

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SANTA
CATARINA

CAMPUS JARAGUÁ DO SUL

CURSO TÉCNICO EM QUÍMICA (MODALIDADE INTEGRADO)

BIANCA MELLISSA FIGUEIREDO

LUANA BEATRIZ SASSI

LUANA GABRIELI LANGE DOS SANTOS

NATHALIA LAIS DIAS

PÂMELA ADRIELLE MEYER

**EXTRAÇÃO DOS CORANTES NATURAIS ANTOCIANINA E CLOROFILA A
PARTIR DO REPOLHO ROXO E ESPINAFRE**

JARAGUÁ DO SUL - SC

2016

BIANCA MELLISSA FIGUEIREDO

LUANA BEATRIZ SASSI

LUANA GABRIELI LANGE DOS SANTOS

NATHALIA LAIS DIAS

PÂMELA ADRIELLE MEYER

**EXTRAÇÃO DOS CORANTES NATURAIS ANTOCIANINA E CLOROFILA A PARTIR
DO REPOLHO ROXO E ESPINAFRE**

Projeto de pesquisa desenvolvido no eixo formativo diversificado “Conectando Saberes” do Curso Técnico em Química (Modalidade Integrado) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina – Campus Jaraguá do Sul.

Orientadora: Prof^a MSc Ana Paula Aparecida Duarte Souza.

Coordenadora: Prof^a MSc Anne Cristine Rutsatz Bartz.

JARAGUÁ DO SUL - SC

2016

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não seria possível sem a colaboração de diversas pessoas. Gostaríamos de agradecer a todos que colaboraram, de forma direta e indiretamente, para que esse trabalho se tornasse viável.

Primeiramente, agradecemos a nossa orientadora: Prof^a MSc Ana Paula Aparecida Duarte Souza que nos auxiliou em todo o trabalho e nos incentivou, mesmo quando a pesquisa não estava dando certo.

Aos estagiários do laboratório Alex Vitor Pinto, Gabriel Klutckowski, Luciana Borges do Amaral e Vinicius Pelle, que sempre nos ajudaram com muita paciência, pois, quando iniciamos o trabalho, não tínhamos muito conhecimento sobre processos químicos e sobre os métodos que foram utilizados.

Aos professores Daniel Sputeid, Elder Correa Leopoldino e Giovani Pakuszewski por terem nos auxiliado com nossa pesquisa, mesmo não sendo nossos orientadores.

E por último ao IFSC- Campus Jaraguá do Sul, por nos permitir a realização de trabalhos científicos como este, para que assim possamos aprimorar nossos conhecimentos e nos prepararmos para o futuro.

A todos, agradecemos por fazerem parte da realização do nosso trabalho de pesquisa.

RESUMO

Nos dias de hoje, sabe-se dos benefícios que os ingredientes provenientes da natureza exercem, sendo melhores para o organismo do que as substâncias que são passadas por processos sintéticos e de industrialização. Partindo desse princípio, o presente trabalho tem como objetivo extrair os corantes naturais antocianina e clorofila, analisando o método mais eficiente, dentre a maceração e o Soxhlet, e o solvente mais eficiente, dentre o etanol com água e o hexano. Os corantes são encontrados, respectivamente, no repolho roxo e no espinafre. Com intuito de cumprir nossos objetivos, foram realizadas extrações utilizando métodos de maceração e Soxhlet, e os solventes etanol com água e hexano. As amostras extraídas com hexano foram passadas pelo rotaevaporador a fim de concentrar as soluções obtidas e recuperar o solvente. Já as amostras extraídas utilizando etanol com água foram deixadas evaporando na capela. Para as amostras de clorofila, foram padronizados os volumes, a fim de observar através da intensidade da cor, qual o melhor método para a extração de clorofila, concluindo que o Soxhlet fora o melhor. O hexano não extraiu nenhum dos dois corantes em nenhum dos dois métodos, já o etanol com água extraiu os dois corantes nos dois métodos. Como a antocianina é indicadora de pH, foram realizados testes deste a fim de indicar qual método foi mais eficiente na extração do corante. Porém, os resultados foram bastante parecidos na maceração e no Soxhlet, não podendo ser indicado qual método extraiu mais corante.

Palavras Chaves: Antocianina; Clorofila; Extração; Métodos; Solventes;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das antocianinas	8
Figura 2: Estrutura da clorofila	9
Figura 3: Aparato experimental da maceração simples: almofariz e pistilo	10
Figura 4: Aparato experimental do tipo Soxhlet	11
Figura 5: Esquema sobre o funcionamento da coluna cromatográfica de empacotamento ...	13
Figura 6: Estrutura do hexano	14
Figura 7: Estrutura do etanol	15
Figura 8: Cromatografia realizada com antocianina utilizando etanol	17
Figura 9: Estrutura da clorofila	20
Figura 10: Comparação de testes de pH das amostras extraídas na maceração utilizando etanol com água	21
Figura 11: Comparação de testes de pH das amostras extraídas no Soxhlet utilizando etanol com água	21
Figura 12: Comparação de qual método extraiu mais clorofila com o solvente etanol com água	22
Figura 13: Maceração de espinafre para a extração de clorofila utilizando hexano	23
Figura 14: Extração da clorofila através do espinafre pelo Soxhlet utilizando hexano	23
Figura 15: Maceração de repolho roxo para a extração de antocianina utilizando hexano ...	24
Figura 16: Extração da antocianina através do repolho roxo pelo Soxhlet utilizando hexano	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 CORANTES	6
2.1.1 Antocianina	7
2.1.2 Clorofila	8
2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	10
2.2.1 Maceração	10
2.2.2 Soxhlet	11
2.3 CROMATOGRAFIA	12
2.4 SOLVENTES	14
2.4.1 Solventes apolares	14
2.4.2 Solventes polares	15
2.5 UTILIZAÇÃO DE CORANTES NATURAIS NA INDÚSTRIA	15
2.6 MALEFÍCIOS E BENEFÍCIOS DOS CORANTES NATURAIS PARA A SAÚDE E INDÚSTRIA	17
3 METODOLOGIA	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4.1 CROMATOGRAFIA	19
4.2 ANTOCIANINA E SOLVENTES	20
4.3 CLOROFILA E SOLVENTES	21
4.4 POLARIDADE DAS CLOROFILAS	22
4.5 TESTE DE PH COM AS AMOSTRAS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINA	23
4.6 TESTE DE PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DA CLOROFILA	24
4.7 EXTRAÇÕES COM HEXANO	25
4.8 TRATAMENTO DE RESÍDUOS	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Corante é aquilo que, adicionado a outra substância, modifica a cor desta, podendo ser natural ou artificial. O uso dos corantes artificiais vem apresentando certos problemas à saúde, como por exemplo alergias. Por isso, achou-se relevante o estudo dos corantes naturais, visando que estes ajudam na prevenção, tratamento e cura de doenças, ao contrário dos corantes artificiais.

A presente pesquisa baseia-se na extração dos corantes naturais antocianina e clorofila, utilizando dois métodos de extração, a maceração e o Soxhlet, juntamente com dois solventes, hexano e etanol com água, respectivamente apolar e polar. Tendo, então, como objetivo geral analisar o método mais eficiente, dentre a maceração e o Soxhlet, e o solvente mais eficiente, dentre o hexano e o etanol com água, para a extração dos corantes naturais antocianina e clorofila encontrados em verduras.

Foi elaborado dois objetivos específicos, sendo eles: verificar o método mais eficaz, dentre os utilizados, na extração de corantes naturais e avaliar qual o solvente mais eficiente, dentre os utilizados, na extração de corantes naturais. Ou seja, com o intuito de determinar entre métodos e solventes, qual a melhor forma de extrair os dois corantes.

Elaborou-se ainda três hipóteses, sendo elas: tendo em vista a polaridade das antocianinas, seu corante será melhor extraído utilizando o solvente etanol, o hexano solubilizará melhor a clorofila do que o etanol em virtude da polaridade das clorofilas, a clorofila será o corante cuja extração constituirá o melhor resultado qualitativo. Após a extração dos corantes, foi realizado um teste de pH (potencial de hidrogênio) com a antocianina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CORANTES

“Os corantes são uma classe de aditivos alimentares, definidos como substâncias que têm a finalidade de conferir, intensificar ou padronizar a coloração dos produtos alimentícios, proporcionando as mesmas características de um produto natural” (BRASIL, 1997; CUNHA, 2008 apud SOUZA, 2012, p. 17).

Segundo o Conselho Regional de Química (2011), a principal diferença entre corante e pigmento é que, quando aplicados, os pigmentos são insolúveis no meio aplicado, enquanto os corantes são solúveis.

Outro diferencial é em relação a cobertura, pois quando usa-se o pigmento em uma tinta, ele promove, simultaneamente, a cobertura, a opacidade, o tingimento e a cor. Já o corante só promove o tingimento, sem proporcionar cobertura total. Deste modo, o corante mantém a transparência do objeto tingido, já o pigmento dá a cor e tira a transparência (CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA, 2011).

Em relação a diferença entre corantes naturais e artificiais, temos que os corantes naturais são aqueles obtidos a partir de vegetais ou, eventualmente, de animais. Já os corantes artificiais são aqueles obtidos por processo de síntese, com composição química definida. Os corantes sintéticos idênticos aos naturais são aqueles cujas estruturas químicas são semelhantes às dos corantes naturais, porém são sintetizados em laboratório (ANVISA, 1977).

Em seguida, será abordado os corantes que foram utilizados na presente pesquisa, antocianina e clorofila.

2.1.1 Antocianina

Segundo Castañeda (2009), as antocianinas, do grego “anthos” = flor e “kyanos” = azul, são pigmentos vegetais, responsáveis por uma grande variedade de cores observadas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas, que podem ir desde o vermelho (condição ácida) até o azul/violeta ou amarelo (condição alcalina) (CASTAÑEDA, 2009).

Pertencentes do grupo dos flavonóides, as antocianinas são compostos fenólicos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas. A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, iniciando com perda da cor, seguida do surgimento de coloração amarelada e formação de produtos insolúveis. A estabilidade da cor de antocianinas depende da estrutura e da concentração dos pigmentos, além de fatores como o pH, a temperatura e a presença de oxigênio (LOPES, et al, s/d).

A estrutura química da antocianina, como podemos ver na Figura 1, se consiste em e dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensados por um oxigênio, sendo que os radicais (R1, R2, R3, R4, R5, R6 e R7) podem ser hidrogênios, açúcares ou hidroxilas (LOPES, et al., 2000).

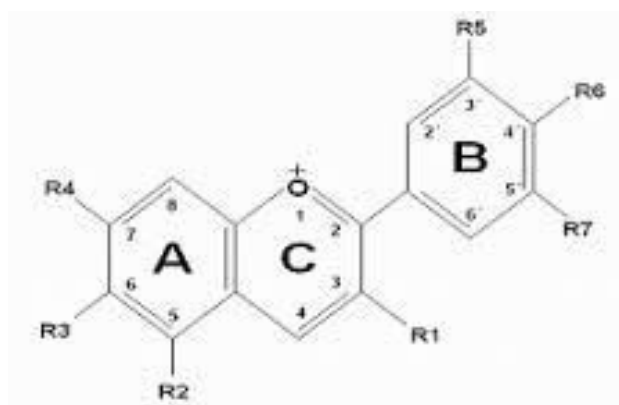


Figura 1: Estrutura das antocianinas.
Fonte: Lopes et al., 2000.

As antocianinas são polares e são facilmente extraídas de materiais vegetais por solventes orgânicos. Tradicionalmente, soluções acidificadas de metanol, etanol, acetona e água (JU & HOWARD, 2003).

Apresentando grande importância para a saúde humana por serem antioxidantes, as antocianinas previnem e retardam doenças cardiovasculares, cânceres e doenças neurodegenerativas. Podem ser encontradas em numerosas famílias do reino *Plantae*, porém, no presente trabalho fora extraído do repolho roxo que se encontra na família *Cruciferae* (CASTAÑEDA, 2009).

2.1.2 Clorofila

As moléculas de clorofila têm a capacidade de realizar fotossíntese e estão localizadas nos cloroplastos da célula. Além disso, são elas que dão a cor verde às plantas. A clorofila é o resultado da mistura de duas substâncias: clorofila *a* e clorofila *b*.

Tendo um átomo de Mg (magnésio) no centro de sua estrutura tetrapirrólica (composto formado por quatro anéis pirrólicos), sendo caracterizada como um composto heterocíclico (composto que tem um anel, do qual fazem parte pelos menos dois tipos de

átomos diferentes), a clorofila é insaturada, ou seja, possui ligações químicas duplas ou triplas, sendo, nesse caso, duplas, como podemos ver na Figura 2 (STREIT *et al.*, 2005).

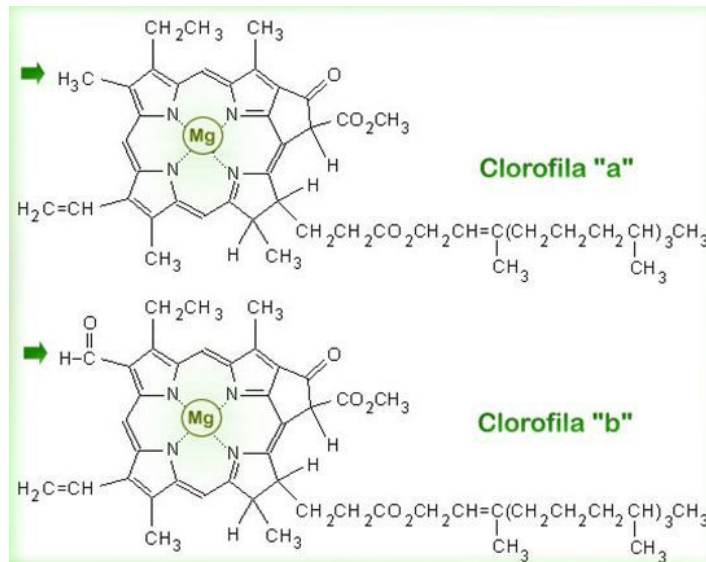


Figura 2: Estrutura da clorofila.
Fonte: Martinez, s/d.

A diferença entre as duas clorofilas é que na primeira há uma metila (-CH₃) na cadeia lateral e na segunda há um grupo formila (-CHO) (MIRANDA, 2002). Por esse motivo, a clorofila *b* possui um caráter mais polar que a clorofila *a*, já que esse grupo formila irá interagir com a água em uma reação, formando ligações de hidrogênio.

A clorofila participa de uma cadeia de transporte de elétrons, absorvendo fótons de luz emitidos pelo sol, porém ela absorve apenas o vermelho e o violeta, refletindo o amarelo e o verde, caracterizando a cor das plantas (PAZZA, 2004).

A intensidade da cor da clorofila pode variar desde o verde escuro até o claro, sendo muito importante no comércio por ser um corante e por ser antioxidante (STREIT *et al.*, 2005).

Os alimentos que possuem grande concentração de clorofila são a couve, o brócolis, a salsa, a rúcula, a acelga e o agrião (CHIAPETTA, s/d). Sendo o espinafre o vegetal que mais contém o corante (MIRANDA, 2002).

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Extração, segundo Miyake (s/d), significa retirar, de maneira mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na matéria vegetal.

Para a escolha de um método extrativo, precisa-se analisar principalmente a eficiência, a disponibilidade e o custo do processo de extração, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar.

Na escolha dos métodos de extração, optou-se em utilizar a maceração simples e o Soxhlet.

2.2.1 Maceração

A maceração é uma das técnicas extrativas mais utilizadas devido a sua simplicidade e custos reduzidos. É uma técnica de extração a frio, realizada num recipiente fechado, com temperatura ambiente, sob agitação ocasional, sem reposição do solvente e a duração pode variar entre horas ou dias.

Segundo Miyake (s/d), existem diversas variações desse método que objetivam o aumento da eficiência de extração, podemos citar, por exemplo: a digestão (realizada em sistema aquecido), maceração dinâmica (realizada com agitação constante) e a remaceração (realizada com reposição do solvente).

Decidiu-se não utilizar nenhuma das variações, usando, então, a maceração simples para extração dos corantes. A maceração simples consiste em macerar a matéria vegetal adicionando certa quantidade de solvente. O seu aparato experimental, almofariz e pistilo, está representado na Figura 3.



Figura 3: Aparato experimental da maceração simples: almofariz e pistilo.
Fonte: Cesar, 2009. Não paginado.

2.2.2 Soxhlet

O aparelho Soxhlet é utilizado, principalmente, para extrair sólidos com solventes voláteis, ou seja, que evaporam facilmente. Esse método consiste em uma extração a quente e realizado em um sistema fechado. O seu aparato experimental, formado por um balão de fundo redondo, um condensador, um extrator de Soxhlet e uma manta de aquecimento, está representado na Figura 4.

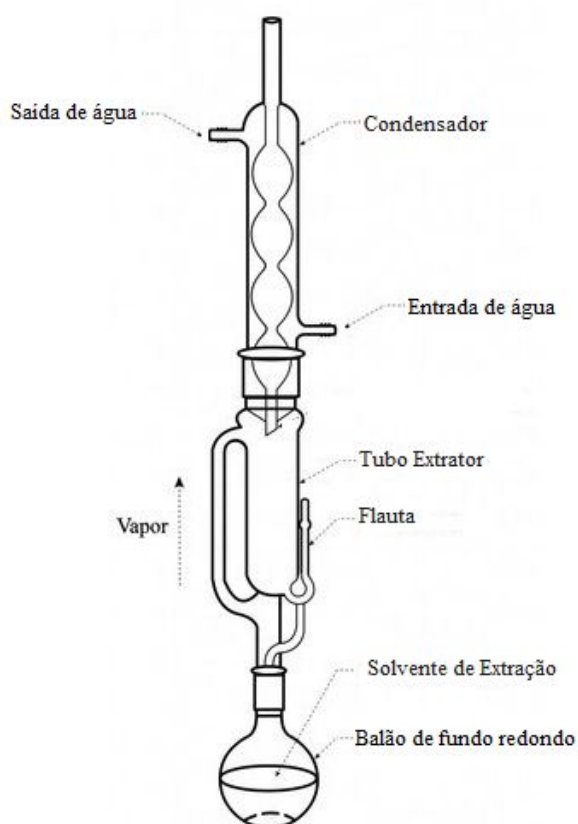


Figura 4: Aparato experimental do tipo Soxhlet (adaptado e traduzido).
Fonte: Anacleto, 2010, p. 8.

Segundo Miyake (s/d), a cada ciclo da operação, a matéria vegetal entra em contato com o solvente renovado, sendo assim uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente em comparação as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos.

Esse método, segundo Miyake (s/d), não precisa de monitoramento constante e funciona da seguinte forma: um solvente é aquecido em um balão de fundo redondo com a ajuda da manta térmica.

O solvente começa a evaporar para, então, ser condensado. Quando condensa, inicia-se o gotejamento do solvente na amostra sólida, permitindo assim, que pela polaridade próxima entre o solvente e a matéria, a amostra se dissolva com a matéria vegetal. Com essa interação, o solvente extrai o corante e o deposita no balão coletor.

2.3 CROMATOGRAFIA

A cromatografia, segundo Cass, Degani e Vieira (1998), é um método físico-químico de separação que está relacionada à migração diferencial dos componentes de uma mistura. Isso acontece em virtude de haver diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo elas a fase móvel e a fase estacionária.

De acordo com Pavia *et al.* (2009), a cromatografia possui diversas variações, entre elas está a cromatografia em coluna de empacotamento. Este é tipo de cromatografia que será utilizado. Ela se caracteriza por ser uma técnica sólido-líquido, baseada na adsorção e solubilidade.

Na cromatografia em coluna de empacotamento usa-se: um adsorvente, que é sólido e que não é dissolvido na fase líquida, os adsorventes mais utilizados são a alumina e a sílica em gel.

De acordo com Pavia *et al.* (2009), também é necessário o uso de solventes, o mais comum é começar com a eluição com um solvente apolar e aumentar a polaridade dos solventes gradativamente. Existem casos em que apenas um solvente é necessário. Um esquema para o funcionamento de uma coluna cromatográfica está apresentado na Figura 5.

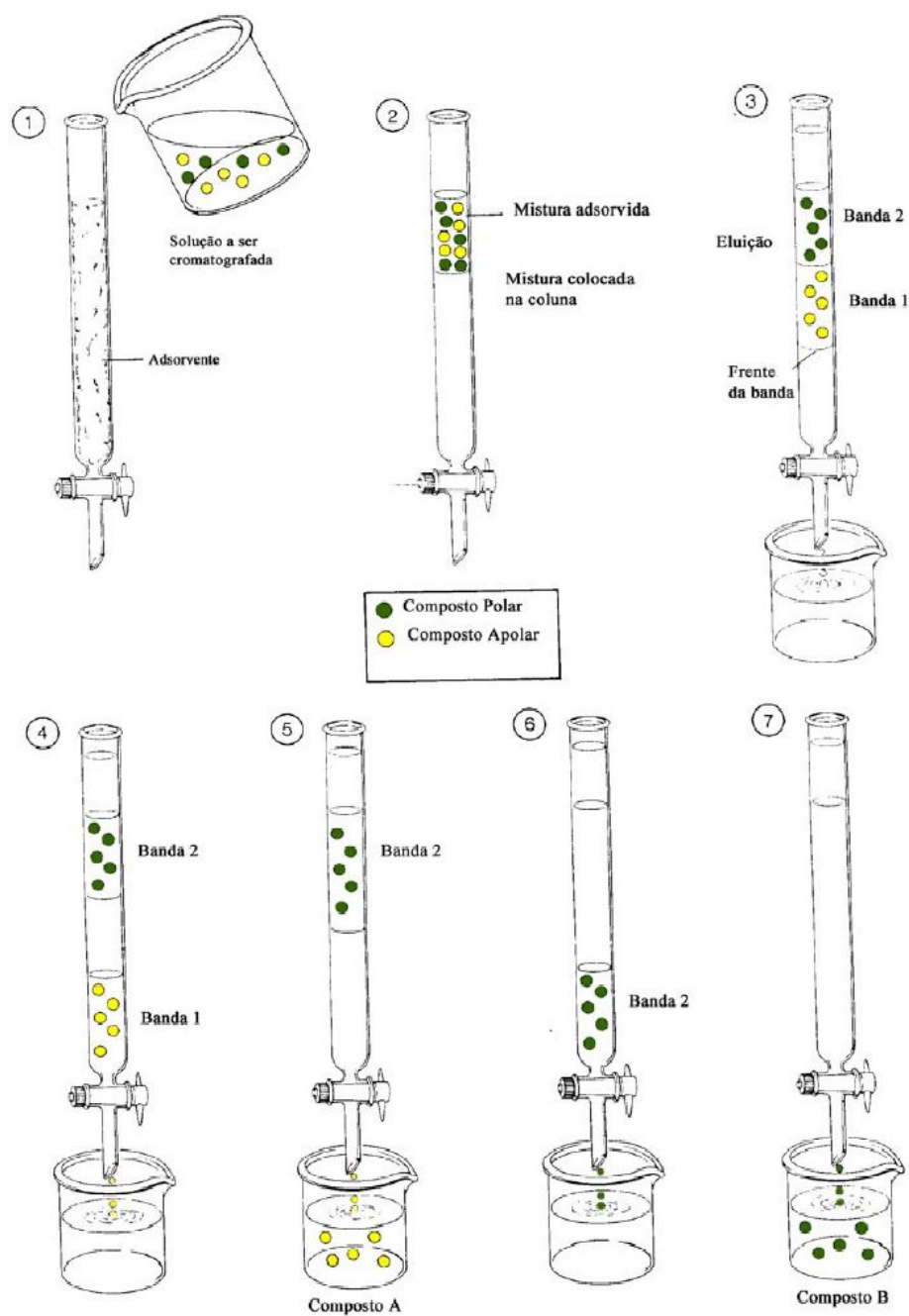


Figura 5: Esquema sobre o funcionamento da coluna cromatográfica de empacotamento.

Fonte: Pavia *et al.*, 2009, p. 678

Existem alguns parâmetros que podem afetar a separação da mistura, entre eles: o adsorvente escolhido, a polaridade dos solventes, o tamanho da coluna em relação ao material a ser cromatografado e o fluxo da eluição.

2.4 SOLVENTES

Uma solução é composta por duas ou mais substâncias, e essas substâncias são divididas em soluto e solvente. O solvente, também chamado de dispersante, é aquele que, geralmente, se encontra em maior quantidade dentro da solução (FILHO, 2011).

Os solventes são separados em solventes polares e solventes apolares. Geralmente, substâncias apolares dissolvem substâncias apolares, e substâncias polares dissolvem substâncias polares, seguindo a regra empírica: “semelhante dissolve semelhante”. Ou seja, um solvente polar irá dissolver uma substância ou ainda outro solvente polar, enquanto um apolar irá dissolver uma substância ou solvente apolar (ANDRADE, LOPES, MARTINS, 2013).

Em seguida, serão apresentados os solvente polares e apolares.

2.4.1 Solventes apolares

De acordo com Andrade, Lopes e Martins (2013), solventes apolares são aqueles que, geralmente, são capazes de solubilizar compostos apolares ou fracamente polares. Para ser considerada uma molécula apolar é necessário que os átomos envolvidos possuam a mesma eletronegatividade ou que o momento dipolar (soma dos vetores de cada ligação polar) seja baixo ou nulo.

Alguns exemplos de solventes apolares são: etanol, hexano, tetracloreto de carbono e benzeno.

O hexano (C_6H_{14}) é considerado um dos solventes mais apolares por conta de sua estrutura, apresentada na Figura 6. Por esse motivo, não se solubiliza em água, mas sim em outros compostos também apolares.

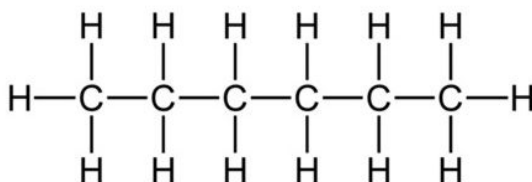


Figura 6: Estrutura do hexano.
Fonte: Maia, 2009.

2.4.2 Solventes polares

Uma das principais características para uma substância orgânica ser solúvel em uma outra substância, é a sua estrutura molecular, com maior enfoque na sua polaridade. Segundo Martins, Lopes e Andrade (2013), os solventes polares são capazes de solubilizar compostos polares. Moléculas polares apresentam uma diferença de eletronegatividade entre seus átomos.

Exemplos de solventes polares são: etanol, água, clorofórmio, acetato de etila, metanol, 1,2-dicloroetano e acetona (CUNHA, 2008).

O etanol (C_2H_5OH) é um composto polar, faz parte da função orgânica álcool, altamente solúvel em água em decorrência da forte ligação de hidrogênio entre a água e álcool, pode-se ver a sua estrutura na Figura 7.

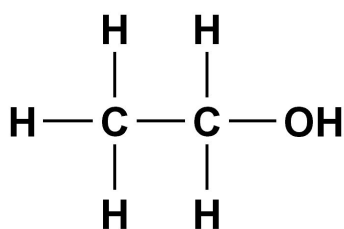


Figura 7: Estrutura do etanol.
Fonte: Ferreira, et al. 2010.

A água é um dos melhores solventes que existe na natureza, dissolve grande parte dos compostos. Substâncias hidrofóbicas possuem aversão a água, portanto insolúveis em água, moléculas hidrofóbicas geralmente não possuem polos, portanto não há interação entre essas moléculas e a água.

Já as substâncias hidrofílicas possuem afinidade com a água portanto se solubilizam em água, as moléculas hidrofílicas possuem polos, pelo fato de a água ser polar, essas moléculas interagem, (MARTINS, 2013).

2.5 UTILIZAÇÃO DE CORANTES NATURAIS NA INDÚSTRIA

Embora a maioria dos corantes sintéticos sejam classificados como seguros, os consumidores estão cada vez mais interessados em produtos de origem natural, que causam

menores danos à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, em busca de atender esse novo nicho de mercado, as indústrias alimentícias, cosméticas, papelerias, têxteis e de plásticos têm aumentado o uso de corantes naturais. Atualmente, há uma série de produtos, principalmente alimentícios, que já utilizam corantes naturais.

Na indústria têxtil, os corantes são compostos orgânicos usados com a finalidade de aderir uma cor à fibra.

Muitos têm sido os corantes naturais utilizados para tingir tecidos. No entanto, embora o mundo das plantas esteja cheio de cor, poucas substâncias coradas possuem as características de estabilidade à luz e à lavagem adequadas à sua aplicação aos têxteis (ARAÚJO, 2006, p. 5).

O processo de tingimento é a etapa em que o corante é fixado sobre a fibra. Os corantes naturais, em relação aos corantes sintéticos, apresentam uma grande vantagem no tratamento de efluentes, que representa um grande problema para a indústria têxtil, pois a produção gera uma grande quantidade de efluentes, que têm como destino os rios.

Uma área promissora para o tratamento desses efluentes tem sido a dos métodos de biodegradação, aumentando o interesse sobre os corantes naturais, posto que estes sejam facilmente tratados por métodos de biodegradação.

No setor de plásticos, a escolha e desenvolvimento das cores ideais envolve aspectos além dos considerados comumente, como estética e propaganda. A obtenção de um produto colorido feito de plástico envolve a coordenação de diversas informações (CROMEX, 2001 apud VELOSO, 2012).

Já na indústria cosmética, corantes são determinantes nas características finais de um produto e, conseqüentemente, na sensação de beleza causada pelo uso de um cosmético. O setor de cosméticos necessita que os corantes apresentem granulometria muito fina (<50 µm) e tons não comuns (por isso não há utilização de corantes naturais nesse setor), como é o caso dos corantes de brilho perolado (CASQUEIRA; SANTOS, 2008 apud VELOSO, 2012).

O alto consumo de papel nas últimas décadas vem gerando estratégias comerciais que incluem o artifício da cor nos diferentes usos do papel, como em folhas de revistas, banners e catálogos industriais. A primeira etapa da fabricação de papel envolve várias operações, entre elas, o tingimento. Nessa operação são adicionados corantes à massa para se obter a cor

desejada do produto final (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, 2007 apud VELOSO, 2012).

O corante ideal para ser empregado na fabricação de papel colorido deve apresentar boa afinidade com o papel, resistência à luz, fornecer estabilidade à temperatura e umidade e não afetar qualquer outro parâmetro de processo (DYES & PIGMENTS, s/d apud VELOSO, 2012).

Ao trabalhar com tintas naturais surgem dúvidas quanto à sua durabilidade e conservação. Dependendo da aplicação, ela terá comportamentos diferentes. Com poucas exceções, as tintas vegetais são sensíveis à luz e sempre vão perder um pouco da sua cor. São instáveis, por isso se consegue belíssimas cores de flores e frutos que depois ficam amarronzadas.

2.6 MALEFÍCIOS E BENEFÍCIOS DOS CORANTES NATURAIS PARA A SAÚDE E INDÚSTRIA

Como benefícios dos corantes naturais, têm-se as funções importantes que eles exercem no organismo, sendo elas: função antioxidante, proteção à ação da luz, auxílio no mecanismo de defesa do organismo, prevenção da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (colesterol LDL, “ruim”) e prevenção do câncer, da diabetes, da cegueira e da xeroftalmia (deficiência de vitamina A).

Além disso, os corantes naturais suplementam diversas vitaminas que o corpo necessita para o bom funcionamento, diminuem os triglicerídeos totais, auxiliam na digestão dos alimentos e na circulação sanguínea (SOUZA, 2012; PASTORE, *et al.*, 2007; VOLP, *et al.*, 2009).

Por enquanto, não foram encontrados malefícios desses corantes, e nem estudos abordam sobre estes.

Porém, para as indústrias (alimentícias principalmente), ainda é um desafio efetuar a substituição desses corantes, mesmo tendo ótimas propriedades, por conta da instabilidade deles, tornando os processos de fazedura dificultosos e caros (SOUZA, 2012).

3 METODOLOGIA

O corante antocianina foi extraído do repolho roxo e a clorofila, do espinafre. Antes de iniciar o procedimento, as folhas desses vegetais foram lavadas com água e secos com papel toalha, a fim de evitar qualquer contaminante que pudesse influenciar nos resultados. Em seguida, o material que seria utilizado foi cortado em pedaços menores.

A maceração foi feita durante dez minutos com intervalos de uma hora entre as mesmas e esse processo ocorreu por três vezes. Os solventes utilizados foram: hexano (50 mL) e etanol (30 mL) com água (20 mL). A quantidade de repolho roxo e espinafre usada foi de 12 g em ambos os casos.

No método de extração Soxhlet foram utilizados os mesmos solventes, porém em quantidades diferentes, mas com proporcionalidade, sendo: 140 mL de hexano e 84 mL de etanol com 56 mL de água. Foi misturado o etanol com a água na intenção de aumentar a polaridade do solvente. A quantidade de repolho roxo e espinafre foi a mesma (12g). A quantidade de ciclos para antocianina foi de 6 (seis) ciclos e para a clorofila 8 (oito) ciclos. Essa diferença na quantidade dos ciclos ocorreu porque as quantidades foram definidas a partir de testes realizados. Estes ensaios tiveram como princípio a observação visual, ou seja, quando a solução passou a ficar incolor, entendeu-se que a extração dos corantes já havia ocorrido.

Posteriormente, as amostras extraídas com hexano foram para o rotaevaporador para concentrar os produtos e retirar o solvente, recuperando-o. Já as amostras obtidas utilizando etanol com água ficaram evaporando na capela, pois o ponto de ebulição destes solventes é maior do que o ponto de degradação dos corantes, não podendo ir para o rotaevaporador.

Por fim, realizou-se testes de pH com as amostras de antocianina extraídas a partir do etanol com água, tanto da maceração quanto do Soxhlet. Para isso, utilizou-se um medidor de pH para se obter duas amostras com cada um dos seguintes valores de pH: 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Esse teste foi realizado com a finalidade de avaliar qual método é mais eficiente a partir da intensidade da cor da amostra, podendo saber assim, qual estava mais concentrado.

Utilizou-se hidróxido de potássio (KOH) a fim de fazer as soluções de caráter básico, e ácido sulfúrico (H₂SO₄) para as soluções de caráter ácido, sendo diluído com água cada vez. Em cada etapa dos testes, foram utilizados 4mL tanto de hidróxido de potássio quanto de ácido sulfúrico e cerca de 15 gotas da amostra de antocianina.

E para as amostras de clorofila, foi igualada a quantidade de volume, acrescentando-se o solvente utilizado na extração (etanol com água), das duas amostras extraídas através da maceração e do Soxhlet. Isso foi realizado com a finalidade de comparar e identificar qual método, dentre a maceração e o Soxhlet, foi mais eficiente na extração de clorofila.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CROMATOGRAFIA

Quando foi realizada a cromatografia, visualmente não houve uma separação significativa da amostra, como pode ser visto na Figura 8. Acredita-se que isso ocorreu devido a polaridade da coluna e os solventes utilizados.

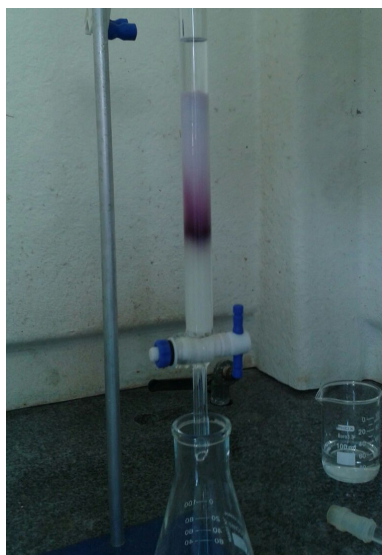


Figura 8: Cromatografia realizada com antocianina utilizando etanol.

Foi realizada uma cromatografia *flash*, na qual se utiliza uma bomba à vácuo para acelerar o processo. O repolho roxo não foi dessecado antes da extração, pois a antocianina degrada facilmente em temperaturas próximas a 60°C, devido a isso as amostras continham água. Esses são outros fatores que podem também ter influenciado no resultado da

cromatografia. Pelos motivos acima expostos, este método não foi utilizado na separação dos corantes.

4.2 ANTOCIANINA E SOLVENTES

No primeiro teste realizado, foi extraído antocianina através da maceração, utilizando 100 mL do solvente etanol e 30 g de repolho roxo. Realizou-se cinco vezes a maceração, esse processo foi realizado em intervalos de uma hora por dez minutos. Após isso, percebeu-se uma mudança na cor: a amostra adquiriu uma coloração marrom. Posteriormente, depois de passar a amostra pelo rotaevaporador para concentrá-la, essa voltou a coloração inicial (roxo). No fim, colocou-se a amostra em um vidro âmbar embrulhada com papel alumínio, para não degradar a mesma.

No segundo teste, repetiu-se o processo de extração utilizando a maceração, porém foi mudado o solvente, sendo este a acetona. No entanto, após ser realizado o teste, verificou-se que a extração não fora bem sucedida, por não ter extraído muita antocianina, já que a amostra apresentava uma cor muito clara.

No terceiro teste, fora realizada a extração por Soxhlet. Utilizou-se 12 g de repolho e 140 mL do solvente hexano. Percebeu-se que, por conta da polaridade, não fora extraído nada de antocianina, já que estas são polares e o hexano é apolar.

Na intenção de padronizar os valores utilizados de repolho, no quarto teste, foi realizada a maceração com 12 g de repolho e 50 mL de um novo solvente, sendo este o álcool isopropílico. A maceração foi realizada por três vezes, novamente com intervalos de uma hora durante dez minutos. O álcool isopropílico, visualmente, extrai uma quantidade razoável de antocianina, porém maior que a extração com acetona.

Ainda no mesmo dia do quarto teste, foi realizada a maceração com 12 g de repolho e como solvente polar, 30 mL de etanol com 20 mL de água. Repetiu-se a metodologia das extrações anteriores. A maceração foi realizada três vezes, em intervalos de uma hora durante dez minutos. A combinação de etanol e água foi a que, visualmente, extraiu mais antocianina.

Ainda no mesmo dia do teste quatro, foi realizado o soxhlet com 12 g de repolho e 140 mL do solvente acetona. Após retirada do Soxhlet, percebeu-se que, com o tempo, a amostra ficou esbranquiçada perdendo a sua coloração roxa inicial.

Após realizar estes três procedimentos no dia do quarto teste, percebeu-se que a coloração das três amostras estavam diferentes. Sabe-se que a antocianina é indicadora de pH, então foram realizados testes de pH usando fitas de tornassol. Para isso, separou-se quantidades de hidróxido de sódio, para assim acrescentar algumas gotas de cada amostra de antocianina, que por ser um indicador de pH, apresentou diferentes tonalidades de verde (em razão de se tratar de um composto básico a ser testado). Quanto maior a intensidade da cor verde, maior a quantidade de indicador de pH, ou seja, maior a quantidade de antocianina.

Observou-se a que amostra obtida com acetona extrai uma quantidade menor de antocianina, pois a coloração apresentada após ser realizado o teste de pH era verde claro. Além disso, verificou-se a presença de compostos com característica fluorescente quando foi colocada na câmara de revelação UV (verifica a presença de compostos fluorescentes pois dentro da mesma existem luzes UV-a e UV-b e uv-c de alta intensidade) após os testes de pH.

Na amostra extraída com álcool isopropílico, percebeu-se uma quantidade maior de antocianina extraída do que na amostra extraída com acetona, já que a coloração verde estava mais intensa do que a da acetona. A amostra extraída utilizando etanol com água apresentou uma grande quantidade de antocianina, pois sua coloração era de um verde mais intenso do que nas outras duas. Por isso, optou-se por utilizar este último solvente, já que na mistura de etanol com água, há aumento da polaridade do solvente.

No entanto, não se confere a recuperação destes solventes no rotaevaporador, pois como o ponto de ebulição do etanol e da água são elevados, ou seja, 78,4 °C e 100 °C, respectivamente, teria a degradação da antocianina.

4.3 CLOROFILA E SOLVENTES

No primeiro teste de clorofila fora realizada a extração, utilizando a maceração, com 100 mL do solvente acetona e 30 g de espinafre. A maceração foi realizada durante dez minutos, em intervalos de uma hora, sendo esse processo repetido cinco vezes. Após a

extração, a amostra foi passada pelo rotaevaporador, para concentrar a mesma. Posteriormente, foi realizada uma filtração líquido-líquido adicionando hexano, utilizando a amostra concentrada de clorofila com acetona. No final, colocou-se a amostra final em um vidro âmbar embrulhado com papel alumínio, para retardar a degradação do corante.

4.4 POLARIDADE DAS CLOROFILAS

A clorofila possui uma estrutura grande, como pode ser visto na Figura 9, o que conferiria a ela uma menor polaridade, ou seja, mais apolar. Porém, não há apenas um tipo de clorofila presente nos alimentos, mas sim dois tipos, sendo elas: clorofila *a* e clorofila *b*.

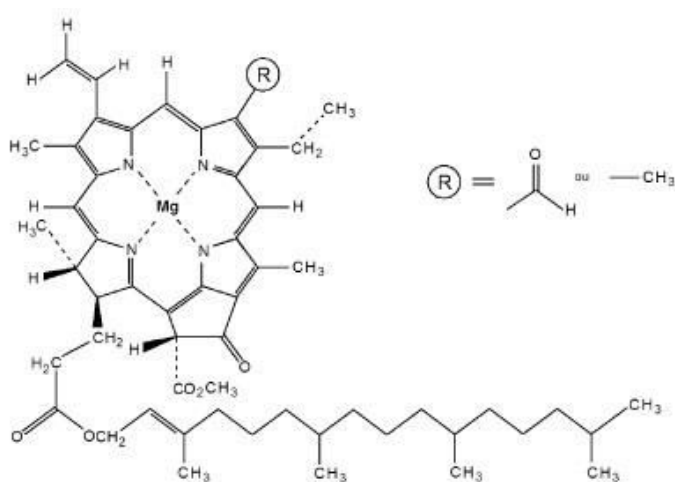


Figura 9: Estrutura da clorofila. O radical (R) difere a *clorofila a* e a *clorofila b*.
Fonte: Assis, 2013, p. 3.

De acordo com Streit (2005), a clorofila *b* é considerada mais polar que a clorofila *a*, pois em sua estrutura há a substituição em uma das pontas do grupo metila (- CH₃) por um aldeído (- CHO). Por esse motivo, para a extração das clorofilas, os solventes mais eficazes são os polares como acetona, etanol e metanol.

Além disso, elas possuem ligações frágeis, e por isso podem se romper com facilidade ao serem maceradas em solventes orgânicos.

Essa divergência de informações com relação à polaridade da clorofila, fez com que fosse esperado que o hexano (solvente apolar) extraísse melhor a clorofila, porém acredita-se que o espinafre possui mais clorofila *b*, ou seja, é mais polar, e por esse motivo a clorofila foi melhor extraída do espinafre com o solvente polar (etanol com água) do que com o solvente apolar (hexano).

Também, acredita-se que, além de clorofila, também foram extraídos alguns outros compostos que não foram possíveis separar na cromatografia, o que justificaria a cor amarelada da clorofila em alguns testes.

4.5 TESTE DE PH COM AS AMOSTRAS DE EXTRAÇÃO DE ANTOCIANINA

Segundo Terci e Rossi (2002), a antocianina é indicadora de pH (potencial de hidrogênio), então fora decidido testar qual método, dentre a maceração e o Soxhlet, foi mais eficiente na extração do corante a partir do teste de pH. A antocianina sendo indicadora de pH, proporcionará diferentes cores indicando se a solução é ácida, neutra ou básica.

O potencial hidrogeniônico (pH), se refere a concentração de íons H^+ ou H_3O^+ (cátions hidrônio ou hidroxônio) e de OH^- (ânion hidroxila) presentes em algum meio, indicando se a solução ali presente é ácida, básica ou neutra (DIAS, s/d). Além disso, quanto mais íons H^+ ou H_3O^+ houver no meio, mais ácida será a solução, então, por consequência, que quanto mais íons OH^- houver no meio, mais básica será a mistura (.

Os testes foram realizados utilizando amostras de hidróxido de potássio (KOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Cada amostra reagiu apresentando certa coloração, que indicava qual a solução presente (básica ou ácida). Quanto mais intensa a coloração da amostra, maior a quantidade de indicador de pH, ou seja, maior a quantidade de antocianina. Porém, a partir dos testes realizados, não pôde ser definido qual método é mais eficiente, ou seja, qual extraiu mais antocianina, pois as intensidades das cores obtidas foram muito próximas, como pode ser visto nas Figuras 10 e 11.



Figura 10: Comparação de testes de pH das amostras extraídas na maceração utilizando etanol com água.



Figura 11: Comparação de testes de pH das amostras extraídas no Soxhlet utilizando etanol com água.

4.6 TESTE DE PADRONIZAÇÃO DE AMOSTRAS DA CLOROFILA

Para a clorofila, decidiu-se fazer uma padronização de volumes. Para as extrações de maceração, utilizou-se 20 mL de água e 30 mL de etanol. Já para o extrator de Soxhlet, foram utilizados, com proporcionalidade, 84 mL de etanol com 56 mL de água, pois esse é o volume necessário para o equipamento.

Após as extrações, foram obtidos diversos valores de volume, uma vez que foram deixados evaporando em uma capela, então verificou-se qual amostra continha mais volume, e foram padronizadas as outras amostras a partir deste. Haja visto que foram realizados cálculos para ser adicionado etanol com água com proporcionalidade.

Na Figura 12, é possível perceber, através da intensidade da cor após a padronização proporcional de solvente, que o Soxhlet extraiu mais corante. Tendo em vista que todos os integrantes do grupo fizeram essa análise, na mesma luz e em mesmo fundo.



Figura 12: Comparação de qual método extraiu mais clorofila com o solvente etanol com água (na esquerda Soxhlet e na direita maceração).

4.7 EXTRAÇÕES COM HEXANO

Era esperado que o hexano extraísse clorofila, pois acreditava-se que suas polaridades fossem parecidas, porém, como já abordado anteriormente, a clorofila pode possuir caráter mais polar, então seria melhor extraído com um solvente polar do que com um solvente apolar. E foi isso que aconteceu, como pode ser visto nas Figuras 13 e 14. A clorofila não foi bem extraída utilizando o hexano (solvente apolar), e ainda, foram extraídas outras substâncias junto, pois, além da reduzida intensidade de cor na extração, a coloração é mais amarelada.



Figura 13: Maceração de espinafre para a extração clorofila utilizando hexano.



Figura 14: Extração da clorofila através do espinafre pelo Soxhlet utilizando hexano.

Porém, já era esperado que o hexano não extraísse antocianina por conta da polaridade distinta das duas substâncias. Como podemos ver na figura 15 e 16, não houve nenhuma interação em nenhum dos dois métodos utilizados.



Figura 15: Maceração de repolho roxo para a extração de antocianina utilizando hexano.

Figura 16: Extração da antocianina através do repolho roxo pelo Soxhlet utilizando hexano.

4.8 TRATAMENTO DE RESÍDUOS

A matéria orgânica utilizada, ou seja, repolho roxo e espinafre, foram depositados nos reservatórios de resíduos sólidos do próprio laboratório de química da instituição.

Já os solventes, ou seja, acetona, etanol, água, álcool isopropílico e hexano, foram recuperados e guardados nas dependências deste mesmo laboratório para outros fins didáticos.

O hidróxido de potássio e o ácido sulfúrico, que foram utilizados para os testes de pH da antocianina, foram neutralizados e descartados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa teve como principal objetivo compreender quais são os métodos extratores mais eficientes e quais os solventes são mais adequados para serem utilizados na obtenção dos corantes naturais, a antocianina e a clorofila, encontrados no repolho roxo e no espinafre, respectivamente. Para identificar a melhor extração foram analisadas algumas propriedades dos corantes, como polaridade, intensidade da cor ao olho nu e o pH.

O objetivo geral era: verificar e determinar o método mais eficiente, dentre a maceração e o Soxhlet, e o solvente mais eficiente, dentre o etanol com água e o hexano, para a extração dos corantes naturais antocianina e clorofila encontrados em verduras, e para isso foram realizadas análises laboratoriais.

Com as análises realizadas, concluiu-se que, para o corante proveniente do espinafre (clorofila), o melhor método de extração foi via Soxhlet, utilizando a combinação dos solventes etanol e água. Para a comprovação desse resultado realizou-se a padronização do volume de cada amostra e assim foi possível analisar qual método obteve uma quantidade maior de clorofila.

Já para para o corante proveniente do repolho roxo (antocianina), o melhor solvente também foi a combinação de etanol e água. Porém, apesar de ter sido realizado o teste de pH e análise da cor das amostras para comprovação do melhor método, os resultados obtidos foram

muito próximos (intensidade das cores muito próximas), não podendo assim, ser definido qual fora o melhor método de extração para esse corante.

A primeira hipótese descrita afirmava que, tendo em vista a polaridade das antocianinas, seu corante será melhor extraído utilizando o solvente etanol com água, e com base nas análises obtidas, esta hipótese confirmou-se verdadeira. Isso se deve ao fato de a antocianina possuir polaridade próxima a do etanol com água, ou seja, tanto o corante quanto o solvente possuem estrutura química mais polares do que apolares.

A segunda hipótese, que descrevia que o hexano extrairia melhor a clorofila do que o etanol com água em virtude da polaridade das clorofilas, fora refutada, pois, como já fora abordado, o hexano não extraiu nenhum dos dois corantes, em nenhum dos dois métodos de extração.

A terceira e última hipótese afirmava que a clorofila seria o corante que teria os resultados das extrações melhores qualitativamente. Não pôde ser respondida pois não conseguiu-se realizar as análises qualitativas, que seriam a cromatografia, por não ter separado e o UV-Vis, por não possuir curva padrão.

Os diferentes métodos de extração das antocianinas e clorofilas mostra eficiência uma vez que estes conferem a cor aos vegetais. As análises mostraram-se importantes para a identificação do melhor solvente e método extrator, porém, destaca-se que novas análises quantitativas podem ser feitas uma vez que o tempo hábil dos integrantes, assim como os equipamentos necessários não encontram-se disponíveis no laboratório de química do Instituto Federal de Santa Catarina Campus Jaraguá do Sul-Centro.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Maria Eduarda Machado de. **Corantes naturais para têxteis – da Antiguidade aos tempos modernos**. Lisboa, Portugal, 2006. Disponível em: <http://moodle-arquivo.ciencias.ulisboa.pt/1415/pluginfile.php/83484/mod_resource/content/1/4_corantes.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

ASSIS, Odilio B.G. **A asa da borboleta e a nanotecnologia: cor estrutural**. *Rev. Bras. Ensino Fis. [online]*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 1-9, jun. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-11172013000200001> Acesso em: 26 jun. 2016.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio**. *Química nova na escola*, n. 7, p. 21-25, Mai. 1998. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>> Acesso em: 30 de Jun. de 2016.

CASTAÑEDA, Leticia M. F. **Antocianinas: O que são? Onde estão? Como atuam?** UFRGS, 2009.

CESAR, Paulo. **Separação de misturas: Portal de estudos em química**. 2009. [S.l.]. Não paginado. Disponível em: <http://www.profpc.com.br/Separa%C3%A7%C3%A3o_misturas.htm> Acesso em: 02 de jul. de 2016.

CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA. **Corantes e pigmentos**. 2011. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos> Acesso em 30 set. 2016.

CUNHA, Silvio. **Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por filtração de raios x**. Instituto de química da UFBA, 2008.

DIAS, Diogo Lopes. **"Conceito de pH"**; *Brasil Escola*. S/d. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/quimica/conceito-ph.htm>>. Acesso em 19 de fev. de 2017.

FERREIRA, Bárbara, et al. **Bioquímica do Álcool**. 2010. Disponível em: <<http://biobiodoalcool.blogspot.com.br/2010/11/composicao-e-estrutura-sao-denominados.html>> Acesso em: 27 de nov. de 2016.

FILHO, Luiz da Silva Goes. **Estudo do efeito de solventes nas propriedades espectroscópicas do antibiótico norfloxacin: absorção, fluorescência estacionária e resolvida no tempo**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC - RIO, 2011. Disponível em: <http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/17692/17692_5.PDF> Acesso em 04 de nov. 2016.

FOGAÇA, Jennifer R. V. **"Conceito de pH e pOH"**; *Mundo Educação*. S/d. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/conceito-ph-poh.htm>> Acesso em 19 de fev. de 2017.

JU, Zhi Y.; HOWARD, Luke R. **Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics from Dried Red Grape Skin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 18, p. 5207-5213, 2003.

LOPES, Renato Matos et al. **Flavonóides.** *Biotecnologia ciência & desenvolvimento*, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOPES, Toni Jefferson, et al. **Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade.** S/d.

MAIA, Thiago. **Perturbando o equilíbrio.** UNEB. 2009. Disponível em: <<http://ec2-107-21-65-169.compute-1.amazonaws.com/content/ABAAABIaKAK/perturbando-equilibrio>> Acesso em 27 de Nov. 2016.

MARTINEZ, Marina. **Clorofila.** InfoEscola. S/d. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/plantas/clorofila/>> Acesso em: 22 de nov. de 2016.

MARTINS, Cláudia Rocha; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. **Solubilidade das substâncias orgânicas.** *Quím. Nova*, São Paulo, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000800026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 de Out. 2016.

MIRANDA, Martha Z. de. **Nota de esclarecimento sobre suco obtido a partir de folhas jovens de trigo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 20 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 15). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do15.htm> Acesso em: 30 set. 2016.

MIYAKE, Thaila. **Métodos de extração e fracionamento de extratos vegetais.** S/d. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/tecnicasextrativas.pdf>> Acesso em: 28 de mai. 2016.

MOREIRA, Germando Eder Gadelha. **Obtenção e caracterização de extrato microencapsulado de resíduo agroindustrial de acerola.** Dissertação de mestrado. UFRN. 2007.

PASTORE, Gláucia M. *et al.* **Carotenóides: propriedade, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma.** UNICAMP. Campinas, SP, 2007.

PAVIA, Donald L. *et al.* **Química orgânica experimental.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

PAZZA, Rubens. **A clorofila e o arquiteto inteligente.** 2004. Disponível em: <<http://www.darwin.bio.br/?p=108>> Acesso em: 26 jun. 2016.

TERCI, Daniela Brotto Lopes; ROSSI, Adriana Vitorino. **Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?.** *Quím. Nova* [online]. 2002, vol.25, n.4, pp.684-688. ISSN 0100-4042.

Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400026>

Acesso em: 22 de nov. de 2016.

SOUZA, Rosilane M. de. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde**. UEZO. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

STREIT, Nivia M. *et al.* **As clorofilas**. *Ciência Rural*, Santa Maria , v. 35, n. 3, p. 748-755, jun. 2005. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000300043>

Acesso em: 12 jun. 2016.

VELOSO, Luana de A. **Corantes e pigmentos**. 2012. Disponível em:

<<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwOA==>> Acesso em: 23 abr. 2016.

VOLP, Ana Carolina P. *et al.* **Pigmentos naturais bioativos**. UNESP. Araraquara, SP, 2009.