colaboradores (2016) demonstraram que o LI [C₁₀mim]Cl penetra mais profundamente no núcleo micelar do surfactante TX-110 como resultado do

grande tamanho do comprimento da cadeia alquílica imidazólica em anexo, um fenômeno que ocorre quando LI da família dos imidazólios com um alto número de carbonos no comprimento da cadeia alquílica, como por exemplo, [C₁₂mim]Cl, é usado (THAKKAR et al., 2016).

Embora os SMDFA que utilizam o LI [C₈mim]Cl como co-surfactantes tenham exibido uma influência similar na curva binodal, é importante notar que este LI pode estar em estado de transição entre sal e surfactante. De acordo com Miskolczy e colaboradores (2004), o [C₈mim]Cl forma uma solução não homogênea de agregados maiores, o que pode afetar o ponto de turvação dos sistemas (MISKOLCZY et al., 2004). Além disso, é amplamente conhecida a aptidão de *salting-out* de diferentes LI e a consequente competição pelas moléculas de água da solução tampão (ou meio fermentado). Este fenômeno é mais pronunciado em sistemas aquosos utilizando LI com cadeia alquílica com maior número de carbonos, uma vez que o aumento no tamanho da cadeia alquílica do LI leva a um aumento da sua hidrofobicidade, e, conseqüentemente, a interação entre as moléculas de água do tampão e os cátions do LI será enfraquecida (TANG et al., 2014). Neste estudo, uma combinação tanto de agregação como de *salting-out* parecem ter influenciado a curva binodal dos SMDFA baseados no LI [C₈mim]Cl.

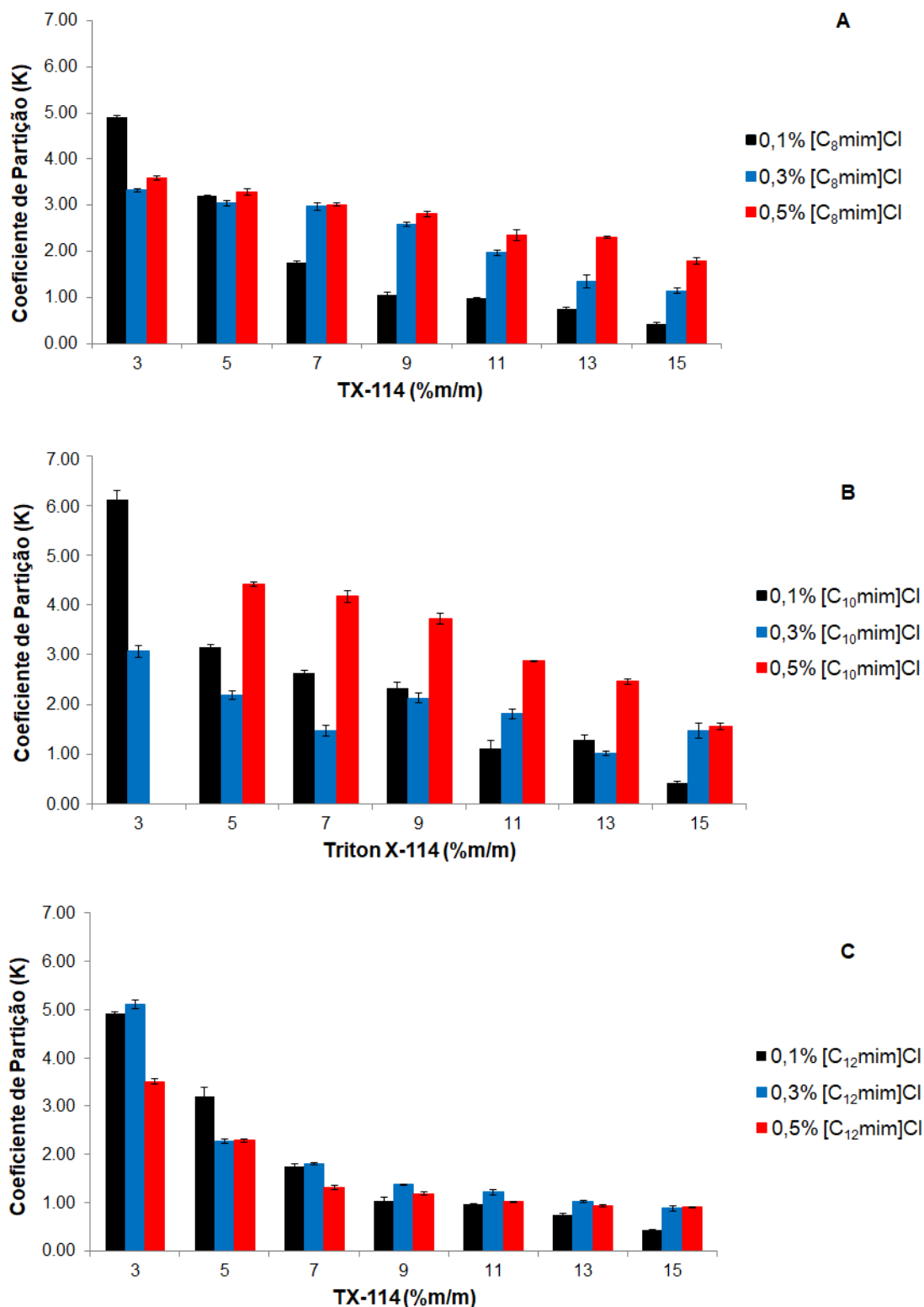
Os SMDFA compostos somente por TX-114 ou por LI da família dos imidazólios como adjuvantes exibem um aumento da T_{cp} quando adicionados das maiores concentrações dos agentes formadores de fases. Em relação ao aumento da concentração de TX-114, isso é simplesmente o resultado da formação de mais micelas, o que causa uma demanda de energia para agregá-las e, conseqüentemente, se separar em duas fases macroscópicas. Quando os LI são adicionados aos SMDFA, como destacado anteriormente, parece que dois fenômenos diferentes governam o aumento do T_{cp} : **(a)** o maior invólucro de hidratação presente ao redor dos LI baseados em imidazólio; **(b)** o aumento da repulsão entre as micelas devido à carga dos LI (VICENTE et al., 2014).

6.3.2.2. *Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentado*

Após os primeiros ensaios em relação a influência do surfactante TX-114 na extração do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, uma série com três SMDFA foram preparados em combinação com TX-114, tampão

Mcllvaine pH 6,5 e com os LI, como adjuvantes, [C₈mim]Cl, [C₁₀mim]Cl and [C₁₂mim]Cl. A incubação destes sistemas, para a extração do colorante vermelho, foi realizada em temperaturas pré-determinadas que estão especificadas na **Tabela S8 do Material Suplementar**. Os resultados obtidos para cada SMDFA desta família estão apresentados na **Figura 30** e nas **Tabelas S11-13 do Material Suplementar**.

Figura 30. Coeficiente de partição (K) do corante vermelho proveniente do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* utilizando-se SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)), tampão McIlvaine pH 6,5 e diferentes concentrações (0,1, 0,3 e 0,5% (m/m)) dos LI [C₈mim]Cl (A), [C₁₀mim]Cl (B) e [C₁₂mim]Cl (C). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).



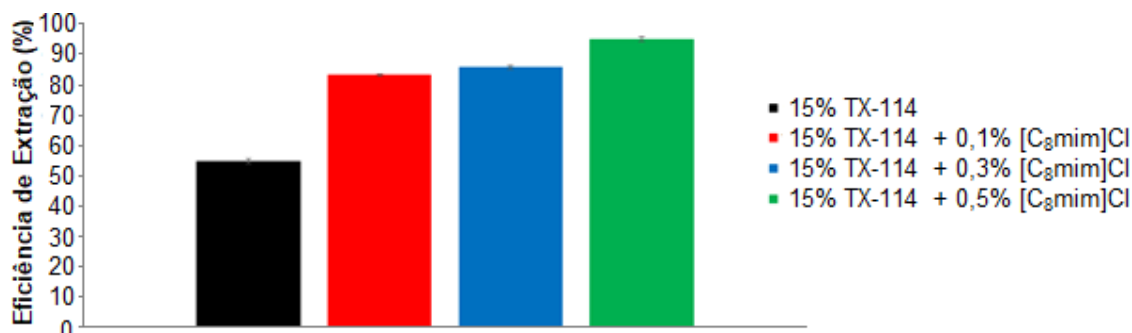
A **Figura 30** mostra que o corante vermelho foi particionado preferencialmente para a fase rica em micelas (mais hidrofóbica) na maior parte dos sistemas avaliados. Os SMDFA com LI apresentaram uma tendência similar a aqueles compostos apenas por TX-114 (**Figura 26**), onde, conforme se aumenta a concentração do surfactante, o K diminui. Porém, a presença de LI promoveu uma partição maior do corante vermelho para a fase rica em micelas quando concentrações menores de TX-114 foram utilizadas. Para avaliar se interações eletrostáticas de atração atuavam nestes sistemas, o potencial zeta de ambas as fases dos sistemas foram medidos, bem como para o corante em tampão com pH 6,5. A presença dos LI levou a formação de micelas mistas carregadas positivamente, resultando na atração do corante (carregado negativamente em pH 6,5). Este fenômeno foi maior em concentrações menores de TX-114, onde a hidrofobicidade relativa da fase rica em micelas estava reduzida, aumentando a interação eletrostática entre o corante e as micelas carregadas positivamente. Entretanto, com aumento da concentração de TX-114 e dos LI, a fase rica em micela foi se tornando mais hidrofóbica. Conseqüentemente, é provável que a interação eletrostática entre o corante e os LI não era forte o suficiente para manter a molécula de interesse na fase rica em micelas e, portanto, o corante começou a migrar para o ambiente mais hidrofílico, neste caso a fase pobre em micelas.

Uma análise geral da **Figura 30** demonstra que os maiores valores de K obtidos para cada LI foram (i) 4,91 para o sistema composto por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) $[C_8mim]Cl$; (ii) 6,13 para o sistema composto por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) $[C_{10}mim]Cl$; e (iii) 5,11 para o sistema composto por 3% (m/m) TX-114 e 0,3% (m/m) $[C_{12}mim]Cl$. A aptidão de partição dos SMDFA $[C_{10}mim] Cl$ com 3% (m/m) TX-114 e 0,5% (m/m) de LI não foi adquirida, uma vez que o T_{cp} foi superior a 80 °C pois, como demonstrado pelo ensaio de estabilidade, temperaturas superiores a 55 °C desestabilizam o cromóforo da molécula do corante vermelho. Provavelmente, as interações eletrostáticas da fase rica em água induzem a migração para a fase rica em micelas, um fenômeno que é particularmente acentuado em concentrações mais baixas de TX-114 (a hidrofobicidade relativa da fase rica em surfactante é reduzida).

A série de resultados apresentados na **Figura 30** indica que, em geral, a adição de pequenas quantidades de LI nos SMDFA melhora a partição do corante vermelho produzido por *T. amestolkiae* para a fase rica em surfactante. Entretanto, deve-se observar que três tendências distintas podem ser reveladas a partir dos dados obtidos para cada SMDFA, sendo elas: (i) um aumento no K quando adicionou-se 0,3 e 0,5% (m/m) de [C₈mim]Cl em concentrações de TX-114 menores que 5% (m/m) (**Figura 30A**); (ii) aumento do K com adição de 0,5% (m/m) de [C₁₀mim]Cl (**Figura 30B**); (iii) quase nenhum efeito sobre o K com a adição de [C₁₂mim]Cl (**Figura 30C**). Essas tendências podem ser facilmente entendidas baseando-se no balanço envolvendo as interações hidrofílicas e eletrostáticas e os efeitos de volume de exclusão entre as moléculas do corante vermelho e as micelas, bem como nas mudanças promovidas pelos LI no tamanho e estruturas das micelas. Embora estudos estruturais adicionais sejam necessários para a compreensão dos mecanismos de partição em nível molecular, parece claro que o uso de LI baseados em imidazólio com uma longa cadeia alquílica como adjuvantes, como o [C₁₂mim]Cl, induzem um mecanismo de condução completamente diferente no particionamento dos solutos do que o mais curto [C₈mim]Cl. O uso de LI com características de surfactantes, como o [C₁₂mim]Cl, promovem a formação de micelas mistas, e atuam como surfactantes nos SMDFA, onde a concentração de micelas é o principal mecanismo em relação a partição. Por outro lado, o uso de LI com cadeias alquílicas menores, as distribuições de carga dos íons e sua capacidade de estabelecer interações específicas com os solutos passam a ser o principal fator de migração.

Os resultados obtidos para a EE (%) dos SMDFA compostos por LI dos imidazólios estão presentes nas **Tabelas S17-19 do Material Suplementar**. Para o sistema composto apenas por 15% (m/m) de TX-114, a EE (%) foi de 54,72 enquanto para o sistema composto por 7% (m/m) de TX-114 e 0,5% (m/m) de [C₁₀mim]Cl, a EE (%) foi de 97,40, o que representa um aumento de quase duas vezes na EE (%). Outro ponto importante para se ressaltar é que, na maior parte dos sistemas, o aumento da concentração dos LI levou a um aumento, também, na EE (%), como apresentado na **Figura 31**.

Figura 31. Comparação entre as eficiências de extração de sistemas compostos por 15% (m/m) de TX-114, na presença ou ausência do líquido iônico $[C_8mim]Cl$ em diferentes concentrações.



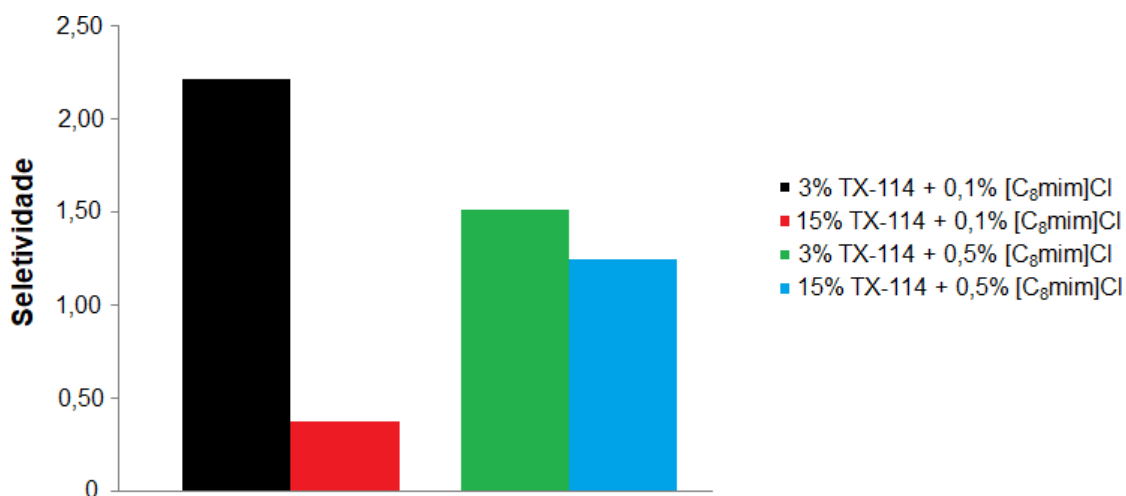
Apesar de o sistema composto por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) $[C_{10}mim]Cl$ apresentar uma EE (%) de aproximadamente 61%, sendo este valor aproximadamente 1,6 vezes menor que os valores obtidos para outros sistemas, este SMDFA apresentou o melhor K (6,12), sendo este K 1,5 vezes melhor do que qualquer outro sistema que utilizou LI da família dos imidazólios como adjuvantes. Como citado anteriormente, vários sistemas apresentaram EE (%) maior que 90%, porém, estes sistemas não apresentaram bons resultados em relação ao particionamento da molécula do corante vermelho.

A partir dos dados obtidos através da análise da partição do meio fermentado e sua leitura nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm foi possível determinar a seletividade dos SMDFA para o corante vermelho (490 nm) em relação aos corantes amarelo (400 nm) e laranja (470 nm), também produzido pelo fungo *T. amestolkiae*.

Como é possível se verificar nas **Tabelas S23-S25 do Material Suplementar**, a grande maioria dos sistemas revelou-se mais seletivo para o corante vermelho do que para o amarelo e laranja produzidos, também, pelo fungo *T. amestolkiae*.

Um ponto importante para se destacar é para os LI da família dos imidazólios, conforme a concentração de TX-114 aumentava, a seletividade era menor, porém, ao se adicionar maiores concentrações de LI nos sistemas, apesar de ocorrer uma queda na seletividade de aproximadamente 1,4 vezes, não houveram grandes diferenças entre as seletividades quando se aumentou a concentração de TX-114, conforme se pode verificar na análise da **Figura 32**.

Figura 32. Comparação entre as seletividades do colorante vermelho em relação ao amarelo para sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114 e do líquido iônico [C₈mim]Cl.



6.3.2.3. Influência da Temperatura no Coeficiente de Partição

A temperatura é um fator importante para a partição de diversas biomoléculas, e considerando que diferentes SMDFA apresentam diferentes T_{cp} , é fundamental entender como esta condição afeta a extração do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*. Assim, nesta seção, a influência da temperatura na partição do colorante vermelho foi avaliada. Para isto, três SMDFA compostos por 3% (m/m) de TX-114 e 0,1% (m/m) de [C₁₀mim]Cl em tampão McIlvaine pH 6,5 (sistema que apresentou o melhor K nos ensaios anteriores) foram preparados e incubados em três temperaturas distintas. O coeficiente de partição e a razão volumétrica (R) estão presentes na **Tabela 6**.

Tabela 6. Coeficiente de partição (K) do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*, a razão volumétrica (R) e eficiência de extração (EE (%)) dos SMDFA compostos por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) [C₁₀mim]Cl incubados a 25, 35 e 45 °C.

Temperatura (°C)	K	R	EE (%)
25	6,56 ± 0,34	1,27 ± 0,24	60,09 ± 0,19
35	20,29 ± 0,96	0,25 ± 0,11	94,04 ± 1,01
45	24,40 ± 0,74	0,09 ± 0,16	99,95 ± 0,01

Os resultados presentes na **Tabela 6** claramente demonstram que a temperatura tem um efeito significativo na partição do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae*. Diferença de 10 °C na temperatura de separação de fases dos SMDFA levou a um aumento significativo no K do colorante. Sistemas a 45 °C tiveram um aumento em seu K de aproximadamente 3,8 vezes quando comparados àqueles que foram colocados a 25 °C. É importante ressaltar que os sistemas produzidos nas etapas anteriores apresentavam valores de R próximos a 1,0. O aumento de temperatura acarretou diminuição do R dos sistemas deste ensaio ($R_{25^{\circ}\text{C}} = 1,27$; $R_{45^{\circ}\text{C}} = 0,09$). Portanto, o aumento de temperatura leva a um menor volume da fase rica em micelas (*bottom*) causando um aumento na concentração do colorante vermelho nesta fase, e, conseqüentemente, faz com que o K seja maior.

Outro ponto importante para se ressaltar é que conforme se aumentou a temperatura, a EE (%) também aumentou, passando de 60,09% em 25 °C para 99,95% em 45 °C.

A temperatura afeta significativamente a entropia dos sistemas, e, como os SMDFA são sistemas dinâmicos, o aumento da temperatura leva a um aumento da entropia do sistema, e grande quantidade de energia é fornecida ao sistema. Conseqüentemente, há um aumento da interação eletrostática entre as moléculas carregadas de colorante vermelho e as micelas.

6.3.2.4. Dispersão dos Líquidos Iônicos

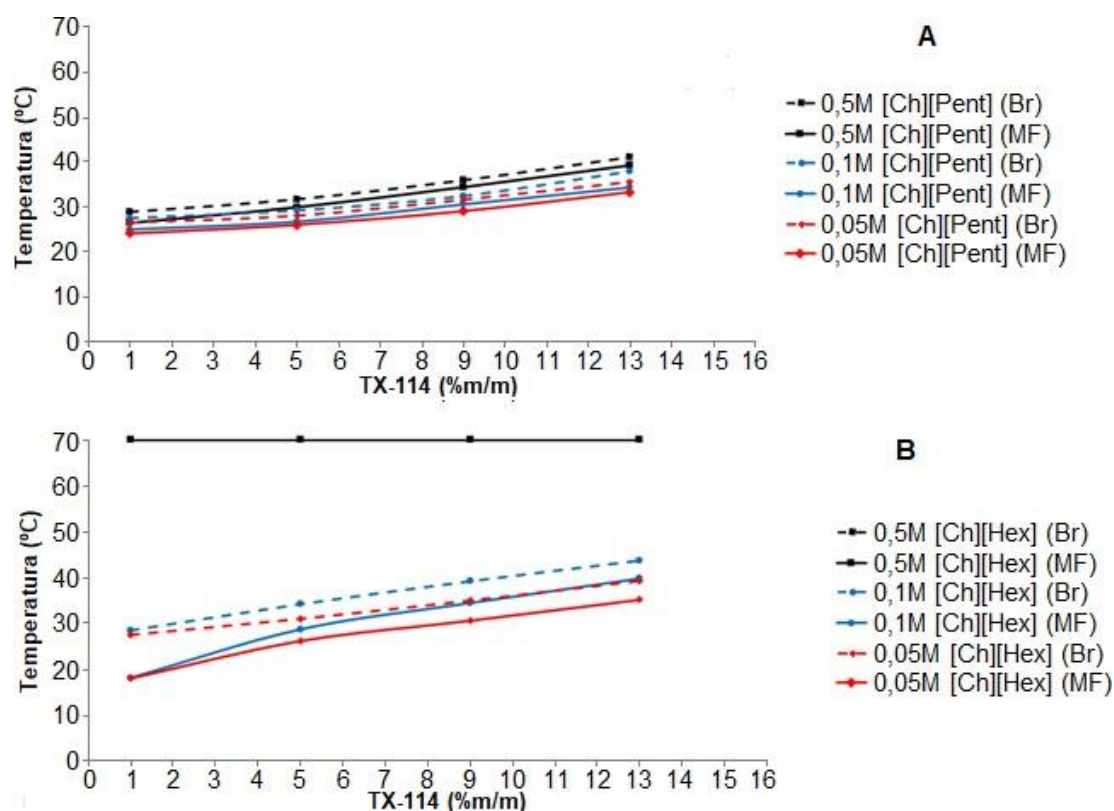
Para se avaliar a dispersão dos LI nas fases dos sistemas, a condutividade de ambas as fases foi medida. Para os LI da família dos imidazólios, independentemente do tamanho de suas cadeias alquílicas, em baixas concentrações há uma dispersão dos íons em ambas as fases. Porém, com o aumento da concentração do LI, a condutividade aumenta na fase *bottom* e, provavelmente, há maior formação de micelas mistas (**Tabela S28 do Material Suplementar**). No caso do LI $[\text{C}_{10}\text{mim}]\text{Cl}$, ao se comparar a os sistemas compostos por 15% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) de $[\text{C}_{10}\text{mim}]\text{Cl}$, a condutividade na fase *top* foi de 21,47 mS/cm e para a fase *bottom* 7,33 mS/cm, enquanto para o sistema com 0,5% (m/m) do mesmo LI as condutividades foram 22,67 e 11,27 mS/cm, para as fases *top* e *bottom*, respectivamente.

6.3.3 Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas Compostos por Líquidos Iônicos da Família das Colinas

6.3.3.1. Curvas Binodais

As curvas binodais para os SMDFA compostos por TX-114 e LI da família das colinas foram construídas na presença de [Ch][Pent] e [Ch][Hex]. Desta maneira, a **Figura 33** apresenta as curvas binodais para os SMDFA compostos por TX-114, LI, [Ch][Pent] ou [Ch][Hex], água e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Figura 33. Curvas binodais para os sistemas compostos por TX-114 em água Mili-q e os LI (A) pentanoato de colina ([Ch][Pent]) e (B) hexanoato de colina ([Ch][Hex]) na presença (linhas cheias) e ausência (linhas pontilhadas) de meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Onde Br – branco; MF – meio fermentado. As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições (encobertas pelos marcadores).



Nos sistemas formados por TX-114, [Ch][Pent] e [Ch][Hex] em água, o meio fermentado também apresentou influência sobre a T_{cp} , porém, diferentemente do que aconteceu para os LI da família dos imidazólios, a T_{cp}

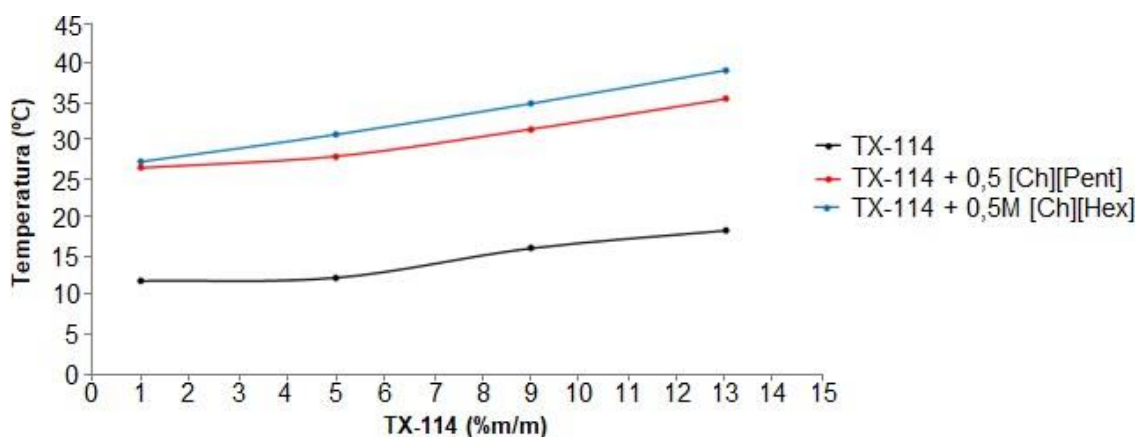
diminuiu aproximadamente 10%. Esse fenômeno se explica, pois, diferentemente dos LI da família dos imidazólios, os LI da família das colinas são compostos por sais quartenários de amônio (SIOPA et al., 2016), o que os deixa com característica de sais e não de surfactantes, como alguns LI da família dos imidazólios. De maneira geral, a presença de [Ch][Pent] e [Ch][Hex] acarretou em aumento na T_{cp} dos sistemas. Na presença de LI [Ch][Pent] (**Figura 33A**) pode-se verificar que conforme a concentração de TX-114 e/ou LI aumentam, a T_{cp} também aumenta ($T_{cp1\% \text{ TX-114} + 0,05\text{M [Ch][Pent]}} = 24,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{cp13\% + 0,05\text{M [Ch][Pent]}} = 33,3 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{cp1\% \text{ TX-114} + 0,5\text{M [Ch][Pent]}} = 26,4 \text{ }^\circ\text{C}$). O mesmo também pode ser observado para o LI [Ch][Hex] (**Figura 33B**), onde quanto maior a concentração de TX-114 e do LI, maior a T_{cp} ; porém, é importante ressaltar que para a concentração de 0,5 M de LI não foi possível determinar a curva binodal pois a temperatura de incubação foi superior a 70 $^\circ\text{C}$.

Trabalhos presentes na literatura demonstram que o ponto de névoa sofre variações na presença de diferentes compostos. Bhatt e colaboradores (2013) demonstraram que o ponto de névoa é muito sensível a presença de aditivos. Gu e Galera-Gómez (1995) verificaram que a adição de 0,1 M de diferentes eletrólitos em solução de 1% (m/m) de TX-114 levou a uma diminuição de seu ponto de névoa. Gu e Galera-Gómez (1999) demonstraram que a adição de aditivos líquidos orgânicos polares que são miscíveis em água levam a um aumento da T_{cp} de TX-100 enquanto aqueles aditivos que são parcialmente solúveis em água levam a uma diminuição de sua T_{cp} . Santos-Ebinuma e colaboradores (2013c) também apresentaram resultados onde a adição de eletrólitos inorgânicos, como por exemplo NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, levou a uma diminuição da T_{cp} de sistemas compostos por TX-114.

Outro ponto importante de se ressaltar é relacionado a adição dos LI aos SMDFA, que levou a um aumento de mais de 14 $^\circ\text{C}$ na T_{cp} dos sistemas na presença dos LI da família das colinas quando comparados com aqueles na ausência destes mesmos LI. Em relação ao do meio fermentado, por este conter aproximadamente 5 g/L de glicose, sendo esta concentração muito maior que a dos LI nos sistemas, levou a uma diminuição da temperatura necessária para a separação de fases, pois a glicose é uma molécula que se hidrata facilmente, portanto remove as moléculas de água que ficam em torno das

micelas, facilitando que estas interagem entre si, acarretando em uma menor temperatura para que o sistema se torne bifásico. Além disso, a análise da **Figura 34** também é possível notar que quanto maior a cadeia alquílica do LI utilizado, maior a T_{cp} para os sistemas.

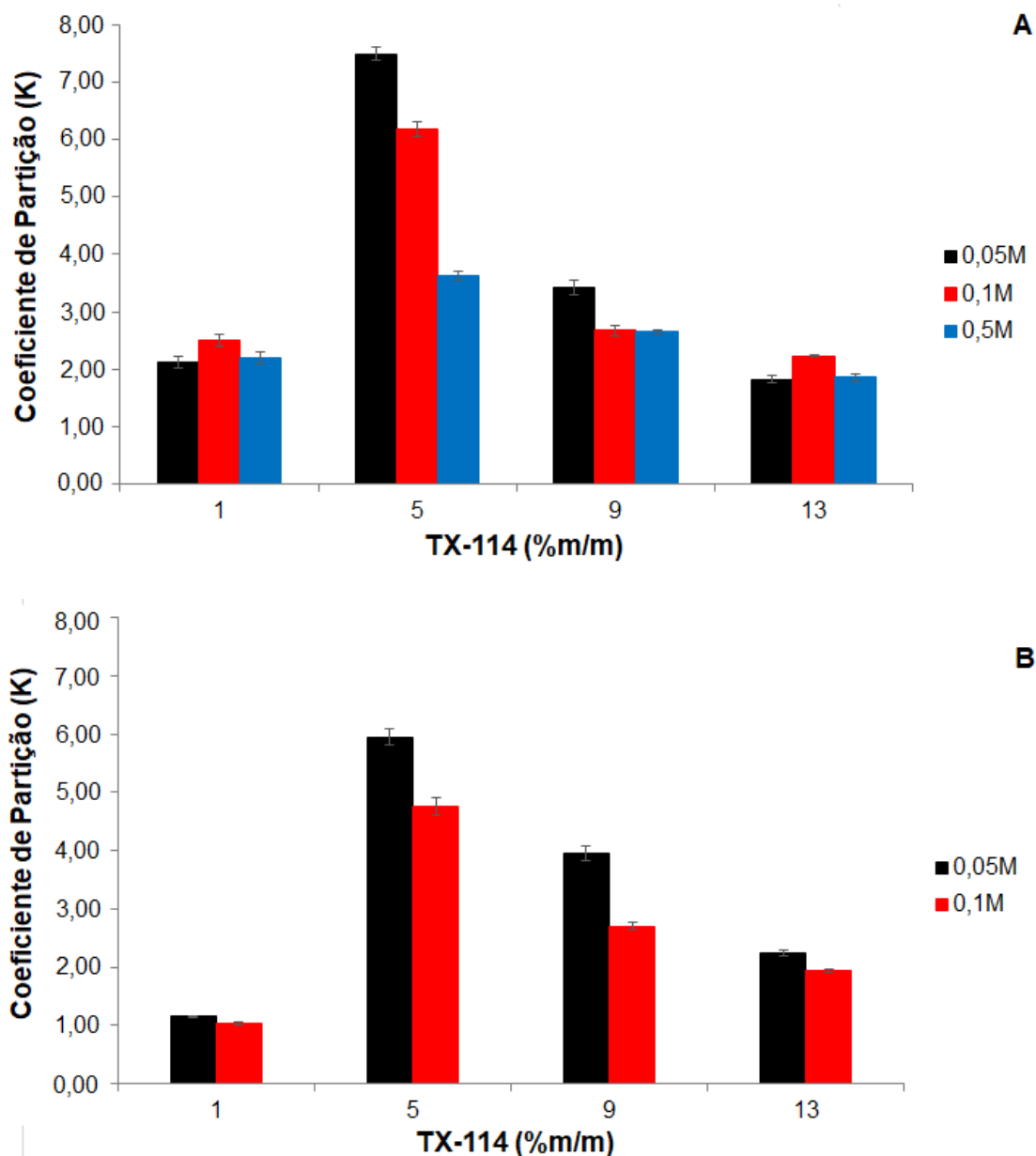
Figura 34. Comparação das curvas binodais dos SMDFA compostos por TX-114 e 0,5 M dos LI [Ch][Pent] e [Ch][Hex].



6.3.3.2. Extração do Colorante Vermelho do Meio Fermentado

Para avaliar a partição do colorante vermelho produzido por *T. amestolkiae* nos SMDFA, montou-se uma série de sistemas com diferentes concentrações de TX-114, dos LI [Ch][Pent] e [Ch][Hex], com água e na presença/ausência do meio fermentado contendo o colorante vermelho. Os resultados obtidos para estes sistemas estão presentes na **Figura 35** e nas **Tabelas S14 e S15 do Material Suplementar**. A temperatura de incubação para cada sistema está apresentada na **Tabela S9 do Material Suplementar**.

Figura 35. Coeficiente de partição do corante vermelho proveniente do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae* utilizando-se SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114 (3-15% (m/m)), tampão McIlvaine pH 6,5 e diferentes concentrações (0,05, 0,1 e 0,5 M) dos LI [Ch][Pent] (A) e [Ch][Hex] (B). As barras de erro representam 95% de limites de confiança para as medições.

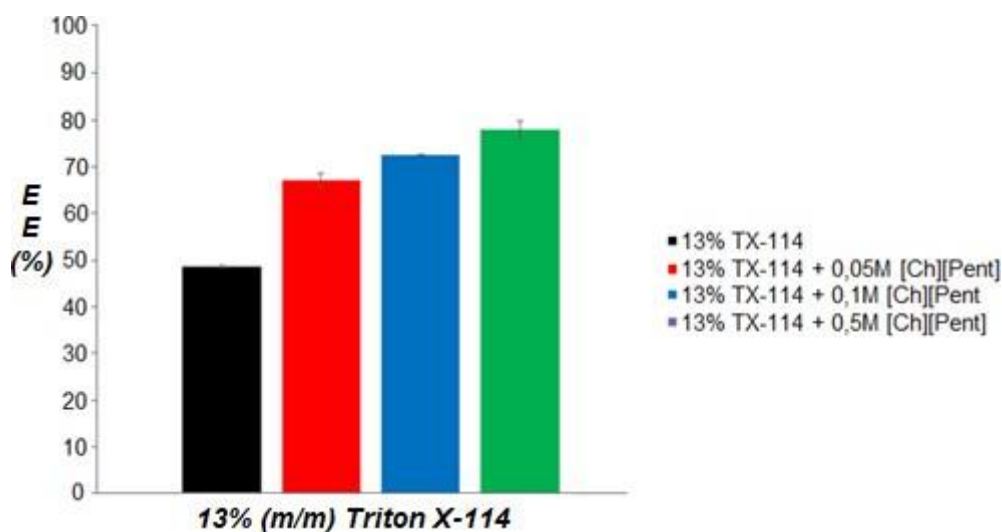


Assim como na família dos imidazólios, o corante vermelho também particionou preferencialmente para a fase rica em micelas, com exceção dos sistemas compostos por 1% (m/m) de TX-114 e [Ch][Hex], independente da concentração do LI. A presença de LI da família das colinas promoveu maiores valores de K do corante vermelho, quando comparado com os sistemas

compostos por LI da família dos imidazólios. O aumento da concentração de TX-114 e dos LI faz com que a fase rica em micelas fique mais hidrofóbica, fazendo com que o colorante particione, preferencialmente, para a fase pobre em micelas. Sistemas compostos por 5% (m/m) de TX-114 e 0,05 e 0,1 M de pentanoato de colina (**Figura 35A**) apresentam valores de K de 7,49 e 6,17, respectivamente, sendo estes valores maiores do que aqueles encontrados para os SMDFA compostos por 3% (m/m) de TX-114 e 0,1% (m/m) de [C₁₀mim]Cl, enquanto o sistema composto pela mesma massa de TX-114 e 0,05M de hexanoato de colina (**Figura 35B**) apresentou valor de K igual a 5,97. Os resultados para os sistemas compostos por 0,5 M de hexanoato de colina não foram obtidos, pois o T_{cp} destes sistemas foi maior que 70 °C.

Os resultados para a EE (%) dos SMDFA compostos por LI da família das colinas estão presentes nas **Tabelas S21 e S22 do Material Suplementar**. Foi possível verificar que conforme se aumentava a concentração de TX-114 e/ou de LI no sistema, as EE (%) eram maiores; o sistema composto por 13% (m/m) de TX-114 apresentou EE (%) de 48,54%, enquanto os sistemas compostos por 13% (m/m) de TX-114 e 0,1 M de [Ch][Pent] e [Ch][Hex] apresentaram EE (%) de 66,93 e 74,01%, respectivamente, indicando que a adição de pequenas quantidades destes LI levaram a uma melhora considerável do EE (%). A **Figura 36** apresenta a comparação de EE (%) para sistemas compostos somente por TX-114 e sistemas compostos por TX-114 e [Ch][Pent], indicando que conforme a concentração de LI aumenta, a EE (%) também aumenta.

Figura 36. Comparação entre as eficiências de extração de sistemas compostos por 13% (m/m) de TX-114, na presença ou ausência do líquido iônico [Ch][Pent] em diferentes concentrações.



Outro ponto importante para ressaltar é que sistemas compostos [Ch][Hex] apresentaram melhores EE (%) do que os sistemas compostos por [Ch][Pent]. Porém, apesar de os sistemas com 13% (m/m) de TX-114 e compostos por LI da família das colinas apresentarem EE (%) melhores do que aqueles obtidos para os sistemas compostos apenas por TX-114, estes mesmos possuem um K muito baixo (próximo a 2), indicando o mesmo fenômeno que ocorreu com os SMDFA compostos por LI da família dos imidazólios, onde não necessariamente os sistemas com melhores EE (%) apresentam os melhores K.

A partir dos dados obtidos através da análise da partição do meio fermentado e sua leitura nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm foi possível determinar a seletividade dos SMDFA para o colorante vermelho (490 nm) em relação aos colorantes amarelo (400 nm) e laranja (470 nm), também produzido pelo fungo *T. amestolkiae*.

Como é possível se verificar nas **Tabelas S26 e S27 do Material Suplementar**, todos os sistemas compostos por [Ch][Pent] mostraram-se mais seletivo para o colorante vermelho do que para o amarelo e laranja, enquanto os sistemas compostos por 1% (m/m) TX-114 e 0,05 e 0,1 M de [Ch][Hex] foram pouco seletivos para o colorante vermelho.

Outro ponto importante que deve ser ressaltado é que sistemas compostos por LI da família das colinas apresentaram seletividade mais alta e com variações menores quando comparados com sistemas compostos por LI da família das colinas ($Se_{5\%TX-114 + 0,05M [Ch][Pent]} = 2,37$; $Se_{5\% TX-114 + 0,1\% [C8mim]Cl} = 1,46$).

6.3.3.3. *Dispersão dos Líquidos Iônicos*

A condutividade de ambas as fases dos SMDFA compostos por LI da família das colinas foi medida e estão apresentadas na **Tabela S29 do Material Suplementar**. Assim como ocorre com LI da família dos imidazólios, há uma dispersão dos íons em ambas as fases, porém, com o aumento da concentração de LI a condutividade aumenta mais na fase *top* do que na fase *bottom*. Esta variação na dispersão dos LI da família das colinas quando comparada com a dos da família dos imidazólios ocorre pois, os LI da família das colinas comportam-se como sais, portanto apresentam maior afinidade pela fase rica em água, enquanto os LI da família dos imidazólios apresentam característica de surfactantes e, portanto, tem maior afinidade pela fase rica em micelas (*bottom*).

Sistemas compostos por 1% (m/m) de TX-114 e 0,05M [Ch][Pent] apresentam condutividade na fase *top* de 0,98 mS/cm e de 0,09 mS/cm na fase *bottom* enquanto o sistema composto por 1% (m/m) TX-114 e 0,5M [Ch][Pent] apresenta na fase *top* e *bottom* condutividade de 5,46 e 1,61 mS/cm, respectivamente.

Conclusões

Os resultados obtidos neste projeto indicam que SMDFA podem ser uma técnica alternativa de extração de colorantes do seu meio fermentado, pois apresentam bom coeficiente de partição, baixo custo dos componentes dos sistemas, redução do tempo necessário para extração (3 horas, aproximadamente), além de ser possível o *scale-up* de tais sistemas, o que consistem em características interessantes para aplicação industrial

- O meio fermentado liofilizado foi insolúvel na maioria dos solventes utilizados. Apesar disso, a extração da molécula do colorante vermelho mostrou-se satisfatória perante acidificação do meio fermentado seguida por extração com acetato de etila.
- O extrato de acetato de etila demonstrou a presença de duas substâncias majoritárias, uma de coloração vermelha e outra de coloração roxa escura. A subfração de coloração vermelha não apresetou massa suficiente para se realizar os ensaios de caracterização estrutural. Para a subfração de coloração roxa, na análise por RMN e Massas foi possível identificar uma molécula com massa de 542 u, com três carboxilas, um substituinto de ácido glutâmico e cadeia alquílica com 8 carbonos. Além disso, seu cromóforo coloca esta molécula na classe das azafilonas.
- Quanto a estabilidade da molécula do colorante vermelho, verificou-se que a molécula do colorante é estável: em temperaturas de até 45 °C por um período de exposição de 48 horas; em concentrações de até 15% (m/m) do surfactantes não-iônico TX-114; em concentrações de até 1,0 M de LI da família dos imidazólios; em concentrações de até 0,5 M de LI da família das colinas.
- Em relação as curvas binodais verificou-se que: o aumento da concentração de TX-114 leva a um aumento da temperatura necessária para a separação de fases; maiores concentrações de LI, independente da família, acarretam em aumento da T_{cp} ; o meio fermentado, em sistemas compostos por TX-114 e TX-114 + LI da família das imidazólios, também acarreta em aumento da temperatura necessária para se separar as fases, enquanto que para sistemas compostos por TX-114 + LI da família das colinas, leva a uma diminuição da temperatura necessária para a separação de fases.

- Quanto a partição do corante vermelho utilizando SMDFA foi possível verificar que menores concentrações de TX-114 apresentam os melhores coeficientes de partições.
- Na extração do corante utilizando sistemas compostos por TX-114 e LI da família dos imidazólios, verificou-se que a adição de pequenas quantidades de LI, ajudou a melhorar o K (3% TX-114 + 0,1% [C₁₀mim]Cl = 6,16); A temperatura se mostrou como variável de influência para a partição, uma vez que temperaturas maiores de incubação dos SMDFA levaram as melhores coeficientes de partição (K 25°C = 6,56; K 45°C = 24,40).
- Na extração utilizando sistemas compostos por TX-114 e LI da família das colinas, verificou-se que a adição de pequenas quantidades de LI também melhorava o K, sendo que estes sistemas apresentaram os melhores resultados de partição (7,49 em sistema composto por 5% TX-114 e 0,5M de [CH]Pent).

Bibliografia

ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.

AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B.V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1631-1643, 2015. DOI: 10.1007/s00253-015-7231-8.

ALBERTSSON, P.A. Partition of Cell Particles and Macromolecules: Separation and Purification of Biomolecules, Cell Organelles, Membranes, and Cells in Aqueous Polymer Two Phase Systems and Their Use Biochemical Analysis, terceira ed., Wiley-Interscience, Nova York, 1986.

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 213, n. 1, p. 251-273, 2010. DOI: 10.1007/s11270-010-0382-4.

ALMEIDA, M.R. et al. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 128, p. 1-10, 2014. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.03.004.

AMID, M. et al. Purification of a novel protease enzyme from kesinai plant (*Streblus asper*) leaves using a surfactant-salt aqueous micellar two-phase system: a potential low cost source of enzyme and purification method. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 4, p. 601-608, 2013. DOI: 10.1007/s00217-013-2037-3.

AMID, M. et al. A Novel Aqueous Micellar Two-Phase System Composed of Surfactant and Sorbitol for Purification of Pectinase Enzyme from *Psidium guajava* and Recycling Phase Components. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 9, 815413, 2015. DOI: 10.1155/2015/815413.

AMID, N. et al. A novel aqueous micellar two phase system composed of surfactant and mannitol for purification of polygalacturonase enzyme from *Durio zibethinus* murry and recycling phase components. **Separation Science and Technology**, v. 51, n. 6, p. 968-975, 2016. DOI: 10.1080/01496395.2016.1142562.

AMIRI-RIGI, A.; ABBASI, S. Microemulsion-based lycopene extraction: effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments. **Food Chemistry**, v. 15, n. 197, p. 1002-1007, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.11.077.

ANGELL, C.A. et al. Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids: Physical Chemistry and Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 11, p. 1228-1236, 2007. DOI: 10.1021/ar7001842.

ARAI, T. A. et al. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. **AMB Express**, v. 3, n. 19, 2013. DOI: 10.1186/2191-0855-3-19.

ARICI, M. et al. Tulip petal as a novel natural food colorant source: Extraction optimization and stability studies. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 215-222, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.07.003.

ARZOUMANIAN, H. et al. Drastic fluorescence enhancement and photochemical stabilization of cyanine dyes through micellar systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 2, p. 847-848, 1980. DOI: 10.1021/ja00522a072.

ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 18, p. 1-10, 2012. DOI: 0.1016/j.chroma.2012.03.049.

BAI, B. et al. Thermodynamics of micellization of alkylimidazolium surfactants in aqueous solution. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 40, p. 1509-1516, 2008. DOI: 10.1016/j.jct.2008.05.016.

BARNETT, J.R. et al. Colour and art: a brief history of pigments. **Optic & Laser Technology**, v. 38, n. 4, p. 445-453, 2006. DOI: 10.1016/j.optlastec.2005.06.005.

BECHTOLD, R.; MUSSAK, R. Front Matter, in Handbook of natural colorants. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. DOI: 10.1002/9780470744970.fmatter.

BEHERA, K.; PANDEY, S. Interaction between ionic liquid and zwitterionic surfactant: A comparative study of two ionic liquids with different anions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 196-205, 2009. DOI: 10.1016/j.jcis.2008.11.008.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Practical experiences from the development of aqueous two- phase processes for the recovery of high value biological products. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 133-142, 2008. DOI: 10.1002/jctb.1844.

BHATT, D. et al. Studies on surfactant-ionic liquid interaction on clouding behavior and evaluation on thermodynamic parameters. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, p. 547-557, 2013. DOI: 10.1007/s11743-012-1414-4.

BHATTACHARJEE, J. et al. Tween 80-Sodium Deoxycholate Mixed Micelles: Structural Characterization and Application in Doxorubicin Delivery. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 49, p. 16414-16421, 2010. DOI: 10.1021/jp108225r.

BINKS, B.P.; DESFORGES, A. synergistic stabilization of emulsions by a mixture of surface-active nanoparticles and surfactant. **Langmuir**, v. 23, p. 1098-1106, 2006. DOI: 10.1021/la062510y.

BLESIC, M. et al. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. **Green Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 481-490, 2007. DOI: 10.1039/b615406a.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 Solution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation, in: E.J. Vandamme (Ed.), *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Marcel Decker. Nova York, p. 225-235, 1984.

CAI, Y. et al. Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p. 4491-4495, 1998. DOI: 10.1021/jf980457g.

CAÑAMARES, M.V.; LOMBARDI, J.R. Raman, SERS, and DFT of mauve dye: adsorption on Ag nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 25, p. 14297-14303. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b02619.

CAPELLO, C. et al. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007. DOI: 10.1039/b617536h

CAROCHO, M.V. et al. Adding molecules to food, pros and cons: a review of synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014. DOI: 10.1111/1541-4337.12065.

CARTA, G.; JUNGBAUER, A. *Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up*. Weinheim: Editora Wiley, 2010.

CHAN-BACAB, M. J. et al. Characterization and dyeing potential of colorant-bearing plants of the Mayan area in Yucatan Peninsula, Mexico. **Journal of Cleaner Production**, v. 91, p. 191-200, 2015. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.12.004

CHEN, L.G.; BERMUDEZ, H. Charge screening between anionic and cationic surfactants in ionic liquids. **Langmuir**, v. 29, n. 9, p. 2805-2808, 2013. DOI: 10.1021/la304786q.

CHENG, M.J. et al Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their antiinflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 567-571, 2012. DOI: 10.1016/j.phytol.2012.05.015.

CHIU, A.G. et al. Baby shampoo nasal irrigations for the symptomatic post-functional endoscopic sinus surgery patient. **American Journal of Rhinology**, v. 22, n. 1, p. 34-37, 2008. DOI: 10.2500/ajr.2008.22.3122.

CHOWDHURY, S.A. et al. Distillable ionic liquid extraction of tannins from plant materials. **Green Chemistry**, v. 12, p. 1023-1028, 2010. DOI: 10.1039/b923248f.

CHUO, S.C. et al. A new method of extraction of amoxicillin using mixed reverse micelles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 137-144, 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2014.03.107.

CLINT, J.H. Surfactant aggregation. Nova York: Springer Science+Business Media, 1992.

CAMPETELLA, M., et al. Is a medium-range order pre-peak possible for ionic liquids without an aliphatic chain? **RSC Advances**, v 5, p. 50938-50941, 2015. DOI: 10.1039/C5RA07567J

COMELLES, F. et al. Interaction of nonionic surfactants and hydrophilic ionic liquids in aqueous solutions: can short ionic liquids be more than a solvent? **Langmuir**, v. 28, n. 41, p. 14522-14530, 2012. DOI: 10.1021/la302501j.

CUI, X. et al. Mechanism of the mixed surfactant micelle formation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 23, p. 7808-7018. DOI: 10.1021/jp101032z.

DABAS, D. et al. A Colored Avocado Seed Extract as a Potential Natural Colorant. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. 1335-1341, 2011. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02415.x.

DERMIBAS, A. et al. Utilization of surfactant flooding processes for enhanced oil recovery (EOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 33, p. 1331-1339, 2015. DOI: 10.1080/10916466.2015.1060503.

DERMIKI, G. et al. Recovery of astaxanthin using colloidal gas aphanes (CGA): a mechanistic study. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1m p. 54-64, 2009. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.12.023.

DICKINSON, Q. et al. Mechanism of imidazolium ionic liquids toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* and rational engineering of a tolerant, xylose-fermenting strain. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 17, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0417-7.

DING, X. et al. Extraction of ovalbumin with gemini surfactant reverse micelles – effect of gemini surfactant structure. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 367-373, 2016. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.12.042.

DOMINGUEZ, A. et al. Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 10, p. 1227-1231, 1997. DOI: 10.1021/ed074p1227.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.09.007.

DUFOSSÉ, et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.02.006.

FENG, Y. et al. *Monascus* pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1421-1440, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4504-3.

FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.A. et al. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 11-17, 2013. DOI: 10.1007/s11130-013-0337-1.

FLIEGER, J.; CZAJKOWSKA-ZELAZKO, A. Aqueous two-phase system based on ionic liquid for isolation of quinine from human plasma sample. **Food Chemistry**, v. 166, p. 150-157, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.

FOOD & DRUG ADMINISTRATION (FDA) *Color additive status list*. Acessado em: 29 de Agosto de 2018. <
<https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm106626.htm>>

FOURNIER, F. et al. Physico-chemical characterization of lake pigments based on montmorillonite and carminic acid. **Applied Clay Science**, v. 130, p. 12-17, 2016. DOI: 10.1016/j.clay.2016.01.046

FREIRE, M.G. et al. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4966-4995, 2012. DOI: 10.1039/c2cs35151j.

FREUDENMANN, D. et al. Ionic liquids: new perspectives for inorganic synthesis. **Angewandte Chemical International Edition**, v. 50, p. 11050-11060, 2011. DOI: 10.1002/anie.201100904.

FRISVAD, J.C. et al. *Talaromyces atroseus*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, e84102, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0084102.

GADILOHAR, B.L.; SHANKARLING, G.S. Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 227, p. 234-261, 2017. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.11.136.

GARCIA, M.T. et al. Aggregation behavior and antimicrobial activity of ester-functionalized imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids in aqueous solution. **Langmuir**, v. 29, n. 8, p. 2536-2545, 2013. DOI: 10.1021/la304752e.

GHANDI, K. A review of ionic liquids, their limits and applications. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 44-53, 2014. DOI: 10.4236/gsc.2014.41008.

GIMÉNEZ, P.J. et al. Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 380-387, 2015. DOI: 10.1007/s11130-015-0499-0.

GREAVES, T.L.; DRUMMOND, C.J. Protic ionic liquids: properties and applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 206-237, 2008. DOI: 10.1021/cr068040u.

GREAVES, T.L.; DRUMMOND, C.J. Protic ionic liquids: evolving structure–property relationships and expanding applications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 20, p. 11379-11448, 2015. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00158.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. Clouding of Triton X- 114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X- 114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 104, p. 307-312, 1995. DOI: 10.1016/0927-7757(95)03217-1.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 147, p. 365-370, 1999. DOI: 10.1016/S0927-7757(98)00710-9.

GUILLÉN et al. Global risk-based management of chemical additives I. The handbook of environmental chemistry. 18 ed. Londres: Editora Springer, 2012.

GUO, J. et al. Pineapple peel bromelain extraction using gemini surfactant-based reverse micelle – role of spacer of gemini surfactant. **Separation and Purification Technology**, v. 190, 2017. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.08.051.

GUTWOSKI, K.E. et al. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 22, p. 6632-6633, 2003. DOI: 10.1021/ja0351802.

HANNO, I. et al. Green cosmetic surfactant from rice: characterization and Application. **Cosmetics**, v. 2, n. 4, p. 322-341, 2015. DOI: 10.3390/cosmetics2040322.

HAYES, R. et al. Structure and nanostructure in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 13, p. 6357-6426, 2015. DOI: 10.1021/cr500411q.

HE, L. et al. Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1007, p. 39-45, 2003. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00987-7.

HEMAVATHI, A.B. et al. Mixed reverse micellar systems for extraction and purification of β -glucosidase. **Separation and Purification Technology**, v. 71, n. 2, p. 263-268, 2010.

HEMMATEENEJAD, B. et al. Aggregation of imidazolium based ionic liquids in binary methanol-water solvents: a linear solvation free energy relationship study. **Journal of Molecular Liquids**, v. 160, n. 1, p. 35-39, 2011. DOI: 10.1016/j.molliq.2011.02.011.

HILL, D.J. Is there a future for natural dyes? **Coloration Technology**, v. 27, n. 1, p. 18-25, 1997. DOI: 10.1111/j.1478-4408.1997.tb03771.x.

HOLMBERG, K. et al. Surfactant micellization in *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. @ ed. 2, Inglaterra: John Wiley & Sons, 2002.

HSU, W.H.; PAN, T.M. *Monascus purpureus* fermented products and oral cancer: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1831-1842, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-3891-9.

HUANG, Z.; GU, T. The effect of mixed cationic-anionic surfactants on the cloud point of nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 138, n. 2, p. 580-582, 1990. DOI: 10.1016/0021-9797(90)90239-K

IM, S.H. et al. Simultaneous analysis of anionic, amphoteric, nonionic and cationic surfactant mixtures in shampoo and hair conditioner by RP-HPLC/ELSD and LC/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, p. 129-136, 2008. DOI: 10.1016/j.aca.2008.03.058.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 18, 2016. DOI: 10.1186/s12575-016-0048-8.

ISHIKAWA, M. et al. Pure ionic liquid electrolytes compatible with a graphitized carbon negative electrode in rechargeable lithium-ion batteries. **Journal of Power Sources**, v. 162, p. 658-662, 2006. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2006.02.077.

ISLAM, S. et al. Perspectives for natural products-based agents derived from industrial plants in textile applications—a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 2-18, 2013. DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.06.004.

JARAMILLO, P.M.D et al. Liquid–liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 452-457, 2013. DOI: 10.1016/j.seppur.2013.09.020.

JAYAKRISHNAN, T.; BENJAMIN, S. *Purpureocillium lilacinum* Strain BP12 produces flavoglaucin. **Electronic Journal of Biology**, v. 12, n. 4, p. 472-476, 2016.

JOHNS, M.R.; STUART, D.M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 23-38, 1991. DOI: 10.1007/BF01575587.

JOZALA, A.F. et al. Liquid–liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 107-112, 2008. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2007.08.005.

JUNGNICKEL, C. et al. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A**, v. 316, p. 278-284, 2008. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.09.020.

KAMEI, D.T. et al. Understanding viral partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar systems: 2. Effect of entrained micelle-poor domains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 2, p. 203-216, 2002. DOI: 10.1002/bit.10194.

KEYGHOBADI, R. Mona Lisa speaks Persian: an iranian artist's visual response to an iconic painting. **Visual Inquiry: Learning & Teaching Art**, v. 3, n.1, p. 9-19, 2014. DOI: 10.1386/vi.3.1.9_1.

KOSHY, L. et al. The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton X 100 and Triton X 114. **Colloid and Polymer Science**, v. 274, p. 582-587, 1996. DOI: 10.1007/BF00655234.

KUKUSAMUDE, C. et al. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 81, p. 486-492, 2010. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.029.

KULTHE, S.S. et al. Polymeric micelles: authoritative aspects for drug delivery. **Designed Monomers and Polymers**, v. 15, n. 5, p. 465-521, 2012. DOI: 10.1080/1385772X.2012.688328.

KUMAR, A. et al. Microbial pigments: production and their applications in various industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 203-212, 2015.

KUMARI, L.S. et al. Synthesis and optical properties of $Ce_{0.95}Pr_{0.05-x}M_xO_2$ (M = Mn, Si) as potential ecological red pigments for coloration of plastics. **Ceramics International**, v. 38, n. 5, p. 4009-4016, 2012. DOI: 10.1016/j.ceramint.2012.01.057.

LEI, Z. et al. Introduction: ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 117, p. 6633-6635, 2017. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00246.

LETELLIER, P. et al. Thoughts on the ideal behavior of mixed micelles and the appropriate application of regular solution theory (RST). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 354, n. 1, p. 248-255, 2011. DOI: 10.1016/j.jcis.2010.09.082.

LI, Z. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1336-1346, 2010. DOI: 10.1016/j.trac.2010.07.014.

LIN, Y.L. et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 5, p. 965-973, 2008. DOI: 10.1007/s00253-007-1256-6.

LIU, C.L. et al. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 185-192, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961020)52:2<185::AID-BIT1>3.0.CO;2-M.

LIU, C.L. et al. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, p. 127-138, 1998. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00013-9.

LIU, Y. et al. Effect of excluded-volume and hydrophobic interactions on the partition of proteins in aqueous micellar twophase systems composed of polymer and nonionic surfactant. **Fluid Phase Equilibria**, v. 429, p. 1-8, 2016. DOI: 10.1016/j.fluid.2016.08.026.

LOPES, F.C. et al. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 3, p. 616-625, 2013. DOI: 10.1007/s12010-013-0392-y.

LOPES, A.M. et al. Influence of salts on the coexistence curve and protein partitioning in nonionic aqueous two-phase micellar systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 1057-1064, 2014. DOI: 10.1590/0104-6632.20140314s00002677.

LOYPIMAI, P. et al. Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 461-470, 2015. DOI: 10.1007/s13197-015-2002-1.

ŁUCZAK, J. et al. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 329, p. 125-133, 2008. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.07.012.

MAIBAUM, L. Micelle formation and the hydrophobic effect. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 21, p. 6778-6781, 2004. DOI: 10.1021/jp037487t.

MALIK, K. et al. Microbial pigments: a review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.

MALPIEDI, L.P. et al. Aqueous micellar systems containing Triton X-114 and *Pichia pastoris* fermentation supernatant: a novel alternative for single chain-

antibody fragment purification. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 295-301, 2014. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.05.045.

MAPARI, S.A.S. et al. Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9981-9989, 2008. DOI: 10.1021/jf801817q.

MAPARI, S.A.S. et al. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6253-6261, 2009a. DOI: 10.1021/jf900113q.

MAPARI, S.A.S. et al. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 24, 2009b. DOI: 10.1186/1475-2859-8-24.

MAPARI, S.A.S. et al. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.03.004.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512-520, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.013.

MASHAYEKHI, F. et al. Concentration of mammalian genomic DNA using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1613-1623, 2009. DOI: 10.1002/bit.22188.

MASHAYEKHI, F. et al. Enhancing the lateral-flow immunoassay for viral detection using an aqueous two-phase micellar system. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 7-8, p. 2955-2961, 2010. DOI: 10.1007/s00216-010-4213-7.

MASONE, D.; CHANFORAN, C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: a computational point of view. **Computational Biology and Chemistry**, v. 56, p. 152-158, 2015. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2015.04.006.

MASWAL, M. et al. Solubilization and co-solubilization of carbamazepine and nifedipine in mixed micellar systems: insights from surface tension, electronic absorption, fluorescence and HPLC measurements. **RSC Advances**, v. 2015, n. 5, p. 7697-7712, 2015. DOI: 10.1039/c4ra09870.

MATHIAS, R.A. et al. Triton X-114 phase separation in the isolation and purification of mouse liver microsomal membrane proteins. **Methods**, v. 54, n. 4, p. 396-406, 2011. DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.01.006.

MEDEIROS, R.A. et al. Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 97, p. 291-297, 2012. DOI: 10.1016/j.talanta.2012.04.033.

MEINICKE, R.M. et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, n. 3, p. 238-242, 2012. DOI: 10.1016/j.bcab.2012.03.001.

MEITZ, A. et al. An antegrated downstream process development strategy along QbD principles. **Bioengineering**, v. 1, p. 213-230, 2014. DOI: 10.3390/bioengineering1040213.

MENU, M.; WALTER, P. Prehistoric cave painting PIXE analysis for the identification of paint "pots". **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 64, n. 1, p. 547-552, 1992.

MIAO, W.; CHAN, T.K. Ionic-liquid-supported synthesis: a novel liquid-phase strategy for organic synthesis. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 12, p. 897-908, 2006. DOI: 10.1021/ar030252f.

MISHRA, M. et al. Basics and potential applications of surfactants – a review. **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n. 4, p. 1354-1365, 2009.

MISKOLCZY, Z. et al. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. **Chemical Physics Letters**, v. 400, p. 296-300, 2004. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.10.127.

MITAL, K.L. Solution chemistry of surfactants. 1 volume, Nova York: Plenum Press, 1979.

MODARESSI, A. et al. Influence of the molecular structure on the aggregation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 302, n. 1-2, p. 181-185, 2007. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.02.020.

MOHD-SETAPAR, S.H. et al. A review of mixed reverse micelle system for antibiotic recovery. **Chemical Engineering Communications**, v. 201, n. 12, p. 1664-1685, 2014. DOI: 10.1080/00986445.2013.819799.

MOROI, Y. Micelles – Theoretical and applied aspects. Nova York: Springer Science+Business Media, 1992.

NAGARAJAN, R. Micellization of binary surfactant mixtures in HOLLAND, P. M.; RUBINGH, D.N. *Mixed Surfactant Systems*. Washington: American Chemical Society, 1992.

NAQVI, A.Z.; KABIR-UD-DIN, S.N. Effect of surfactant structure on the mixed micelle formation of cationic gemini-zwitterionic phospholipid systems. **Colloids**

and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 477, p. 9-18, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.03.009.

NGO, H.L. et al. Thermal properties of imidazolium ionic liquids. **Thermochimica Acta**, v. 357-358, p. 97-102, 2000. DOI: 10.1016/S0040-6031(00)00373-7.

NIKFAR, S.; JABERIDOOST, M. Dyes and Colorants. Reference Module in Biomedical Sciences. Encyclopedia of Toxicology. 3 ed. Editora Elsevier, p. 252-261, 2014.

NUSSELDER, J.J.H.; ENGBERTS, J.B.F.N. Toward a better understanding of the driving force for micelle formation and micellar growth. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 148, n. 2, p. 353-361, 1992. DOI: 10.1016/0021-9797(92)90174-K.

OOI, C.W. et al. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia* sp. ST8 with aqueous micellar two phase system. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 1847-1852, 2011. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.06.014.

PAN, A. et al. Synergism between anionic double tail and zwitterionic single tail surfactants in the formation of mixed micelles and vesicles, and use of the micelle templates for the synthesis of nano-structured gold particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 644-654, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.06.032.

PAN, Y. et al. Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 909-913, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.077.

PATRASCU, C. et al. Micelles in ionic liquids: aggregation behavior of alkyl poly(ethyleneglycol)-ethers in 1-butyl-3-methyl-imidazolium type ionic liquids. **Chemphyschem**, v. 16, n. 7, p. 99-101, 2006. DOI: 10.1002/cphc.200500419.

PATEL, S.K., et al. Studies on synthesis of novel low molecular weight anthraquinone disperse dyes and their application on polyester and nylon. **Journal Indian Chemical Society**, v. 89, n. 6, p. 789-795, 2012.

PATEL, N. et al. Dynamic modelling of aqueous two-phase systems to quantify the impact of bioprocess design, operation and variability. **Food and Bioproducts Processing**, v. 107, p. 10-24, 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.fbp.2017.10.005.

PAULUS, A. et al. Recovery of chymotrypsin using magnetic particles and aqueous micellar two-phase systems: Influence of non-ionic surfactants on enzyme activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 165-170, 2014. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.10.005.

PEI, Y. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 3, n. 12, p. 288-295, 2009. DOI: doi.org/10.1016/j.seppur.2008.10.010.

PENFOLD, J. et al. Structure of mixed anionic/nonionic surfactant micelles: experimental observations relating to the role of headgroup electrostatic and steric effects and the effects of added electrolyte. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 21, p. 10760-10770, 2005. DOI: 10.1021/jp050727f.

PEREIRA, D.N. et al. Marine natural pigments: chemistry, distribution and analysis. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 124-134, 2014. DOI: 10.1016/j.dyepig.2014.06.011.

PEREIRA, J.F.B. et al. Combining ionic liquids and polyethylene glycols to boost the hydrophobic/hydrophilic range of aqueous biphasic systems. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, n. 45, p. 19580-19583, 2013. DOI: 10.1039/c3cp53701c.

PERNAK, J. et al. Choline-derivative-based ionic liquids. **Chemistry – A European Journal**, v. 13, n. 24, p. 6817-6827, 2007. DOI: 10.1002/chem.200700285.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. Purificação de produtos biotecnológicos. 1ª ed, Barueri: Editora Manole Ltda, 2005.

PLECHKOVA, N.; SEDDON, K.R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 1, p. 123-150, 2008. DOI: 10.1039/b006677j.

PORRAS-LOAIZA, P. et al. Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 2, 2013. DOI: 10.1111/ijfs.12339.

POSA, M. et al. Thermodynamic investigation of binary surfactant mixtures of Tween 85/Triton X100 and 85/Triton X165 in water solution – Binary mixed micelles formation. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 106, p. 113-122, 2017. DOI: 10.1016/j.jct.2016.11.028

POURREZA, N. et al. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1465-1469, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.158.

PRAJAPATI, V.S. et al. An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 140-145, 2014. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.08.008.

PRAMANIK, R. et al. Effects of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate ionic liquid on triton x-100 aqueous micelles: solvent and rotational relaxation

studies. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 8, p. 6957-6963, 2011. DOI: dx.doi.org/10.1021/jp111755j.

RAJA, S. et al. Aqueous two-phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2011. DOI: 10.5923/j.scit.20110101.02.

RAKKIMUTHU, R. et al. Effect of temperature, light, pH on the stability of anthocyanin pigments in *Cocculus hirsutus* fruits. **International Journal of Multidisciplinary Research and Modern Education**, 2, n. 2, p. 91-96, 2016.

RANGEL-YAGUI, C.O. et al. Two-phase aqueous micellar systems - an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 4, p. 531-544, 2004. DOI: 10.1590/S0104-66322004000400003.

RAPP, B.E. Surface tension in *Microfluidics: modeling, mechanics and mathematics*. Estados Unidos: Editora Elsevier, 2017.

RICCERI, R. et al. van der Waals interactions in nonionic micelles. **Langmuir**, v. 12, n. 4, p. 913-915, 1996. DOI: 10.1021/la950609r.

RODRIGUEZ-ESCONTRELA, I. et al. Characterization and phase behavior of the surfactant ionic liquid tributylmethylphosphonium dodecylsulfate for enhanced oil recovery. **Fluid Phase Equilibria**, v. 417, n. 15, p. 87-95, 2016. DOI: 10.1016/j.fluid.2016.02.021.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20-26, 2016. DOI: 10.1016/j.cofs.2015.08.004.

ROSA, P.A.J. et al. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2296-2305, 2010. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.11.034.

ROSA, P.A.J. et al. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 559-567, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.006.

ROSEN, M.J.; KUNJAPPU, J.T. *Surfactants and interfacial phenomena*. 4 ed, Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

ROSEN, M.J.; ZHOU, Q. Surfactant-Surfactant interactions in mixed monolayer and mixed micelle formation. **Langmuir**, v. 17, p. 3532-3537, 2001. DOI: 10.1021/la001197b.

RUB, M.A. et al. Study of Mixed Micelles of Promethazine Hydrochloride (PMT) and Nonionic Surfactant (TX-100) Mixtures at Different Temperatures and

Compositions. **Tenside Surfactantes Detergents**, v. 52, n. 3, p. 236-244, 2015.

RUCKENSTEIN, E.; NAGARAJAN, R. Critical micelle concentration. A transition point for micellar size distribution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 79, n. 24, p. 2622-2626, 1975. DOI: 10.1021/j100591a010.

RUPP, C. et al. Solubilization of poorly water-soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 272-280, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.05.025.

RYMBAI, H. et al. Biocolorants and its implications in health and food industry—a review. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 4, p. 2228-2244, 2011.

SAHU, A. et al. Anionic-nonionic mixed surfactant systems: micellar interaction and thermodynamic behavior. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 1156-1169, 2014. DOI: 10.1080/01932691.2014.958852.

SAMANTA, A.K.; AGARWAL, P. Application of natural dyes on textiles. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 34, n. 4, p. 384-399, 2009.

SANTOS, M.S. et al. Effect of electrostatic correlations on micelle formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 533, p. 169-178, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.07.079.

SANTOS, P.L. et al. 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**, v. 112, p. 103-112, 2016. DOI: 10.1016/j.cherd.2016.02.031.

SANTOS, V.C. et al. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1, p. 75-83, 2011. DOI: 10.1016/j.bej.2011.05.011.

SANTOS-EBINUMA, V.C. et al. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 778-785, 2013a. DOI: 10.1002/btpr.1720.

SANTOS-EBINUMA, V.C. et al. Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorant by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 802-810, 2013b. DOI: 10.4014/jmb.1211.11057.

SANTOS-EBINUMA, V.C. et al. Behavior of TX-114 cloud point in the presence of inorganic electrolytes. **Fluid Phase Equilibria**, v. 360, p. 435-438, 2013c.

SANTOS-EBINUMA, V.C. et al. Separation of natural colorants from the fermented broth of filamentous fungi using colloidal gas aphon. **Separation and Purification Technology**, v. 163, p. 100-108, 2016. DOI: 10.1016/j.seppur.2016.02.037.

SARON, C.; FELIZBERTI, M.I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006. DOI: 10.1590/S0100-4042200600010002.

SCHRAMM, L.L.; MARANGONI, D.G. Surfactants and their solutions: basic principles in *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Reino Unido: Editora Cambridge University, 2000.

SEHGAL, P. et al. Interaction and stability of mixed micelle and monolayer of nonionic and cationic surfactant mixtures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 30, p. 1050-1058, 2009. DOI: 10.1080/01932690802598838.

SHAHID, M. et al. Recent advancements in natural dye applications: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310-331, 2013. DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.03.031.

SHARMA, S. et al. Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. **Food Chemistry**, v. 185, p. 284-288, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.106.

SHI, Y.C.; PAN, T.Z. Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU568-fermented products: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, n. 4, p. 1207-1217, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3202-x.

SHIMOMURA, T. et al. Solvation structure of imidazolium cation in mixture of [C4mim][TSAF] ionic liquids and diglyme by NMR measurements and MD simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 13, p. 2873-2881. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b11743

SHOW, P.L. et al. Review of microbial lipase purification using aqueous two-phase systems. **Current Organic Chemistry**, v. 2015, n. 19, p. 19-29, 2015. DOI: 1875-5348/15 \$58.00+.00.

SIGURDSON, G. T. Natural colorants: food colorants from natural sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261-280, 2017. DOI: 10.1146/annurev-food-030216-025923.

SILVA, M.S.C. et al. Dextran sulfate/Triton X two-phase micellar systems as an alternative first purification step for clavulanic acid. **Fluid Phase Equilibria**, v. 399, p. 80-86, 2015. DOI: 10.1016/j.fluid.2015.04.026.

SINGH, M.P. et al. Ionic liquids confined in porous matrices: Physicochemical properties and applications. **Progress in Materials Science**, v. 64, p. 73-120, 2014. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2014.03.001.

SLOPA, F. et al. Choline-based ionic liquids: improvement of antimicrobial activity. **Chemistry Select**, v. 1, p. 5909-5919, 2016. DOI: 10.1002/slct.201600864.

SMIRNOVA, N.A. et al. Self-assembly in aqueous solutions of imidazolium ionic liquids and their mixtures with an anionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, p. 793-802, 2009. DOI: 10.1016/j.jcis.2009.04.004.

SOUSA, M.M. et al. A study in mauve: unveiling Perkin's dye in historic sample. **Chemistry – A European Journal**, v. 14, n. 28, p. 8507-8513, 2008. DOI: 10.1002/chem.200800718.

STRUBE, J. et al. Process Development and Design of Downstream Processes. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 83, n. 7, p. 1044-1065, 2011. DOI: 10.1002/cite.201100017.

TAKAHARA, Y.K. et al. Asymmetrically modified silica particles: a simple particulate surfactant for stabilization of oil droplets in water. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 17, p. 6271-6275, 2005. DOI: 10.1021/ja043581r.

TAN, S.S.Y. et al. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. **Green Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 339-345, 2009. DOI: 10.1039/b815310h.

TANG, J. et al. Measurements and correlations of the solid-liquid equilibrium of RbCl/CsCl + [Cnmim]Cl (n = 2, 4, 6, 8) + H₂O ternary systems at T = (288.15, 298.15, and 308.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.59, n. 3, p. 726-735, 2014. DOI: 10.1021/je4007986.

TEIXEIRA, M.F.S. et al. 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.

THAKKAR, K. et al. Investigations on zwitterionic alkylsulfobetaines and nonionic Triton X-100 in mixed aqueous solutions: Effect on size, phase separation and mixed micellar characteristics. **Journal of Molecular Liquids**, v. 209, p. 569-577, 2015. DOI: 10.1016/j.molliq.2015.06.020.

THAKKAR, K. et al. Interaction of imidazolium based ionic liquids with Triton X-100 micelles: investigating the role of the counter ion and chain length. **RSC Advances**, v. 6, n. 43, p. 36314-36326, 2016. DOI: 10.1039/C6RA03086F.

TONG, A. et al. Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 11-16, 1998. DOI: 10.1016/S0003-2670(98)00209-8.

TORRES, F.A.E. et al. Imidazolium-based ionic liquids as co-surfactants in aqueous micellar two-phase systems composed of nonionic surfactants and their aptitude for recovery of natural colorants from fermented broth. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 262-269, 2018. DOI: 10.1016/j.seppur.2017.07.056.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH *Colorantes Market – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2017-2025*. Acessado em 29 de Agosto de 2018. <
<https://www.transparencymarketresearch.com/colorants-market.html>>

TSAI, W-U. et al. Outstanding performance of activated graphene based supercapacitors in ionic liquid electrolyte from -50 to 80°C. **Nano Energy**, v. 2, n. 3, p. 403-411, 2013. DOI: 10.1016/j.nanoen.2012.11.006.

VALKENBURG, M.E.V. et al. Thermochemistry of ionic liquid heat-transfer fluids. **Thermochimica Acta**, v. 425, p. 181-188, 2005. DOI: 10.1016/j.tca.2004.11.013.

VELMUGURAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.07.058.

VENDRUSCOLO, F. et al. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 279-284, 2013. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.03.008.

VENKATACHALAM, M. et al. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, p. 38-47, 2018. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.12.036.

VENKATESAN, P. et al. Hydrogen bonding in micelle formation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 15, p. 6955-6956, 1994. DOI: 10.1021/ja00094a068.

VENTURA, S.P.M. et al. Isolation of natural red colorants from fermented broth using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 507-516, 2013. DOI: 10.1007/s10295-013-1237-y.

VICENTE, F.A. et al. Design of novel aqueous micellar two-phase system using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of (bio)molecules. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 259-267, 2014. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.06.045.

VICENTE, F.A. et al. Recovery of Bromelain from pineapple stem residues using aqueous micellar two-phase systems with ionic liquids as co-surfactants. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.01.004.

VIDAL, L. et al. Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 19-41, 2012. DOI: 10.1016/j.aca.2011.11.050.

VIS, M. Interfacial Thermodynamics of Coexisting Aqueous Polymer Solutions. Utrecht University, 2015.

XU, W. et al. Synergistic effect of mixed cationic/anionic collectors on flotation and adsorption of muscovite. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 492, p. 181-189, 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.11.003.

WALDEN, P. Molecular Weights and Electrical Conductivity of Several Fused Salts. **Bulletin of the Russian Academy of Sciences**, v. 8, p. 405-422, 1914.

WALLACE, T.; GIUSTI, M. determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 241-248, 2008. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.00706.x.

WAN, J. et al. Reverse micellar extraction of bromelain from pineapple peel – effect of surfactant structure. **Food Chemistry**, n. 197, p. 450-456, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.10.145.

WANG, G-Y. et al. Aggregation behaviors of mixed systems for imidazole based ionic liquid surfactant and Triton X-100. **Journal of Molecular Liquids**, v. 232, p. 55-61, 2017. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.02.044.

WANG, H.S. et al. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 496-502, 2006. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.04.001.

WANG, P. et al. A solvent-free, $\text{SeCN}^-/(\text{SeCN})_3^-$ based ionic liquid electrolyte for high-efficiency dye-sensitized nanocrystalline solar cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 23, p. 7164-7165, 2004. DOI: 10.1021/ja048472r.

WANG, P. et al. A new ionic liquid electrolyte enhances the conversion efficiency of dye-sensitized solar cells. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 48, p. 13280-13285, 2003. DOI: 10.1021/jp0355399.

WANG, S.; WANG, X. Imidazolium ionic liquids, imidazolylidene heterocyclic carbenes, and zeolitic imidazolate frameworks for CO_2 capture and photochemical reduction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, p. 2308-2320, 2016. DOI: 10.1002/ange.201507145.

WANG, S. et al. Partitioning behavior of enhanced green fluorescent protein in nickel-chelated affinity-based aqueous two-phase micellar system and its purification from cell lysate. **Separation and Purification Technology**, v. 133, p. 149-154, 2014. DOI: 10.1016/j.seppur.2014.07.005.

WEI, J. et al. Efficiency of single and mixed Gemini/conventional micelles on solubilization of phenanthrene. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 1, p. 201-207, 2011. DOI: 10.1016/j.cej.2010.12.063.

WEYERSHAUSEN, B.; LEHMANN, K. Industrial application of ionic liquids as performance additives. **Green Chemistry**, v. 7, p. 15-19, 2005. DOI: 10.1039/B411357H.

WROLSTAD, R.E., PAN, Y.M. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 59-77, 2012. DOI: 10.1146/annurev-food-022811-101118.

YAU, Y.K. et al. Current applications of different type of aqueous two-phase systems. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 49, 2015. DOI: 10.1186/s40643-015-0078-0.

YORDANOVA, D. et al. Micellization and partition equilibria in mixed nonionic/ionic micellar systems: predictions with molecular models. **Langmuir**, v. 33, n. 43, 2017. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02813.

YUSUF, M. et al. Natural colorants: historical, processing and sustainable prospects. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 123-145, 2017. DOI: 10.1007/s13659-017-0119-9.

ZACCARIM, B.R. et al. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from the Amazon, a producer of natural colorants. **Biotechnology Progress**, *In Press*, 2018. DOI: 10.1002/btpr.2684.

ZHANG, H. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 186-192, 2006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.028.

ZHANG, Y.; CREMER, P.S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 658-663. 2006. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020.

ZHAO, H.; MALHOTRA, S.V. Applications of ionic liquids in organic synthesis. **Aldrichimica Acta**, v. 35, n. 3, p. 75-83, 2002.

ZHAO, H. Innovative applications of ionic liquids as "green" engineering liquids. **Chemical Engineering Communications**, v. 193, n. 12, p. 1660-1677, 2006. DOI: 10.1080/00986440600586537.

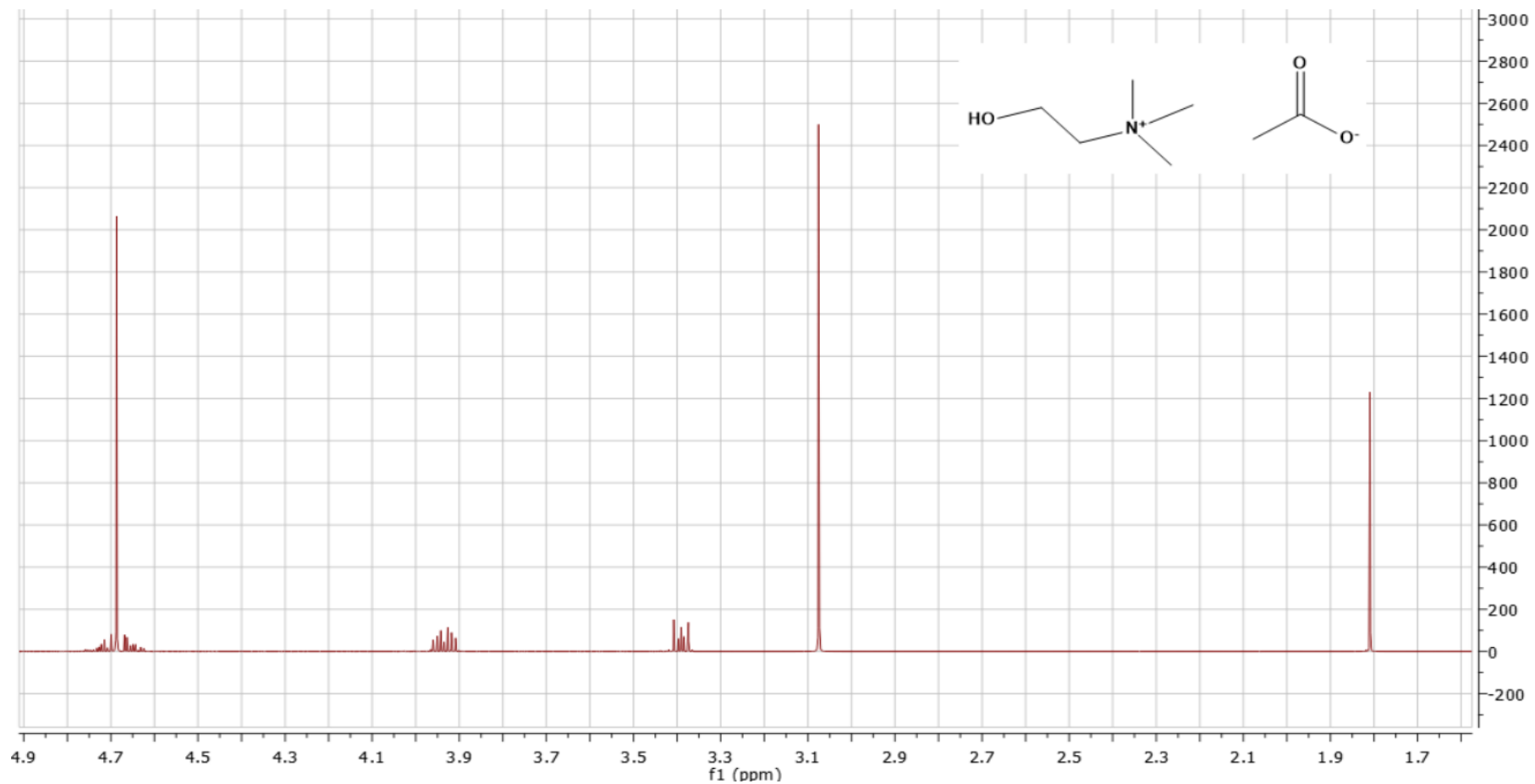
ZHENG, D. et al. A review of imidazolium ionic liquids research and development towards working pair of absorption cycle. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 37, p. 47-68, 2014. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.046.

ZHOU, F. et al. Ionic liquid lubricants: designed chemistry for engineering applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2590-2599, 2009. DOI: 10.1039/b817899m.

ZHU, S. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 325-327, 2006. DOI: 10.1039/b601395c.

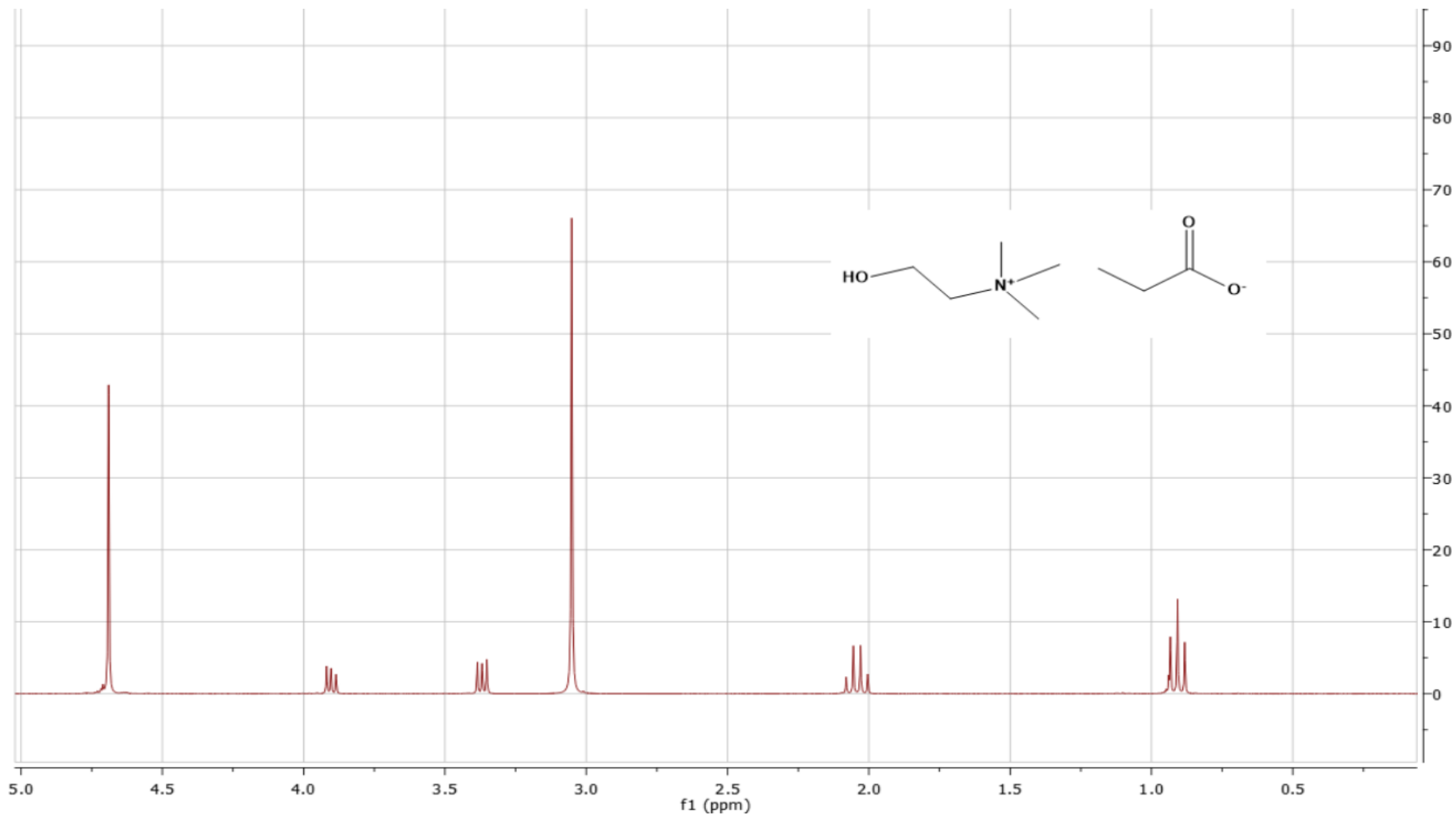
Material Suplementar

Figura S1. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico acetato de colina e sua respectiva estrutura química.



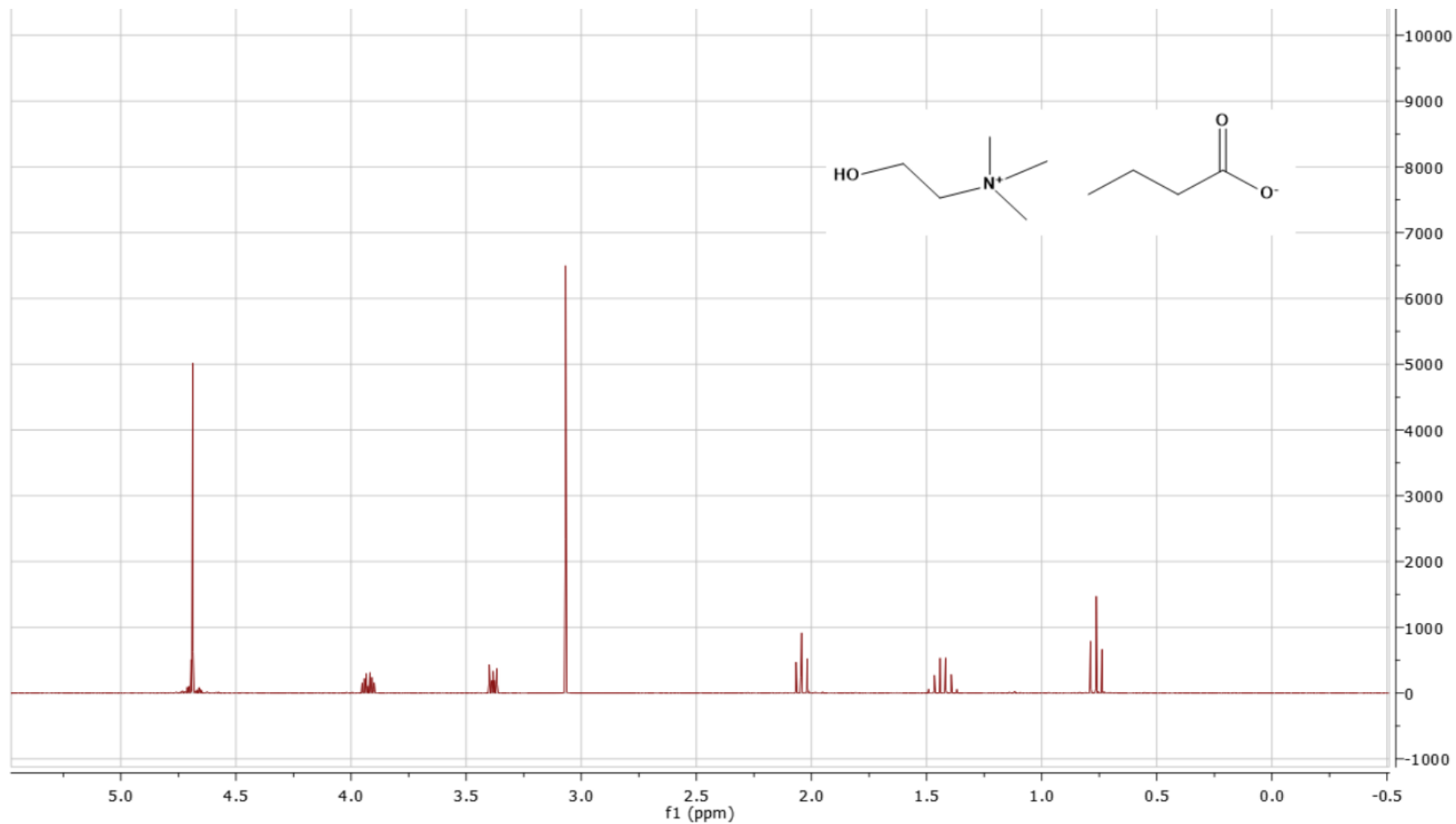
Solvente – água deuterada; Concentração amostra – 1 mg/700 μL

Figura S2. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico propanoato de colina e sua respectiva estrutura química.



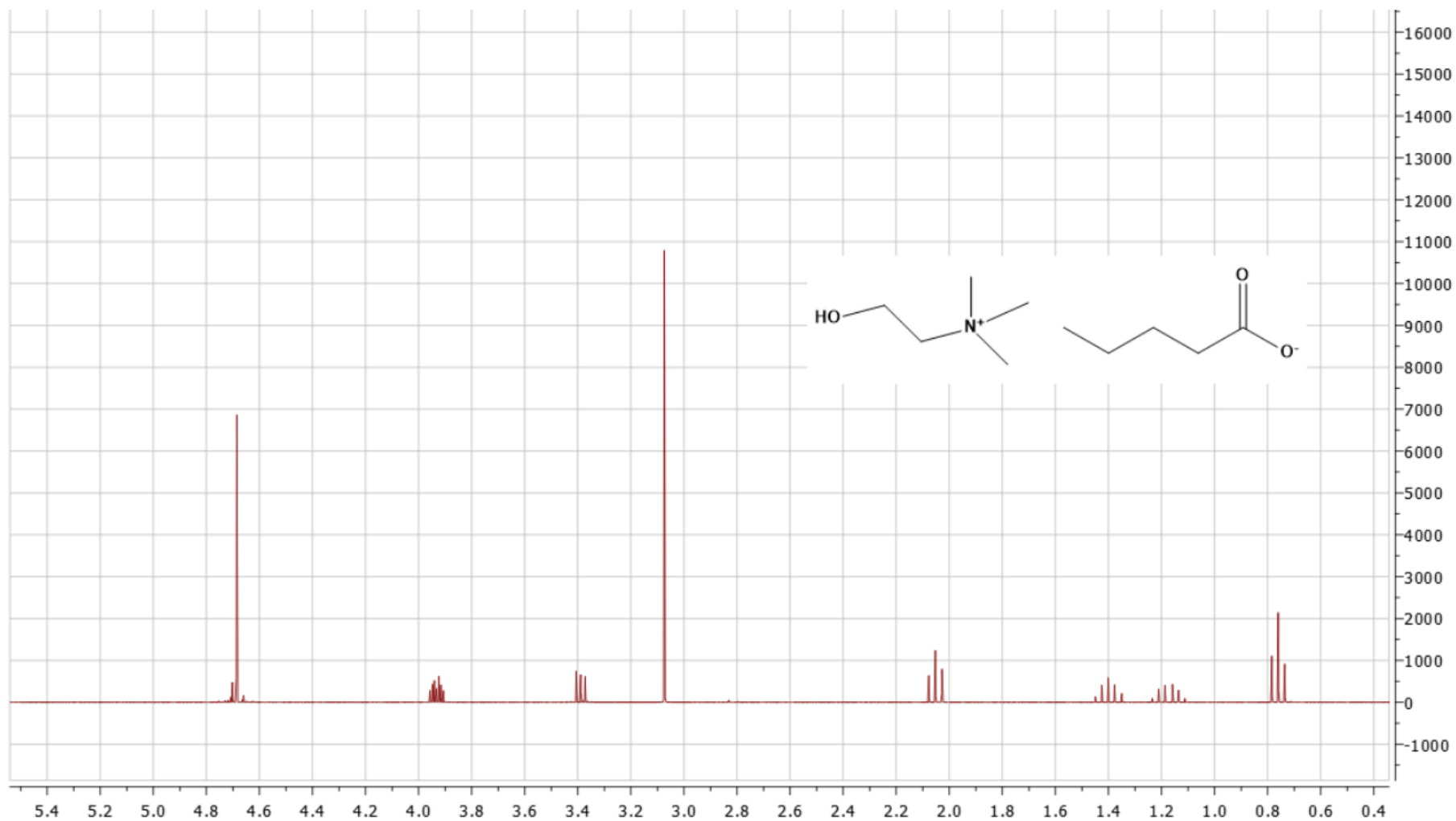
Solvente – água deuterada; Concentração amostra – 1 mg/700 μL

Figura S3. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico butanoato de colina e sua respectiva estrutura química.



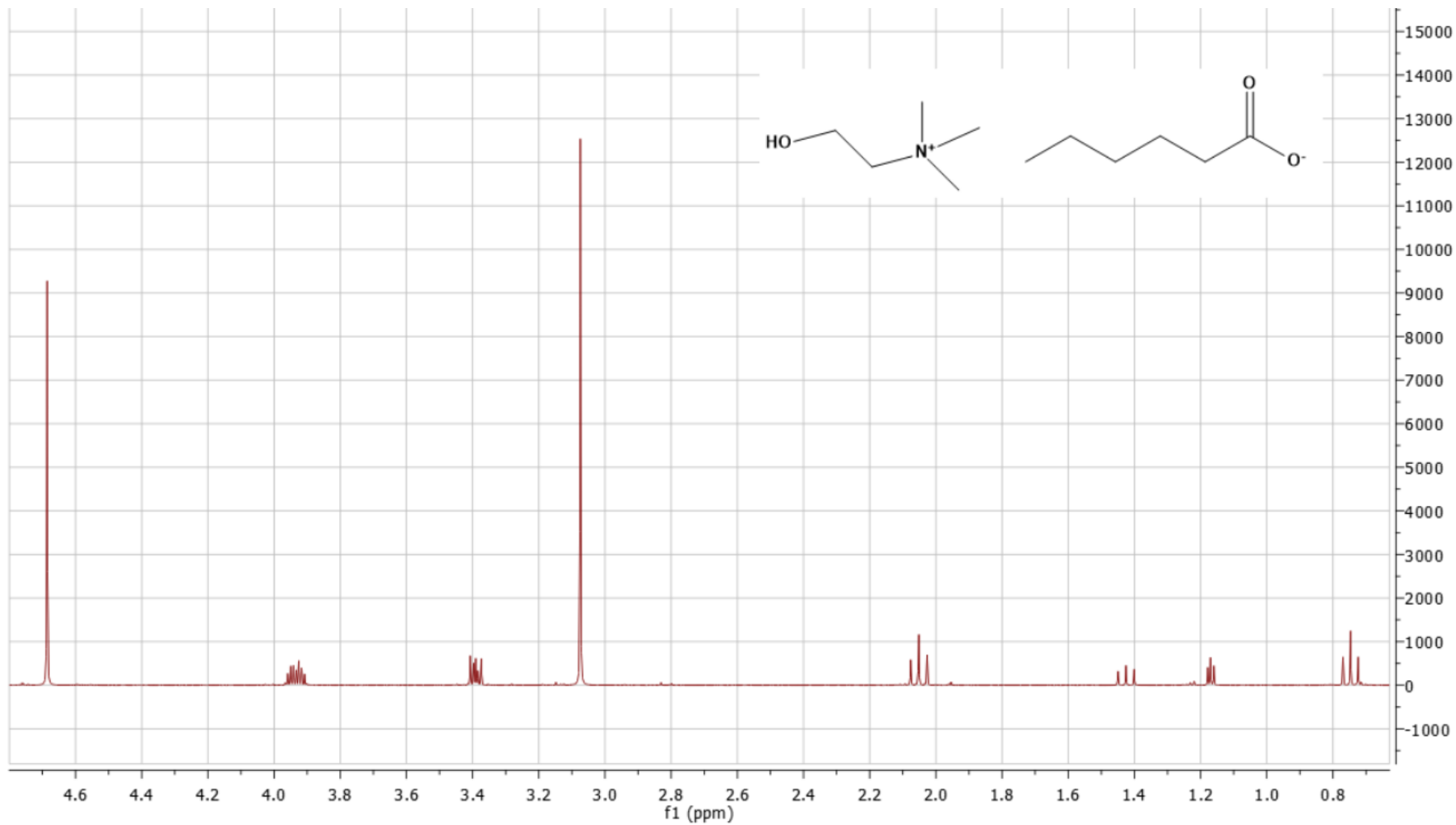
Solvente – água deuterada; Concentração amostra – 1 mg/700 μL

Figura S4. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico pentanoato de colina e sua respectiva estrutura química.



Solvente – água deuterada; Concentração amostra – 1 mg/700 μL

Figura S5. Espectro de RMN de ^1H obtido à 300 MHz (7,1 T) do líquido iônico hexanoato de colina e sua respectiva estrutura química.



Solvente – água deuterada; Concentração amostra – 1 mg/700 μL

Figura S6. Varredura (230-650 nm) do meio fermentado (A) produzido por *T. amestolkiae*.

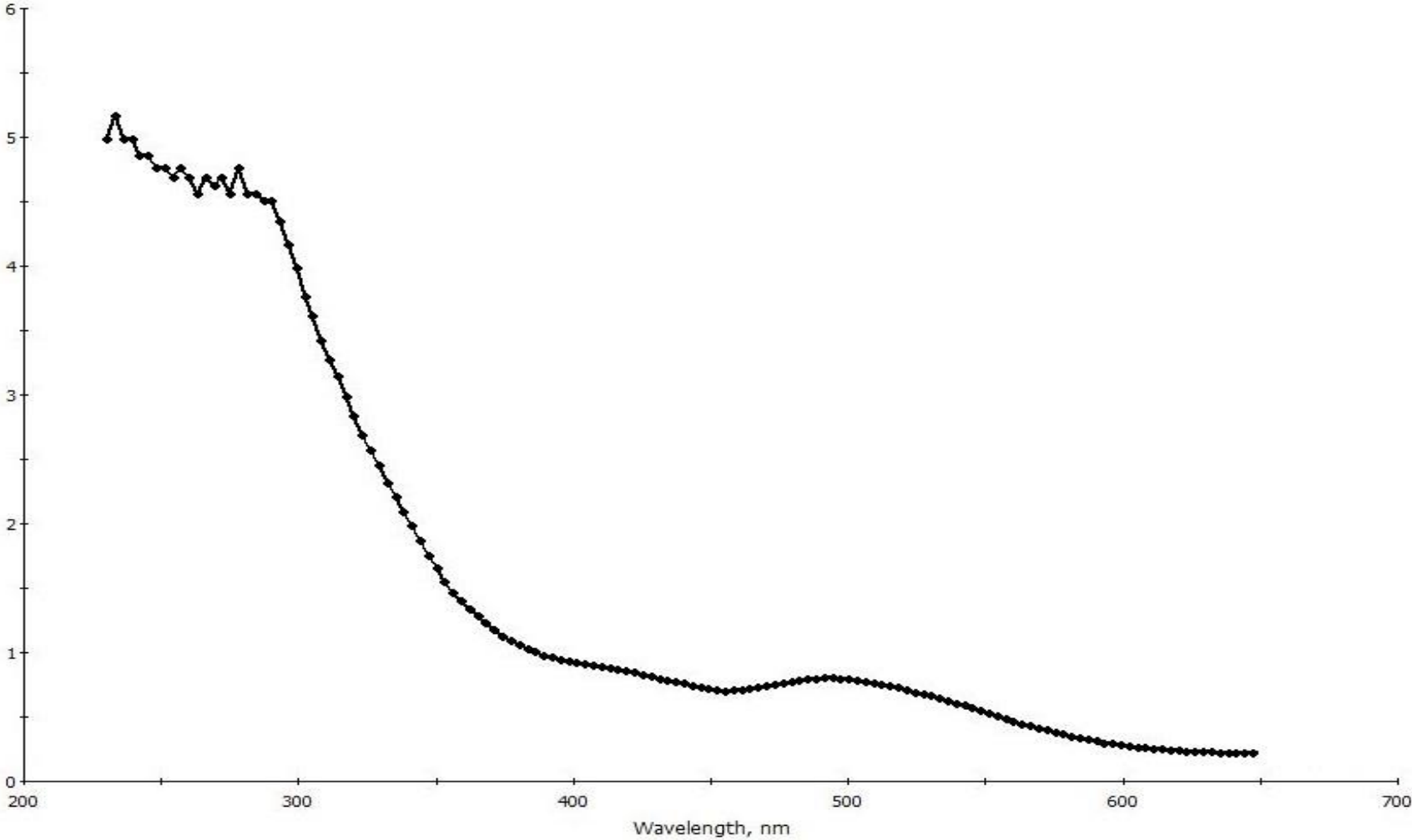


Figura S7. Varredura (230-650 nm) do meio fermentado (B) produzido por *T. amestolkiae*.

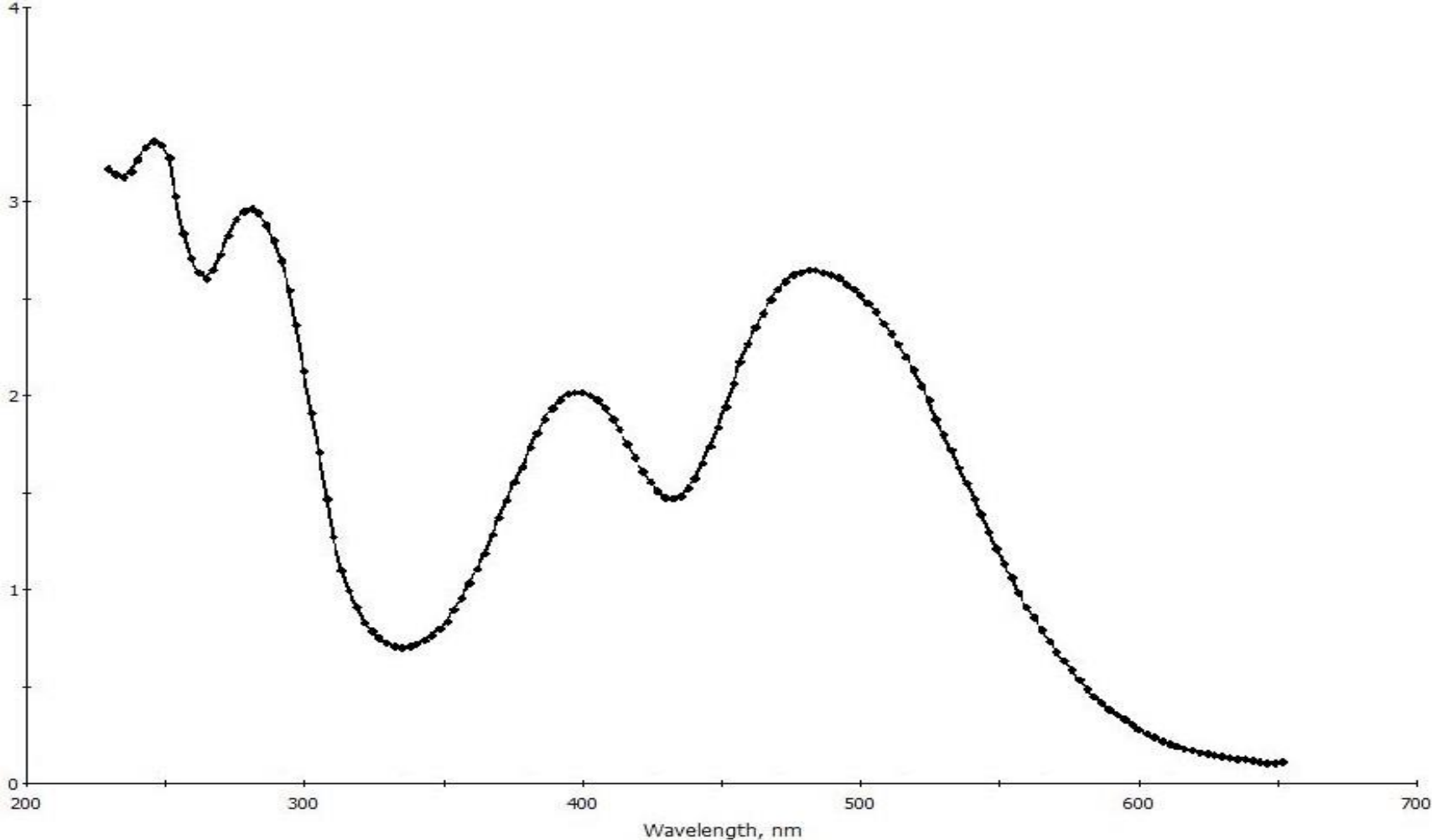


Figura S8. Solubilidade do meio fermentado liofilizado em diferentes solventes orgânicos. (A) 2-propanol, (B) acetato de etila, (C) acetona, (D) ácido clorídrico 5%, (E) ácido fórmico, (F) ácido nítrico 65%, (G) água, (H) benzeno, (I) butanol, (J) diclorometano, (K) dimetilsufóxido, (L) etanol, (M) éter etílico, (N) etilenoglicol, (O) formaldeído, (P) hexano, (Q) hidróxido de amônio, (R) isopropanol, (S) metanol, (T) n-n dimetilformamida e (U) toluol.

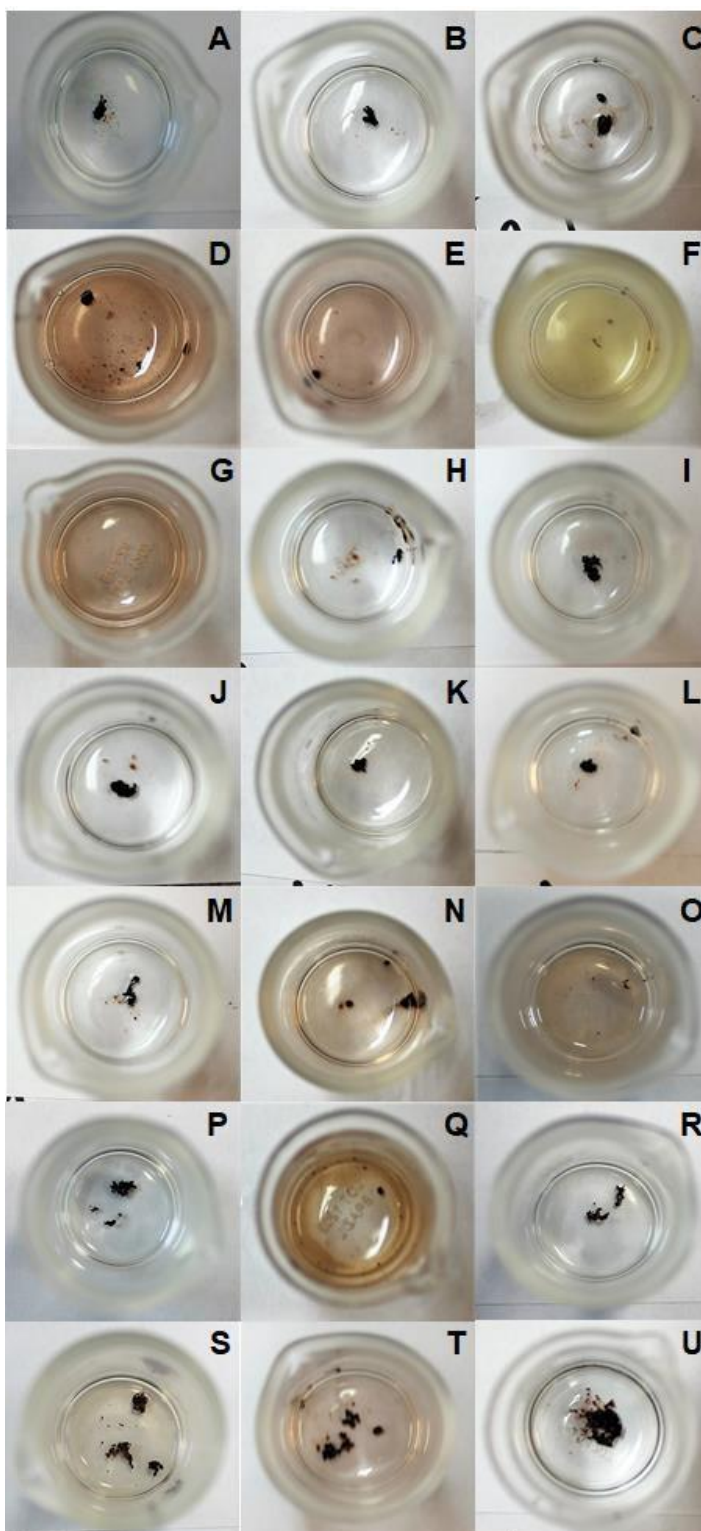


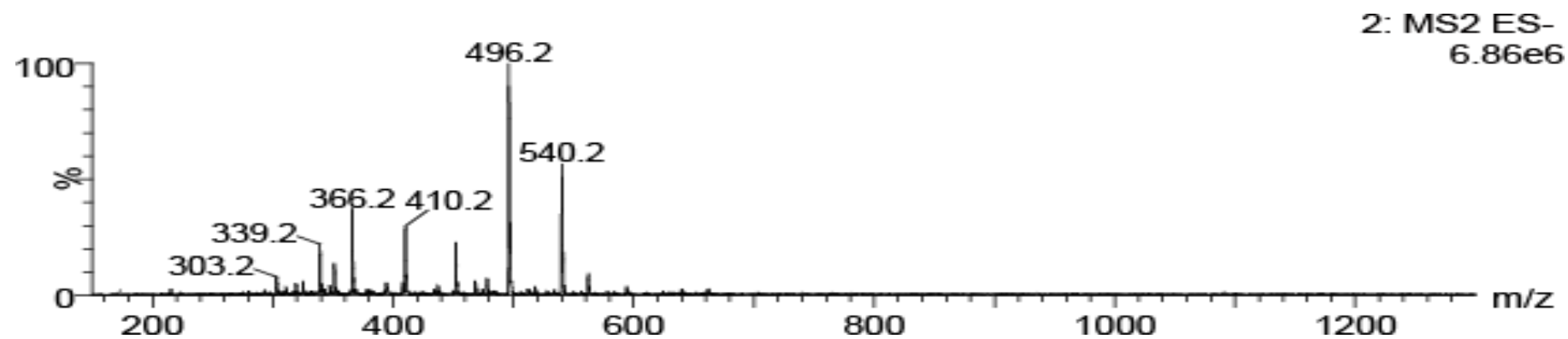
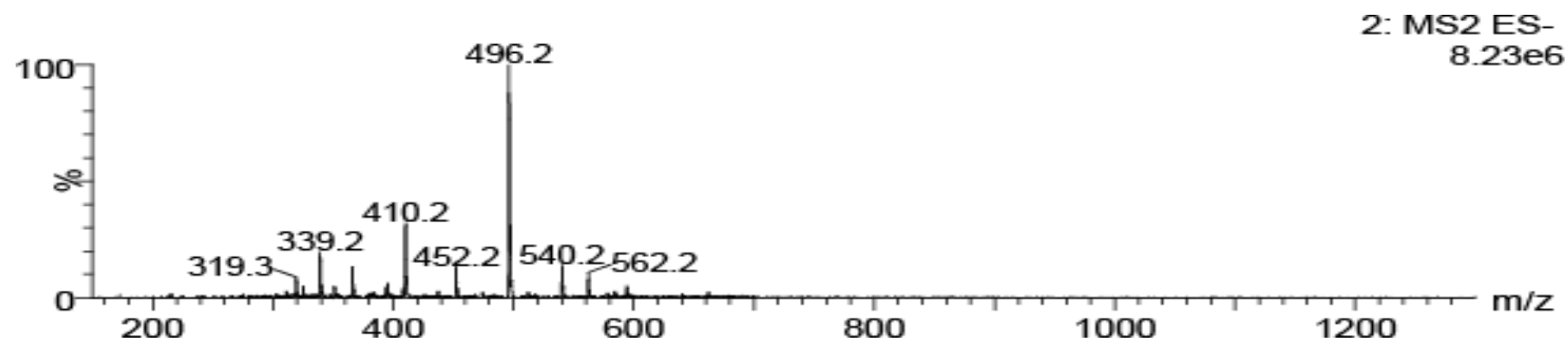
Figura S9. Espectro de massas para a subfração 3 ($t_R = 15,98$).Figura S10. Espectro de massas para a subfração 4 ($t_R = 16,65$).

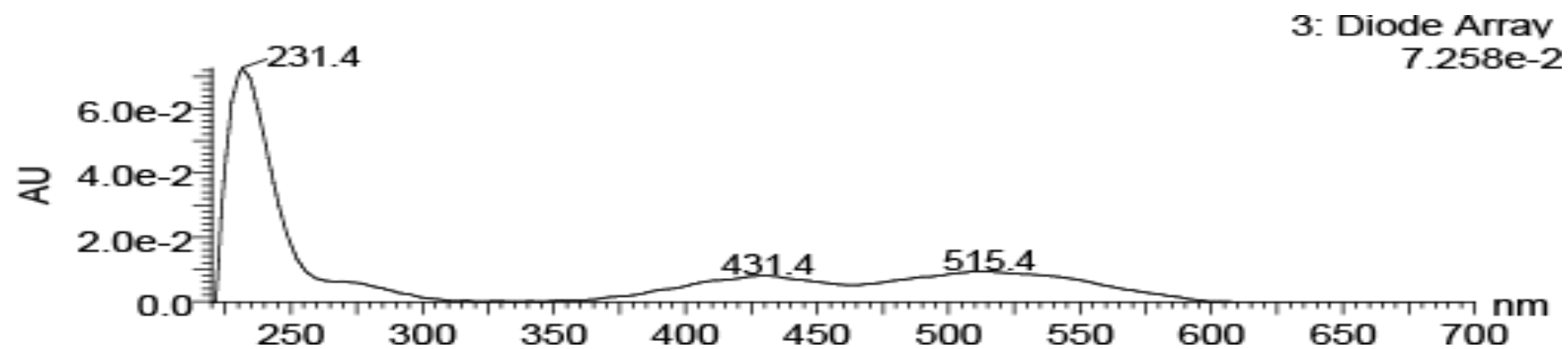
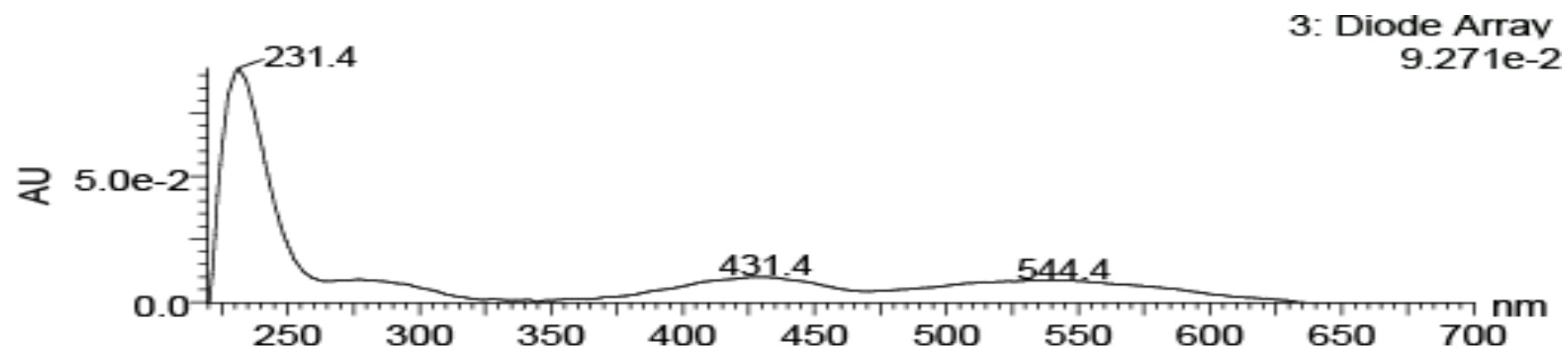
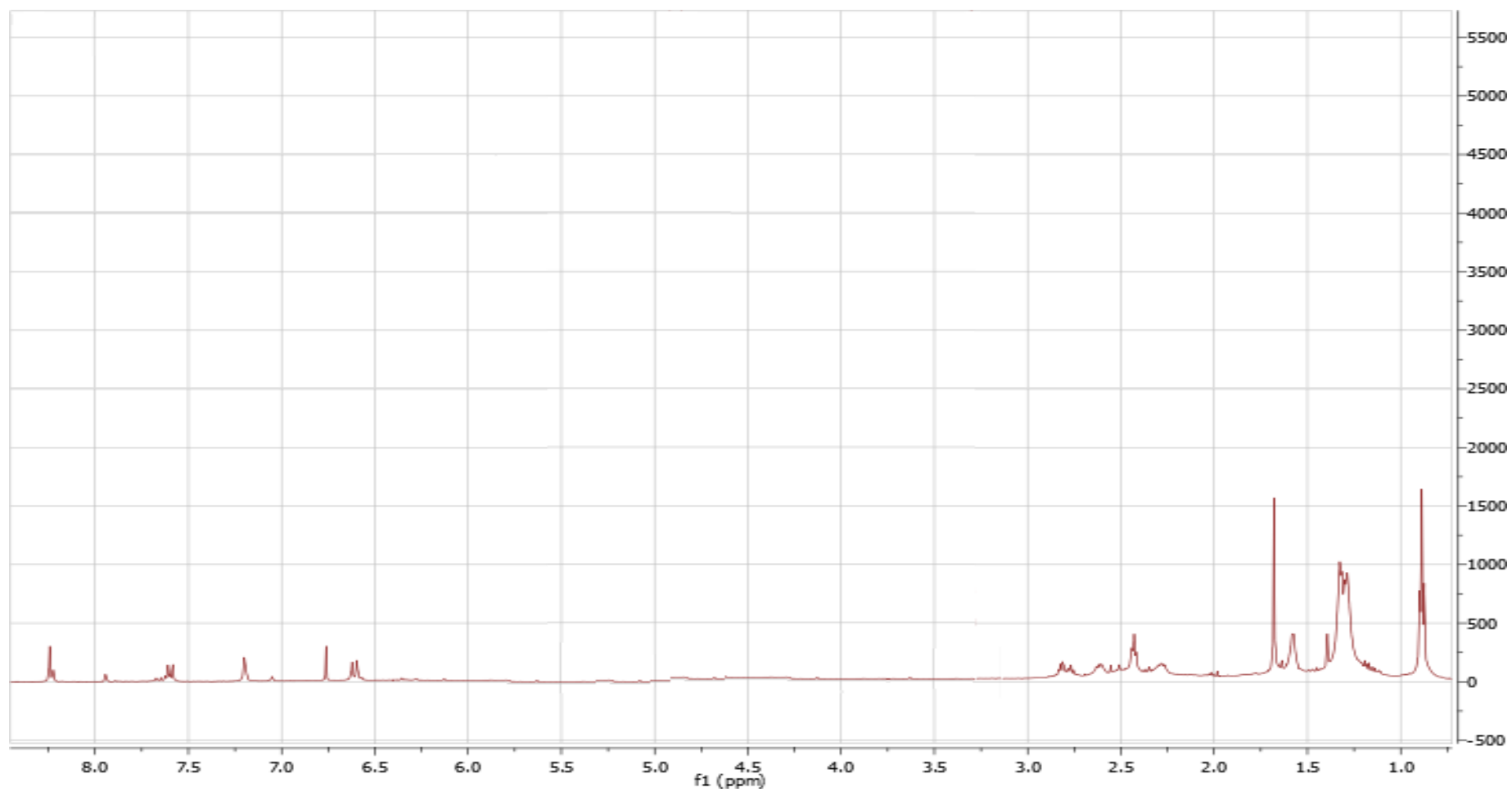
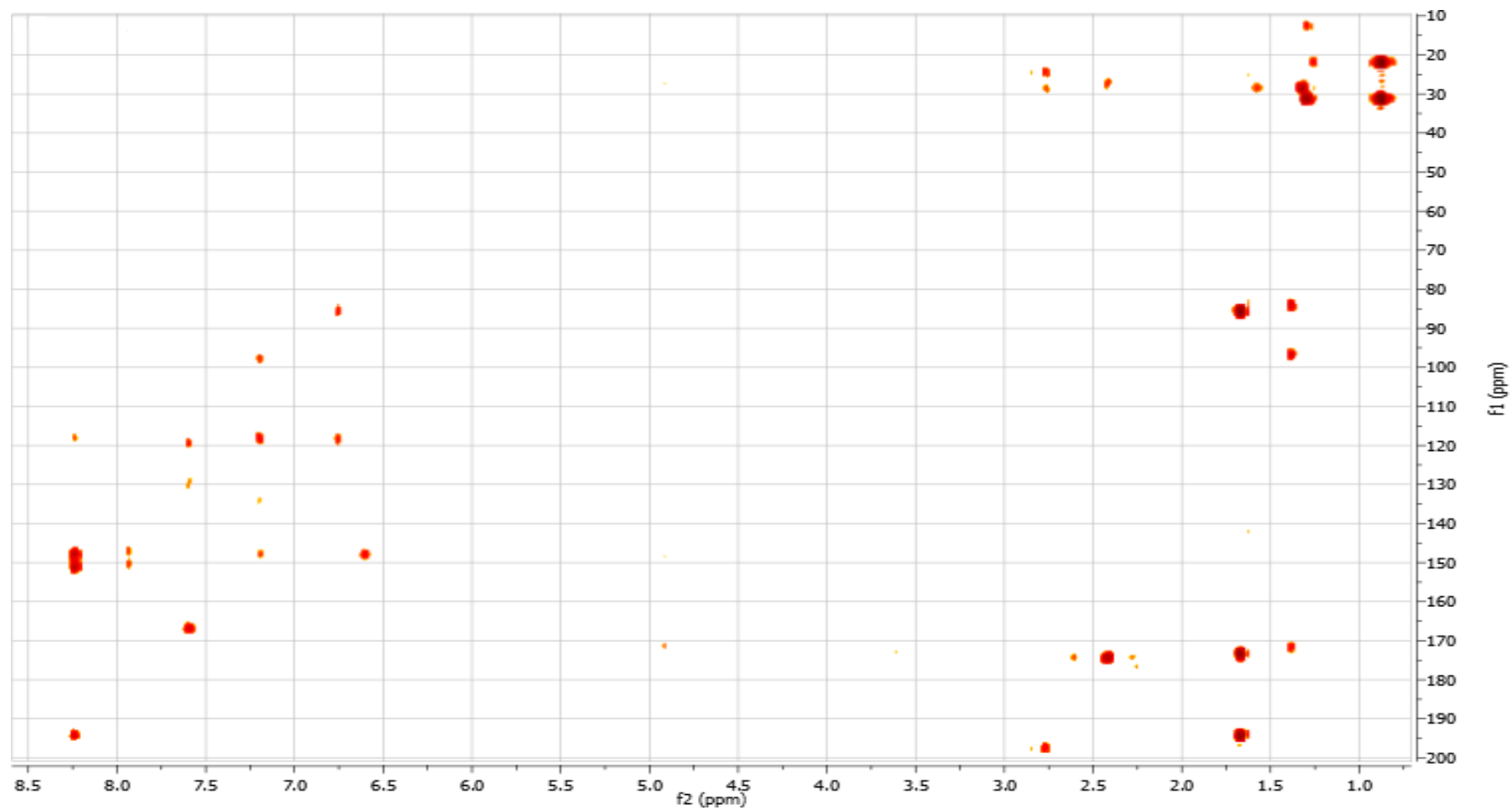
Figura S11. Espectro de varredura em CLAE-DAD para a subfração 3 ($t_R = 15,98$).Figura S12. Espectro de varredura em CLAE-DAD para a subfração 4 ($t_R = 16,65$).

Figura S13. Espectro de RMN de ^1H obtido à 600 MHz da subfração 4 do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.



Solvente – metanol deuterada; **Concentração amostra** – 2 mg/200 μL

Figura S14. Mapa de contornos HMBC obtido a 600 MHz da subfração 4 do extrato de acetato de etila obtido do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.



Solvente – metanol deuterada; **Concentração amostra** – 2 mg/200 μ L

Tabela S1. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, tampão Mc Ilvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema	Temperatura °C	
	Branco	Meio Fermentado
3	12,2 ± 0,10	14,0 ± 0,05
5	12,4 ± 0,10	14,6 ± 0,20
7	14,6 ± 0,00	16,0 ± 0,11
9	16,2 ± 0,05	17,0 ± 0,20
11	17,6 ± 0,11	18,5 ± 0,10
13	18,5 ± 0,20	20,2 ± 0,05
15	19,2 ± 0,00	21,6 ± 0,11

Tabela S2. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, LI [C₈mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema		Temperatura (°C)	
Triton X-114 (%m/m)	[C ₈ mim]Cl (%m/m)	Branco	Meio Fermentado
3	0,1	14,1 ± 0,05	17,5 ± 0,20
5		14,7 ± 0,20	17,8 ± 0,11
7		15,3 ± 0,11	19,0 ± 0,11
9		16,6 ± 0,20	20,2 ± 0,05
11		18,5 ± 0,10	20,4 ± 0,00
13		19,4 ± 0,05	23,1 ± 0,11
15		20,8 ± 0,00	24,4 ± 0,11
3		0,3	23,3 ± 0,10
5	22,2 ± 0,20		25,4 ± 0,05
7	22,3 ± 0,05		25,3 ± 0,10
9	22,7 ± 0,20		26,0 ± 0,20
11	23,5 ± 0,00		26,9 ± 0,11
13	24,7 ± 0,11		27,6 ± 0,11
15	25,1 ± 0,11		29,9 ± 0,05
3	0,5	34,2 ± 0,10	37,3 ± 0,05
5		31,0 ± 0,20	34,0 ± 0,05
7		30,6 ± 0,11	32,6 ± 0,10
9		28,7 ± 0,20	33,9 ± 0,30
11		29,8 ± 0,05	34,0 ± 0,11
13		30,8 ± 0,11	34,2 ± 0,20
15		31,3 ± 0,00	35,0 ± 0,20

Tabela S3. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₀mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema		Temperatura (°C)	
Triton X-114 (%m/m)	[C ₁₀ mim]Cl (%m/m)	Branco	Meio Fermentado
3	0,1	15,4 ± 0,10	20,4 ± 0,11
5		11,5 ± 0,05	16,8 ± 0,10
7		11,5 ± 0,00	17,1 ± 0,05
9		11,5 ± 0,00	17,8 ± 0,10
11		11,5 ± 0,05	20,0 ± 0,10
13		11,5 ± 0,11	21,2 ± 0,11
15		21,5 ± 0,10	22,8 ± 0,20
3		0,3	35,5 ± 0,20
5	26,1 ± 0,11		31,4 ± 0,20
7	21,2 ± 0,10		26,2 ± 0,11
9	20,8 ± 0,05		24,5 ± 0,10
11	20,0 ± 0,10		25,1 ± 0,00
13	20,3 ± 0,20		25,2 ± 0,11
15	21,2 ± 0,20		26,4 ± 0,05
3	0,5		31,1 ± 0,20
5		40,8 ± 0,20	45,6 ± 0,10
7		32,7 ± 0,05	36,4 ± 0,11
9		28,6 ± 0,11	33,0 ± 0,20
11		26,4 ± 0,11	31,9 ± 0,20
13		25,2 ± 0,00	30,4 ± 0,20
15		25,0 ± 0,10	30,0 ± 0,11

Tabela S4. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₁₂mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema		Temperatura (°C)	
Triton X-114 (%m/m)	[C ₁₂ mim]Cl (%m/m)	Branco	Meio Fermentado
3	0,1	10,7 ± 0,05	15,0 ± 0,10
5		10,9 ± 0,10	15,2 ± 0,10
7		11,9 ± 0,05	16,7 ± 0,00
9		13,3 ± 0,20	18,3 ± 0,05
11		13,8 ± 0,11	18,9 ± 0,20
13		14,8 ± 0,00	21,1 ± 0,00
15		18,6 ± 0,10	22,8 ± 0,11
3	0,3	14,1 ± 0,10	17,4 ± 0,20
5		14,3 ± 0,10	17,7 ± 0,20
7		15,8 ± 0,10	18,8 ± 0,10
9		17,8 ± 0,11	20,3 ± 0,05
11		19,2 ± 0,05	22,1 ± 0,00
13		20,4 ± 0,00	24,0 ± 0,11
15		22,8 ± 0,20	25,8 ± 0,10
3	0,5	17,3 ± 0,05	20,5 ± 0,05
5		17,5 ± 0,20	20,8 ± 0,05
7		18,5 ± 0,00	21,3 ± 0,11
9		19,7 ± 0,00	21,9 ± 0,20
11		21,1 ± 0,11	23,6 ± 0,00
13		23,0 ± 0,05	25,4 ± 0,11
15		24,1 ± 0,10	27,2 ± 0,10

Tabela S5. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Pent], tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema		Temperatura (°C)	
Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Pent] M	Branco	Meio Fermentado
1	0,05	26,6 ± 0,00	24,0 ± 0,11
5		28,1 ± 0,05	26,0 ± 0,10
9		31,6 ± 0,11	29,0 ± 0,05
13		35,5 ± 0,10	33,3 ± 0,10
1	0,10	27,5 ± 0,20	24,9 ± 0,05
5		29,2 ± 0,05	26,7 ± 0,10
9		32,4 ± 0,10	30,5 ± 0,05
13		37,9 ± 0,11	34,3 ± 0,05
1	0,50	28,9 ± 0,10	26,4 ± 0,05
5		31,7 ± 0,00	29,9 ± 0,05
9		35,9 ± 0,20	34,4 ± 0,10
13		41,0 ± 0,10	39,2 ± 0,11

Tabela S6. Temperaturas obtidas para os SMDFA compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Hex], tampão McIlvaine pH 6,5 e na presença/ausência do meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*.

Sistema		Temperatura (°C)	
Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Hex] M	Branco	Meio Fermentado
1	0,05	27,4 ± 0,00	17,9 ± 0,05
5		30,9 ± 0,05	26,1 ± 0,10
9		34,9 ± 0,3	30,5 ± 0,05
13		39,2 ± 0,1	35,1 ± 0,10
1	0,10	28,5 ± 0,1	18,1 ± 0,10
5		34,2 ± 0,1	28,6 ± 0,05
9		39,2 ± 0,1	34,4 ± 0,20
13		43,7 ± 0,3	39,7 ± 0,01
1	0,50	↑70	↑70
5		↑70	↑70
9		↑70	↑70
13		↑70	↑70

Tabela S7. Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos somente por TX-114.

Triton X-114 (%m/m)	Temperatura (°C)
3	22
5	22
7	22
9	22
11	22
13	22
15	22

Tabela S8. Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos por TX-114 e pelos LI da família dos imidazólios.

Sistemas			Temperatura (°C)
Triton X-114 (%m/m)	Líquido iônico		
	Tipo	Concentração (%m/m)	
3 – 15	[C ₈ mim]Cl	0,1	25
3 – 15		0,3	31
3		0,5	38
5 – 15		0,5	38
3 – 15	[C ₁₀ mim]Cl	0,1	25
3		0,3	41
5 – 15		0,3	32
5		0,5	46
7 – 15		0,5	37
3 – 11	[C ₁₂ mim]Cl	0,1	20
13 – 15		0,1	25
3 – 9		0,3	21
11 – 15		0,3	26
3 – 11		0,5	25
13 – 15		0,5	28

Tabela S9. Temperaturas de incubação dos SMDFA compostos por TX-114 e pelos LI da família das colinas.

Sistemas			Temperatura (°C)
Triton X-114 (%m/m)	Líquido iônico		
	Tipo	Concentração (M)	
1 – 13	[Ch][Pent]	0,05	36
1 – 13		0,10	38
1 – 13		0,50	42
1 – 13	[Ch][Hex]	0,05	40
1 – 13		0,10	44
1 – 13		0,50	-

Tabela S10. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, tampão Mcllvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema Triton X-114 (%m/m)	Coeficiente de Partição (K)		
	400	470	490
3	1,40 ± 0,08	1,76 ± 0,11	2,17 ± 0,05
5	1,11 ± 0,05	1,37 ± 0,08	1,43 ± 0,11
7	1,01 ± 0,10	1,11 ± 0,05	1,32 ± 0,04
9	0,92 ± 0,07	0,90 ± 0,03	0,97 ± 0,02
11	0,75 ± 0,02	0,84 ± 0,13	0,87 ± 0,03
13	0,68 ± 0,15	0,71 ± 0,02	0,80 ± 0,01
15	0,54 ± 0,09	0,65 ± 0,04	0,74 ± 0,01

Tabela S11. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [C₈mim]Cl, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema		Coeficiente de Partição (K)		
Triton X-114 (%m/m)	[C ₈ mim]Cl (%m/m)	400	470	490
3	0,1	2,22 ± 0,07	3,09 ± 0,29	4,91 ± 0,09
5		2,18 ± 0,11	2,83 ± 0,17	3,20 ± 0,04
7		1,72 ± 0,18	2,56 ± 0,18	1,75 ± 0,13
9		1,55 ± 0,02	2,45 ± 0,10	1,05 ± 0,13
11		1,49 ± 0,10	2,18 ± 0,05	0,98 ± 0,03
13		1,24 ± 0,07	2,08 ± 0,27	0,75 ± 0,10
15		1,14 ± 0,04	1,52 ± 0,07	0,43 ± 0,06
3	0,3	2,33 ± 0,03	2,99 ± 0,04	3,33 ± 0,08
5		2,11 ± 0,09	2,74 ± 0,07	3,04 ± 0,15
7		1,85 ± 0,04	2,37 ± 0,19	2,98 ± 0,35
9		1,49 ± 0,07	1,83 ± 0,17	2,59 ± 0,20
11		1,22 ± 0,09	1,35 ± 0,07	1,97 ± 0,10
13		1,49 ± 0,10	1,26 ± 0,15	1,35 ± 0,14
15		1,02 ± 0,02	1,24 ± 0,09	1,14 ± 0,15
3	0,5	2,38 ± 0,17	3,14 ± 0,29	3,59 ± 0,13
5		2,33 ± 0,06	3,09 ± 0,48	3,29 ± 0,19
7		2,11 ± 0,09	2,63 ± 0,01	3,02 ± 0,09
9		2,12 ± 0,16	2,59 ± 0,43	2,81 ± 0,15
11		1,74 ± 0,18	2,15 ± 0,10	2,35 ± 0,30
13		1,70 ± 0,14	2,09 ± 0,33	2,31 ± 0,06
15		1,45 ± 0,02	1,66 ± 0,18	1,80 ± 0,17

Tabela S12. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico $[C_{10}mim]Cl$, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema		Coeficiente de Partição (K)		
Triton X-114 (%m/m)	$[C_{10}mim]Cl$ (%m/m)	400	470	490
3	0,1	4,38 ± 0,34	6,03 ± 0,79	6,12 ± 0,18
5		2,55 ± 0,36	3,20 ± 0,55	3,16 ± 0,05
7		2,27 ± 1,93	2,85 ± 0,31	2,63 ± 0,05
9		1,93 ± 0,62	2,25 ± 0,89	2,32 ± 0,13
11		1,12 ± 0,48	1,48 ± 0,18	1,12 ± 0,15
13		1,12 ± 0,04	1,30 ± 0,09	1,29 ± 0,09
15		0,54 ± 0,03	0,45 ± 0,03	0,42 ± 0,03
3	0,3	2,52 ± 0,36	3,08 ± 0,27	3,07 ± 0,12
5		2,29 ± 0,17	2,56 ± 0,46	2,18 ± 0,08
7		1,85 ± 0,47	2,19 ± 0,61	1,47 ± 0,11
9		1,72 ± 0,80	2,14 ± 0,95	2,13 ± 0,09
11		1,46 ± 0,70	1,82 ± 1,09	1,81 ± 0,10
13		1,05 ± 0,16	1,02 ± 0,04	1,01 ± 0,03
15		1,19 ± 0,66	1,47 ± 0,62	1,47 ± 0,15
3	0,5	N.D.	N.D.	N.D.
5		2,71 ± 0,04	3,88 ± 0,11	4,42 ± 0,04
7		2,57 ± 0,02	3,49 ± 0,07	4,17 ± 0,10
9		2,32 ± 0,13	3,26 ± 0,10	3,73 ± 0,10
11		1,84 ± 0,04	2,53 ± 0,11	2,87 ± 0,01
13		1,81 ± 0,04	2,26 ± 0,06	2,46 ± 0,05
15		1,38 ± 0,04	1,40 ± 0,05	1,56 ± 0,05

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S13. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico $[C_{12}mim]Cl$, tampão McIlvaine pH 6,5 e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema		Coeficiente de Partição (K)		
Triton X-114 (%m/m)	$[C_{12}mim]Cl$ (%m/m)	400	470	490
3	0,1	$2,56 \pm 0,16$	$4,56 \pm 0,14$	$4,91 \pm 0,09$
5		$1,56 \pm 0,25$	$2,25 \pm 0,33$	$3,20 \pm 0,45$
7		$1,28 \pm 0,12$	$1,05 \pm 0,13$	$1,75 \pm 0,13$
9		$0,98 \pm 0,12$	$1,01 \pm 0,17$	$1,03 \pm 0,19$
11		$0,88 \pm 0,11$	$0,92 \pm 0,11$	$0,98 \pm 0,03$
13		$0,72 \pm 0,11$	$0,64 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,10$
15		$0,46 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,06$
3		0,3	$3,61 \pm 0,13$	$4,61 \pm 0,30$
5	$1,84 \pm 0,06$		$2,12 \pm 0,13$	$2,28 \pm 0,12$
7	$1,52 \pm 0,06$		$1,67 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,07$
9	$1,13 \pm 0,08$		$1,28 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,02$
11	$1,09 \pm 0,06$		$1,15 \pm 0,01$	$1,22 \pm 0,16$
13	$0,90 \pm 0,05$		$0,98 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,06$
15	$0,76 \pm 0,06$		$0,68 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,13$
3	0,5		$2,83 \pm 0,13$	$3,21 \pm 0,08$
5		$1,80 \pm 0,06$	$2,07 \pm 0,07$	$2,29 \pm 0,09$
7		$1,11 \pm 0,01$	$1,22 \pm 0,11$	$1,32 \pm 0,11$
9		$1,07 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,08$	$1,19 \pm 0,06$
11		$1,00 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,09$	$1,01 \pm 0,03$
13		$0,87 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,06$	$0,93 \pm 0,07$
15		$0,81 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,02$

Tabela S14. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Pent], água Mili-q e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema		Coeficiente de Partição (K)		
Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Pent] M	400	470	490
1	0,05	1,54 ± 0,01	1,70 ± 0,07	2,11 ± 0,11
5		3,16 ± 0,09	4,53 ± 0,13	7,49 ± 0,12
9		1,85 ± 0,09	2,45 ± 0,15	3,43 ± 0,12
13		1,09 ± 0,02	1,32 ± 0,15	1,82 ± 0,06
1	0,10	1,79 ± 0,05	2,02 ± 0,07	2,50 ± 0,10
5		3,20 ± 0,10	4,35 ± 0,14	6,17 ± 0,13
9		1,40 ± 0,03	1,92 ± 0,06	2,67 ± 0,08
13		1,17 ± 0,02	1,52 ± 0,08	2,22 ± 0,01
1	0,50	1,62 ± 0,07	1,81 ± 0,08	2,19 ± 0,10
5		1,96 ± 0,03	2,79 ± 0,08	3,63 ± 0,07
9		1,76 ± 0,06	1,96 ± 0,03	2,64 ± 0,04
13		1,04 ± 0,05	1,38 ± 0,06	1,85 ± 0,06

Tabela S15. Coeficiente de partição (K) para os sistemas compostos por diferentes concentrações de TX-114, líquido iônico [Ch][Hex], água Mili-q e o meio fermentado produzido por *T. amestolkiae*. Os resultados foram obtidos nos comprimentos de onda de 400, 470 e 490 nm que correspondem as colorantes amarelo, laranja e vermelho, respectivamente.

Sistema		Coeficiente de Partição (K)		
Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Hex] M	400	470	490
1	0,05	2,08 ± 0,02	1,31 ± 0,02	1,14 ± 0,01
5		3,19 ± 0,06	4,27 ± 0,10	5,94 ± 0,14
9		2,09 ± 0,03	2,88 ± 0,15	3,95 ± 0,13
13		1,50 ± 0,03	2,00 ± 0,03	2,23 ± 0,05
1	0,10	1,95 ± 0,04	1,16 ± 0,03	1,03 ± 0,02
5		2,73 ± 0,02	3,60 ± 0,08	4,75 ± 0,15
9		1,84 ± 0,05	2,38 ± 0,03	2,70 ± 0,06
13		1,22 ± 0,02	1,74 ± 0,09	1,93 ± 0,02
1	0,50	N.D.	N.D.	N.D.
5		N.D.	N.D.	N.D.
9		N.D.	N.D.	N.D.
13		N.D.	N.D.	N.D.

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S16. Eficiência da extração (EE) dos sistemas compostos apenas por TX-114.

Triton X-114 (%m/m)	EE (%)
3	40,62 ± 0,57
5	37,91 ± 1,16
7	44,76 ± 0,74
9	43,29 ± 0,47
11	44,46 ± 0,89
13	48,54 ± 0,30
15	54,72 ± 0,85

Tabela S17. Eficiência da extração (EE (%)) dos sistemas compostos por TX-114 e [C₈mim]Cl.

Triton X-114 (%m/m)	[C₈mim]Cl (%m/m)	EE (%)
3	0,10	55,08 ± 0,18
5		55,40 ± 0,13
7		53,78 ± 0,75
9		57,12 ± 1,23
11		55,39 ± 0,30
13		74,92 ± 1,02
15		83,03 ± 0,30
3	0,30	68,92 ± 0,20
5		73,72 ± 0,37
7		81,68 ± 0,72
9		79,52 ± 0,50
11		74,73 ± 0,39
13		84,35 ± 0,52
15		85,69 ± 0,64
3	0,50	62,31 ± 0,86
5		73,67 ± 0,45
7		81,47 ± 0,89
9		85,40 ± 0,32
11		90,28 ± 0,37
13		94,75 ± 0,59
15		94,93 ± 0,86

Tabela S18. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [C₁₀mim]Cl.

Triton X-114 (%m/m)	[C₁₀mim]Cl (%m/m)	EE (%)
3	0,10	60,09 ± 0,16
5		52,56 ± 1,79
7		59,59 ± 3,43
9		61,04 ± 5,44
11		52,62 ± 3,43
13		65,68 ± 1,93
15		48,59 ± 3,02
3	0,30	43,07 ± 0,96
5		55,04 ± 0,61
7		33,97 ± 2,81
9		59,09 ± 5,30
11		63,66 ± 4,46
13		60,15 ± 0,34
15		76,58 ± 1,61
3	0,50	N.D.
5		87,09 ± 0,37
7		97,40 ± 0,02
9		86,23 ± 0,71
11		78,99 ± 1,60
13		77,25 ± 1,60
15		70,17 ± 0,31

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S19. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [C₁₂mim]Cl.

Triton X-114 (%m/m)	[C₁₂mim]Cl (%m/m)	EE (%)
3	0,10	53,50 ± 1,05
5		57,82 ± 1,32
7		53,92 ± 2,33
9		45,98 ± 1,17
11		55,50 ± 1,01
13		55,94 ± 1,10
15		54,52 ± 1,67
3	0,30	79,53 ± 0,26
5		77,32 ± 1,70
7		70,80 ± 0,33
9		59,81 ± 0,89
11		58,84 ± 1,09
13		80,56 ± 1,70
15		55,11 ± 1,97
3	0,50	45,06 ± 1,36
5		48,84 ± 0,47
7		46,34 ± 2,26
9		53,66 ± 0,83
11		57,50 ± 0,92
13		49,87 ± 1,00
15		60,63 ± 0,33

Tabela S20. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por 3% (m/m) TX-114 e 0,1% (m/m) de [C₁₀mim]Cl em diferentes temperaturas de incubação.

Temperatura (°C)	EE (%)
25	60,09 ± 0,16
35	94,40 ± 1,24
45	99,95 ± 0,01

Tabela S21. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [Ch][Pent].

Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Pent] (M)	EE (%)
1	0,05	11,89 ± 0,54
5		67,89 ± 0,34
9		67,10 ± 1,65
13		66,93 ± 1,45
1	0,10	13,77 ± 0,47
5		64,38 ± 1,95
9		63,39 ± 1,18
13		72,30 ± 0,12
1	0,50	13,59 ± 2,77
5		58,58 ± 0,51
9		71,47 ± 0,91
13		77,71 ± 1,93

Tabela S22. Eficiência da extração (EE (%)) para os sistemas compostos por TX-114 e [Ch][Hex].

Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Hex] (M)	EE (%)
1	0,05	6,81 ± 0,07
5		75,39 ± 0,44
9		72,47 ± 0,65
13		74,01 ± 0,49
1	0,10	6,21 ± 0,16
5		72,77 ± 0,62
9		71,36 ± 0,45
13		80,40 ± 0,19
1	0,50	N.D.
5		N.D.
9		N.D.
13		N.D.

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S23. Seletividade do colorante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico $[C_8mim]Cl$.

Triton X-114 (%m/m)	$[C_8mim]Cl$ (%m/m)	Seletividade	
		490/400	490/470
3	0,10	2,21	1,58
5		1,46	1,13
7		1,01	0,68
9		0,67	0,42
11		0,65	0,44
13		0,60	0,36
15		0,37	0,28
3	0,30	1,43	1,11
5		1,44	1,11
7		1,61	1,26
9		1,74	1,41
11		1,61	1,46
13		1,13	1,07
15		1,12	0,92
3	0,50	1,51	1,14
5		1,41	1,06
7		1,43	1,15
9		1,33	1,08
11		1,35	1,09
13		1,36	1,11
15		1,24	1,08

Tabela S24. Seletividade do colorante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [C₁₀mim]Cl.

Triton X-114 (%m/m)	[C ₁₀ mim]Cl (%m/m)	Seletividade	
		490/400	490/470
3	0,10	1,40	1,01
5		1,23	0,98
7		1,15	0,92
9		1,20	1,03
11		1,00	0,75
13		1,15	0,99
15		0,77	0,93
3	0,30	1,21	0,99
5		0,95	0,85
7		0,79	0,67
9		1,23	0,99
11		1,23	0,99
13		0,96	0,99
15		1,23	1,00
3	0,50	N.D.	N.D.
5		1,63	1,13
7		1,62	1,19
9		1,60	1,14
11		1,55	1,13
13		1,35	1,08
15		1,13	1,11

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S25. Seletividade do colorante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [C₁₂mim]Cl.

Triton X-114 (%m/m)	[C ₁₂ mim]Cl (%m/m)	Seletividade	
		490/400	490/470
3	0,10	1,92	1,07
5		2,05	1,42
7		1,36	1,66
9		1,05	1,01
11		1,11	1,06
13		1,04	1,17
15		0,93	1,07
3	0,30	1,41	1,10
5		1,23	1,075
7		1,19	1,08
9		1,22	1,07
11		1,11	1,06
13		1,14	1,05
15		1,17	1,30
3	0,50	1,24	1,09
5		1,27	1,10
7		1,18	1,08
9		1,11	1,07
11		1,01	0,92
13		1,06	1,03
15		1,13	1,05

Tabela S26. Seletividade do colorante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [Ch][Pent].

Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Pent] (M)	Seletividade	
		490/400	490/470
1	0,05	1,13	1,24
5		2,37	1,65
9		1,85	1,40
13		1,66	1,37
1	0,10	1,39	1,23
5		1,92	1,41
9		1,90	1,39
13		1,89	1,46
1	0,50	1,35	1,20
5		1,85	1,30
9		1,50	1,34
13		1,77	1,34

Tabela S27. Seletividade do colorante vermelho em relação aos colorantes amarelo e laranja nos SMDFA compostos por TX-114 e pelo líquido iônico [Ch][Hex].

Triton X-114 (%m/m)	[Ch][Hex] (M)	Seletividade	
		490/400	490/470
1	0,05	0,54	0,87
5		1,86	1,39
9		1,88	1,37
13		1,48	1,11
1	0,10	0,52	0,88
5		1,73	1,31
9		1,46	1,13
13		1,58	1,10
1	0,50	N.D.	N.D.
5		N.D.	N.D.
9		N.D.	N.D.
13		N.D.	N.D.

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Tabela S28. Condutividade de ambas as fases co-existentes nos SMDFA compostos por TX-114 (3-15% m/m) e LI da família dos imidazólios (0,10 – 0,50% m/m).

Triton X-114 (%m/m)	Sistema		Condutividade Fase <i>Top</i> (mS/cm)	Condutividade Fase <i>Bottom</i> (mS/cm)	
	Líquido Iônico				
	Concentração (%m/m)	Tipo			
3	0,10	[C ₈ mim]Cl	19,77	6,53	
	0,30		19,78	8,15	
	0,50		19,37	10,02	
15	0,10		21,62	6,87	
	0,30		21,44	8,32	
	0,50		21,06	10,15	
3	0,10		[C ₁₀ mim]Cl	20,07	7,04
	0,30			20,20	9,12
	0,50			N.D.	N.D.
15	0,10	21,47		7,33	
	0,30	22,23		9,34	
	0,50	22,67		11,27	
3	0,10	[C ₁₂ mim]Cl		20,24	7,16
	0,30			20,51	8,33
	0,50			20,37	9,70
15	0,10		21,93	7,40	
	0,30		21,48	8,52	
	0,50		21,63	9,91	
3	-		-	16,86	6,97
15	-		-	17,24	7,04

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Condutividade do Tampão McIlvaine = 15,65 mS/cm

Tabela S29. Condutividade de ambas as fases co-existentes nos SMDFA compostos por TX-114 (1-15% m/m) e LI da família das colinas (0,05 – 0,50 M).

Triton X-114 (%m/m)	Sistema		Condutividade Fase <i>Top</i> (mS/cm)	Condutividade Fase <i>Bottom</i> (mS/cm)	
	Líquido Iônico				
	Concentração (M)	Tipo			
1	0,05	[Ch][Pent]	0,98	0,09	
	0,10		1,54	0,22	
	0,50		5,46	1,61	
15	0,05		1,18	0,68	
	0,10		1,86	1,23	
	0,50		6,13	5,01	
1	0,05		[Ch][Hex]	1,03	0,16
	0,10			1,72	0,25
	0,50			N.D.	N.D.
15	0,05	1,31		0,79	
	0,10	1,97		1,30	
	0,50	N.D.		N.D.	

N.D. Não determinado pois a temperatura para separação de fases foi superior a 70 °C

Artigos



Natural colorants from filamentous fungi

Fábio Aurélio Esteves Torres¹ · Bruna Regina Zaccarim¹ · Leticia Celia de Lencastre Novaes² ·
Angela Faustino Jozala³ · Carolina Alves dos Santos⁴ · Maria Francisca Simas Teixeira⁵ ·
Valéria Carvalho Santos-Ebinuma¹

Received: 29 October 2015 / Revised: 15 December 2015 / Accepted: 19 December 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract In the last years, there is a trend towards the replacement of synthetic colorants by natural ones, mainly due to the increase of consumer demand for natural products. The natural colorants are used to enhance the appearance of pharmaceutical products, food, and different materials, making them preferable or attractive. This review intends to provide and describe a comprehensive overview of the history of colorants, from prehistory to modern time, of their market and their applications, as well as of the most important aspects of the fermentation process to obtain natural colorants. Focus is given to colorants produced by filamentous fungal species, aiming to demonstrate the importance of these microorganisms and biocompounds, highlighting the production performance to get high yields and the aspects of conclusion that should be taken into consideration in future studies about natural colorants.

Keywords Natural colorants · Microorganisms · Filamentous fungi · Biomolecules · Bioprocess

Introduction

Color has always fascinated humans and plays an important role in the acceptability of products of several industrial segments, since consumers first judge the quality of a product by its color (Wrolstad and Culve 2011). For centuries, industries use additives to enhance or restore the original color of products and to ensure its uniformity between batches (Medeiros et al. 2012; Fernández-Lopez et al. 2013). Additives used to provide color to substances are called colorants and can be classified as pigments or dyes. The basic difference between them is their size and solubility (Saron and Felisberti 2006). Pigments are practically insoluble in the medium in which they are incorporated while dyes dissolve during application, losing their crystal or particulate structure in the process. Regarding the size, pigment particles are about 1–2 µm and dyes are smaller than it. Furthermore, the difference between pigments and dyes is therefore due to physical characteristics rather than chemical composition (Patel et al. 2012). Natural colorants from microorganisms can be pigments or dyes. To this reason, in this review, it will be called colorants independent of the source.

From prehistoric times, humans have left their mark on environment in the form of painted images, whether in the form of simple handprints, works of fine art, or spray-can graffiti. Many American indigenous civilizations used body and hair painting to communicate. Prehistoric painters used the colorants available next to their homes. The colors yellow ochre, red ochre, and black were obtained from soot from burning animal fat and charcoal from fire (Barnett et al. 2006). Natural colorants, such as bixin, genipin, and

✉ Valéria Carvalho Santos-Ebinuma
valeriac@fcfar.unesp.br

¹ Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Rodovia Araraquara - Jaú Km 1, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

² Institute of Biotechnology, RWTH Aachen University, Worringerweg 3, 52074 Aachen, Germany

³ Department of Technological and Environmental Processes, Sorocaba University – UNISO, Sorocaba, SP, Brazil

⁴ Laboratory of Biomaterials and Nanotechnology, University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, SP, Brazil

⁵ Culture Collection DPUA/UFAM, Federal University of Amazonas, Manaus, AM, Brazil

Imidazolium-based Ionic liquids as co-surfactants in aqueous micellar two-phase systems composed of nonionic surfactants and their aptitude for recovery of natural colorants from fermented broth

Fábio Aurélio Esteves Torres^a, Ana Clara de Almeida Francisco^a,
Jorge Fernando Brandão Pereira^a, Valéria de Carvalho Santos-
Ebinuma^{a,*}

^a *Universidade Estadual Paulista (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences, Campus (Araraquara), Department of Bioprocess and Biotechnology, Araraquara, SP, Brazil.*

***Corresponding Author:**

Valéria Carvalho Santos-Ebinuma – E-mail: valeriac@fcar.unesp.br
Universidade Estadual Paulista (UNESP), School of Pharmaceutical Sciences,
Campus (Araraquara), Department of Bioprocess and Biotechnology,
Rodovia Araraquara-Jaú/ Km 01, Campos Ville - Araraquara/SP
14800-903 - Araraquara - SP/Brazil
Phone: 55-16-3301-4647