

LEANDRO RODRIGUES DE LEMOS

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS: UMA NOVA ABORDAGEM PARA A
DETERMINAÇÃO DE *p*-AMINOFENOL**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L557s
2010

Lemos, Leandro Rodrigues de, 1984-

Sistemas aquosos bifásicos: uma nova abordagem para a
determinação de *p*-aminofenol / Leandro Rodrigues de
Lemos. – Viçosa, MG, 2010.
xvii, 59f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *p*-aminofenol. 2. Sistemas aquosos bifásicos. 3. Urina.
4. Paracetamol. 5. Água. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 547.632

LEANDRO RODRIGUES DE LEMOS

**SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS: UMA NOVA ABORDAGEM PARA A
DETERMINAÇÃO DE *p*-AMINOFENOL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Prof^a. Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Coorientadora)

Prof^a. Ann Honor Mounteer

Prof. André Fernando de Oliveira

Prof^a Maria do Carmo Hespanhol da Silva
(Orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Luciano e Nayane.*

A ação nem sempre traz felicidade, mas não há felicidade sem ação.
(Benjamin Disraeli)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e coragem para sempre continuar em frente.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Carlinhos e Silvina, pelo incentivo, amor, carinho, educação e por estarem sempre ao meu lado em todas as situações. Pai e Mãe obrigado por tudo!

Ao meu irmão Luciano, pelo incentivo, apoio, amizade. Lu, sem você eu nunca conseguiria chegar aqui. Valeu!

À Nayane, pelo amor, paciência, dedicação que foram extremamente importantes pra essa conquista. Obrigado Amor!

À toda minha família e agregados (vô, vó, tias, tios, primos, Cláudia, Dona Eni), pela grande torcida e apoio.

À Carminha, mais do que uma orientadora uma amiga, pelo apoio, orientação e por confiar no meu potencial. Seu exemplo e seus conselhos foram fundamentais, e estarão sempre comigo na minha vida profissional e pessoal. Muito obrigado mesmo!

Ao Luis, um mestre, no sentido mais amplo dessa palavra; talvez, para ser mais justo teria que usar o artigo definido, O MESTRE. Outro exemplo que carregarei sempre comigo. Obrigado Luis!

Aos professores André, Jane e Ann, por aceitarem prontamente participar desta defesa.

Ao grande amigo Guilherme, que eu agradeço não só pela ajuda importantíssima nesse trabalho, mas também pelos muitos anos de convivência. Valeu Feião, continue assim que você vai alcançar seus objetivos. Oh Loyola!!!!

À Pamela que me ajudou bastante na condução deste trabalho. Valeu paminharocha!

À todos os companheiros do grupo QUIVECOM, em especial a Vivianne pela amizade, almoços e churrascos em Cajuri.

Aos grandes amigos Tonimar e Helisson, pelos bons momentos.

Agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa conquista!

BIOGRAFIA

Leandro Rodrigues de Lemos, filho de Carlos Otávio de Lemos e Silvina Rodrigues de Lemos, nasceu em 03 de dezembro de 1984, na cidade de Manhumirim, Minas Gerais.

Em março de 2004 ingressou no curso de Química da Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se com o título de Licenciatura e Bacharelado em julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o curso no Programa de Pós-graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2010.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii

Capítulo 1: Revisão de metodologias analíticas para a determinação de *p*-aminofenol.....

1.1 Introdução	1
1.2. Metodologias analíticas para a determinação de <i>p</i> -aminofenol.....	4
1.3. Referências Bibliográficas.....	11

Capítulo 2: Sistemas Aquosos Bifásicos.....

2.1 Comportamento de partição de um soluto em um SAB.....	18
2.2 Referências bibliográficas.....	24

Capítulo 3: Aqueous two-phase system: a new approach for the determination de *p*-aminofenol in water and biochemical samples.....

Abstract.....	29
1. Introduction.....	31
2. Experimental.....	34
2.1. Apparatus.....	34
2.2. Chemicals.....	34
2.3. ATPS composition, solutions and standards.....	34
2.4. Procedure.....	36
2.5. Partitioning experiments.....	37
2.6. Water samples.....	37
2.7. Determination of <i>p</i> -aminofenol in paracetamol formulations.....	38
2.8. Analysis of urine samples.....	38

3. Results and Discussion.....	39
3.1. Chemical and spectral characteristics.....	39
3.2. Phase diagrams.....	41
3.3. Influence of tie-line length (TLL) and electrolyte on the partitioning behavior.....	41
3.4. Study of the sensitivity of the method.....	46
3.5. Analytical features of the developed procedure.....	48
3.6. Application to real samples.....	49
4. Conclusions.....	51
5. Acknowledgments.....	51
6. References.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% (m/m) – Porcentagem massa/massa

4-AAP – 4-aminoantipirina

a_{FS} e a_{FI} –Atividade do soluto na fase superior e na fase inferior, respectivamente

ε – Absortividade molar

ε_{ij} – Energia potencial do par i–j

ρ –Número de sítios por unidade de volume

ϕ_i^{FS} e ϕ_i^{FI} – Fração volumétrica do componente i na fase superior e inferior, respectivamente

w_{is} – Energia de formação do par entre o soluto e o componente i

w_{ij} – Energia de formação do par entre os componentes i e j .

A_T e A_B – Absorbância do soluto na fase superior e na fase inferior

C_{pol}^{FS} e C_{pol}^{FI} –Concentração de polímero em fase superior e inferior, respectivamente

C_{sal}^{FS} e C_{sal}^{FI} –Concentração de sal em fase superior e inferior, respectivamente

C_{FS} e C_{FI} –Concentração do soluto na fase superior e na fase inferior, respectivamente

CE – capillary electrophoresis

CLA ou TLL –Comprimento de linha de amarração ou tie-line lenght, respectivamente

CLAE-DE – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de elétrons

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV – Coeficiente de variação

DNA – Ácido desoxirribonúcleico

EAM UV/Vis – Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta/vível

EC-DE – Eletroforese capilar com detector de elétrons

EC-UV – Eletroforese capilar com detector ultravioleta

ELLT – Extração líquido-líquido tradicional

FI – Fase inferior

FIA-EAM UV/Vis – Análise de injeção em fluxo com detector de Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta/vível

FS – Fase superior

GC – Gas chromatography

HL – Cloreto de hidroxilamina

HPBI – 2-(2-Hidroxifenil)-1H-benzimidazol

K – Coeficiente de partição

LA – Linha de amarração

LB – Linha binodal

LC – Liquid chromatography

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

M – Massa molar

M_s – Massa molar do soluto,

n_{FS} e n_{FI} – Número total de moléculas na fase superior e inferior, respectivamente

NMR – Nuclear magnetic resonance

NPS – Nitroprussiato de sódio

PAP – p-aminofenol

PCP – p-clorofenol

PEO1500 – Poli(óxido de etileno) 1500 g mol⁻¹

R – Coeficiente de correlação linear

R –Constante geral do gases,

SAB ou ATPS – sistemas aquosos bifásicos

T –Temperatura,

Triton X-100 – Polioxietileno octil fenil éter ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ com $(n = 9-10)$)

V_{FS} e V_{FI} –Volume da fase superior e inferior, respectivamente

w_p – Porcentagem massa/massa de polímero

w_s – Porcentagem massa/massa de sal

WWTP – Estação de tratamento de água residuária

z – Número de sítios vizinhos

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 Sistemas aquosos bifásicos

- Figura 1.** Composições do SAB composto por Poli(óxido de etileno) 1500 g mol⁻¹ (PEO1500) + sulfato de lítio + água á 25 ° C [27]..... 17
- Figura 2.** Representação gráfica de um diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares para um SAB formado por polímero + sal + água..... 17

Capítulo 3 Aqueous two-phase system: a new approach for the determination of p-aminophenol in water and biochemical samples

- Fig. 1.** Absorption spectra of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion formed by the reaction system between NPS, HL and (—) PAP, and (···) a blank assay spectrum in the PEO1500/Li₂SO₄ aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) of 41.71 % (w/w)..... 40
- Fig. 2.** Partition coefficient ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$) of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion water ATPS as a function of increasing tie-line length (TLL), in ATPS

composed of PEO 1500 + salt + water. (▲) $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$; (◇) Na_2SO_4 ; (■) Li_2SO_4 and (○) Li_2SO_4 in the presence of PCP..... 42

Fig. 3. Effect of tie-line length (TLL) and electrolytes on the PAP determination in an aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEO1500, salt and water: (■) Li_2SO_4 , (○) $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$ and (▲) Na_2SO_4 47

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 Revisão de metodologias analíticas para a determinação de *p*-aminofenol

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas do <i>p</i> -aminofenol [Adaptada, ref. 10].	3
Tabela 2.	Melhores condições experimentais obtidas por Ettinger e <i>et al.</i> [adapt.19].....	5
Tabela 3.	Figuras de mérito e outros parâmetros para o método da 4-AAP [17].....	6
Tabela 4.	Parâmetros analíticos do método desenvolvido por Kang et al. [20].	7
Tabela 5.	Limites de detecção e quantificação de diversas técnicas usadas na determinação de PAP	10

Capítulo 3 Aqueous two-phase system: a new approach for the determination of *p*-aminophenol in water and biochemical samples

Table 1.	Percent composition (w/w) for PEO1500 (w_p), salt (w_s) and water aqueous two-phase systems (ATPS) at 25.0 °C.....	36
Table 2.	Comparison of the analytical figures of merit of the proposed method (ATPS) with the standard method (4-AAP) [33].....	49
Table 3.	Recoveries (%) of PAP in several water samples ($n = 3$).....	50
Table 4.	Determination of PAP in pharmaceutical and human urine samples ($n = 3$).....	50

RESUMO

LEMOS, Leandro Rodrigues de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Sistemas aquosos bifásicos: Uma nova abordagem para a determinação de *p*-aminofenol**. Orientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Jane Sélia dos Reis Coimbra

Este trabalho apresenta inicialmente uma breve revisão sobre sistemas aquosos bifásicos (SAB) e metodologias analíticas para determinação de *p*-aminofenol (PAP) com ênfase nas técnicas espectrofotométricas. Um novo método foi desenvolvido para a determinação de PAP em água, formulações de paracetamol e urina humana. Este procedimento explora um SAB como técnica de extração líquido-líquido e a reação de PAP, nitroprussiato de sódio (NPS) e hidrocloreto de hidroxilamina (HL) em meio alcalino ($\text{pH} = 12$), produzindo um ânion complexo $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ que espontaneamente se transfere para a fase superior do sistema ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}} = 97.7$). O SAB é formado majoritariamente por água e não utiliza solvente orgânico. Os outros componentes do SAB são polímero, poli(óxido de etileno), e sais (i.e., Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$). O método apresentou uma faixa linear de 5,00 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($R \geq 0,9990$; $n = 8$) com coeficientes de variação de 2,11 % ($n = 5$), um limite de detecção (LOD) de 2,40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e um limite de quantificação (LOQ) de 8,00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. O método SAB exibiu recuperações entre 96,4 e 103 % para a determinação de PAP em amostras de água e efluentes, em excelente acordo com os resultados do método padrão da 4-aminoantipirina (4-AAP) para as mesmas amostras. O método proposto também foi usado para a determinação de PAP em formulações farmacêuticas de paracetamol e amostras de urina humana com recuperações entre 94,9 e 101 %.

ABSTRACT

LEMOS, Leandro Rodrigues de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2010. **Aqueous two-phase system: a new approach for the determination of *p*-aminophenol in water and biochemical samples.** Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Co-advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Jane Sélia dos Reis Coimbra

This work initially presents a brief review of aqueous two-phase systems (ATPS), and analytical methodologies for PAP determination with emphasis in spectrophotometric techniques. A new method has been developed for the spectrophotometric determination of *p*-aminophenol (PAP) in water, formulations of paracetamol and human urine. The procedure exploits an aqueous two-phase system (ATPS) liquid-liquid extraction technique and the reaction of PAP, sodium nitroprusside (NPS) and hydroxylamine hydrochloride (HL) in an alkaline medium (pH 12.0), producing the complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ that spontaneously concentrates in the top phase of the system ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}} = 97.7$). The ATPS is formed mostly by water and does not require organic solvent. The other components of the ATPS were polymer, polyethylene oxide, and salts (i.e., Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$). The linear range was 5.00 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($R \geq 0.9990$; $n = 8$) with coefficients of variation of 2.11 % ($n = 5$). The method exhibited a limit of detection (LOD) of 2.40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and a limit of quantification (LOQ) of 8.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The ATPS method showed recoveries between 96.4 – 103 % for the determination of PAP in natural water and wastewater samples, in excellent agreement with the results of the standard 4-aminoantipyrine (4-AAP) method for the same samples. The proposed method was also used for the determination of PAP in paracetamol pharmaceutical formulations and human urine samples with recovery rates between 94.9 – 101 %.

Capítulo 1

Revisão de metodologias analíticas para a determinação de *p*-aminofenol

1.1 Introdução

Nos últimos anos a preocupação com a poluição ambiental e seus efeitos no clima, na disponibilidade de recursos hídricos e na fertilidade dos solos entre outros, tem aumentado muito; haja vista que a população humana tem sido afetada drasticamente por essas mudanças no seu habitat, como por exemplo, a produção de alimentos que exige cada vez mais insumos, o tratamento de água para consumo humano que requer processos mais elaborados, etc. A busca por alternativas para a diminuição da poluição do planeta tem sido foco de diversos encontros e acordos internacionais, como o Protocolo de Quioto (Quioto – Japão, outubro de 1988), a ECO-92 (Rio de Janeiro – Brasil, junho de 1992), e mais recentemente a realização do COP - 15 (Copenhague – Dinamarca, dezembro de 2009). Os corpos de água são os principais receptores dessa poluição. Todos os dias milhões de metros cúbicos de efluentes domésticos e efluentes industriais são lançados nos rios, lagos e mares, além dos poluentes do solo e do ar que são carregados pela chuva. A presença de diversos poluentes orgânicos, entre eles os compostos fenólicos, metais e etc, acaba inviabilizando a utilização desse recurso na irrigação e no abastecimento industrial e da poluição humana.

Um dos principais grupos de poluentes, que chegam ao meio ambiente oriundo de diversas atividades industriais e agrícolas são os fenóis e seus derivados. Eles são considerados poluentes prioritários, pois, mesmo em baixas concentrações são

extremamente tóxicos [1]. As principais fontes desses compostos são as indústrias de corantes, pesticidas, papel e celulose, petroquímica e siderúrgica [2-6].

Os limites de fenóis totais permitidos em corpos de água é regulamentado pela resolução do CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005 [7]. Para as águas doce e salobra destinadas ao consumo humano, irrigação de hortaliças e de frutas que sejam consumidas cruas e sem retirada da película, proteção de comunidades aquáticas e para o lazer com contato primário (Águas Doce Classe 1 e Salobra Classe 1) o limite permitido de fenóis totais é de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Em águas destinadas ao consumo humano após tratamento avançado, a pesca amadora, a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, e a recreação de contato secundário (Águas Doce Classe 3) é permitido concentrações de até $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Águas salinas usadas em recreação de contato primário, a preservação de comunidades aquáticas, em atividades de pesca e na aquicultura (Águas Salinas Classe 1) a concentração máxima permitida é de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenóis totais. Essa resolução ainda dispõe sobre o lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora em corpos de água, sendo que a concentração de fenóis totais é limitada a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Fenóis totais é definido pela regulamentação do CONAMA [7] como substâncias que reagem com a 4-aminoantipirina (4-AAP). Essas substâncias são o fenol, *o*-cresol, *p*-clorofenol, *o*-nitrofenol, *p*-aminofenol (PAP) entre muitas outras [8]. Entre os derivados do fenol, o PAP é um dos compostos mais usados em processos industriais e farmacêuticos. Desde 1994 a produção mundial de PAP tem crescido em média 5% ao ano [9], devido a isso tem-se aumentado o volume de efluentes gerados por essas indústrias.

O PAP é aplicado na indústria de tintas e corantes, como revelador fotográfico, como anticorrosivo em lubrificantes entre outros [11]. e é responsável pela grande parte da constituição de compostos fenólicos nos efluentes dessas indústrias.

Além disso, o PAP é um composto fundamental para a produção industrial do paracetamol, que tem efeito analgésico e antipirético, sendo uma das formulações farmacêuticas mais consumidas no mundo, e ainda, é o principal produto de degradação hidrolítica desse fármaco [12].

O PAP é um composto formado por um anel benzênico ligado a uma hidroxila, que forma o fenol, e a um radical amina na posição para. As principais propriedades físico-químicas deste composto estão exibidas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do *p*-aminofenol [Adaptada, ref. 10]

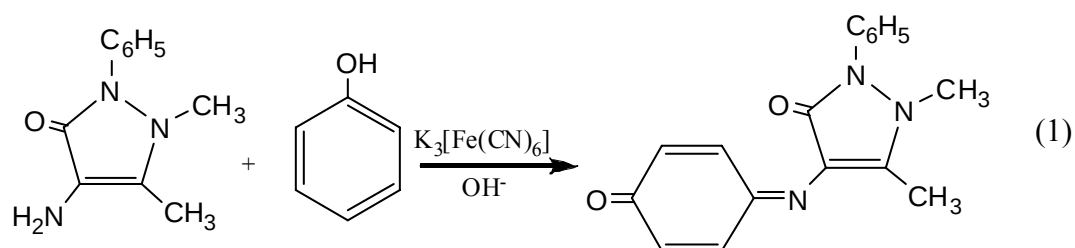
Propriedade	Valor
massa molar	109,13 g mol ⁻¹
temperatura de fusão	189,9 ° C
temperatura de ebulição	284,0 ° C
constantes de dissociação	pK ₁ = 5,48 e pK ₂ = 10,46
pressão de vapor	5,31 Pa
solubilidade em água	6,5 g L ⁻¹
coeficiente de partição octanol/água	1,096

Ele é tóxico e irritável aos olhos, pele e sistema respiratório, além de aumentar a temperatura do corpo humano e é caracterizado por ter uma meia vida longa (o tempo que requer para a metade do PAP ser removido do organismo através de processos

biofísicos e bioquímicos) [12-13]. As farmacopéias européia, britânica e americana limitam em 50 µg a dosagem máxima de PAP em comprimidos de paracetamol [14-16]. O desenvolvimento de técnicas analíticas para a determinação deste analito é fundamental para a aplicação das legislações vigentes que limitam o teor máximo de PAP em águas, águas residuárias e formulações farmacêuticas.

1.2. Metodologias analíticas para a determinação de PAP

Técnicas espectrofotométricas para a determinação de fenóis totais em águas têm sido bastante relatadas nos últimos 70 anos. Um dos primeiros métodos reportados, e ainda hoje um dos mais usados é o da 4AAP, que é o método do “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” [17] para a determinação de compostos fenólicos em águas e águas residuárias. Em 1943 Edgar Emerson [18] descreveu a reação entre o fenol e a 4AAP em meio alcalino e oxidante, conforme a reação geral para compostos fenólicos representado na Equação 1, formando um composto com coloração vermelha intensa ($\lambda = 500$ nm). Esta reação foi proposta como um método qualitativo para análise de compostos fenólicos em água. Emerson estudou a absorvidade molar para vários derivados do fenol, inclusive para o PAP.



A Tabela 2 mostra as melhores condições experimentais para determinação de fenol obtidas por Ettinger et al. em 1951 [19]. Este método apresentou um limite de detecção muito alto (100 mg L^{-1}), por isso foi proposta uma etapa de extração líquido-líquido, a fim de promover a pré-concentração do composto formado para uma pequena fase formada por clorofórmio, melhorando assim a sensibilidade da reação.

Tabela 2. Melhores condições experimentais obtidas para a determinação de compostos fenólicos por Ettinger e *et al.* [adap.19]

Parâmetro	Valor
pH	$10,0 \pm 0,2$
faixa linear	$(0,04 - 1,0) \text{ mg kg}^{-1}$
[4-AAP]	60 mg kg^{-1}
$[\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]]$	400 mg kg^{-1}
caminho ótico	5 cm
volume de amostra	500 mL
volume de clorofórmio	30 mL
$\lambda_{\text{máx}}$	500 nm

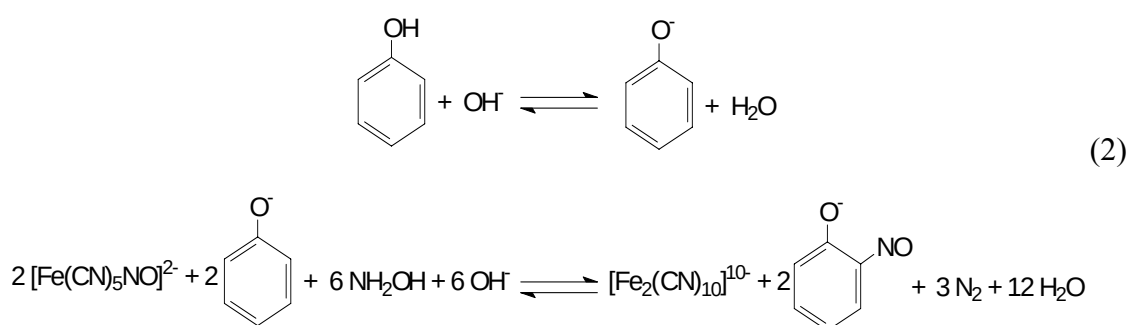
O método apresentado no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” para a determinação de fenóis totais são semelhantes às propostas por Ettinger *et al.* A Tabela 3 mostra as figuras de mérito e alguns parâmetros obtidos para este método.

Tabela 3. Figuras de mérito e outros parâmetros para o método da 4-AAP [17]

Parâmetro	Método 4-AAP (sem extração)
faixa linear	(1000–5000) $\mu\text{g L}^{-1}$
coeficiente de correlação linear (R)	0,9998
caminho óptico	1,00 cm
limite de detecção (LOD)	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
precisão	0,350 %

Como pode ser observado na Tabela 3, o método padrão sem uma etapa de extração (pré-concentração) exibe um LOD bastante alto, e portanto não atende aos limites da legislações ambientais e farmacêuticas. Utilizando uma etapa de pré-concentração e um caminho óptico de 5 cm, esse método atinge um LOD de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o fenol [17]. Como a reação é mais sensível para o fenol do que para o PAP, para este o LOD deve ser um pouco mais alto. A desvantagem desta etapa é o alto consumo de amostra (500 mL por análise) e uso de clorofórmio, que é extremamente tóxico ao homem e ao ambiente [20].

Mais recentemente, Kang *et al.* [21] desenvolveram um método baseado na reação descrita por Nagaraj *et al.* [22] entre o fenol e o nitroprussiato de sódio em meio básico com cloreto de hidroxilamina, formando o complexo cromóforo, decacianodiferrato ($[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$), representado na Equação 2.



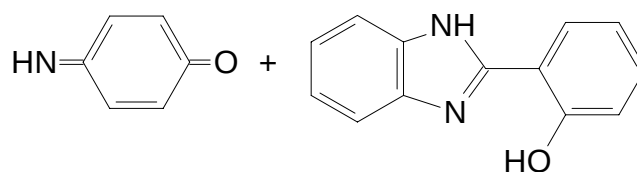
O meio básico promove a desprotonação da hidroxila deixando o anel mais reativo. A maior densidade eletrônica do grupo fenolato favorece a ocorrência de uma reação eletrofílica no anel benzênico. O grupo nitroso do nitroprussiato de sódio (NPS) ataca o anel, formando o complexo decacianodiferrato que exibe uma coloração azul-esverdeada, com o comprimento de onda de máxima absorção em 700 nm. Os parâmetros analíticos obtidos pelos autores estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros analíticos do método desenvolvido por Kang *et al.* [20]

Parâmetro	Valores
faixa linear	(50 – 5000) $\mu\text{g L}^{-1}$
coeficiente de correlação linear (R)	0,9996
caminho óptico	2,00 cm
limite de detecção (LOD)	$\approx 50 \mu\text{g L}^{-1}$
absortividade molar (ϵ)	$1,38 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
precisão	2,6 %

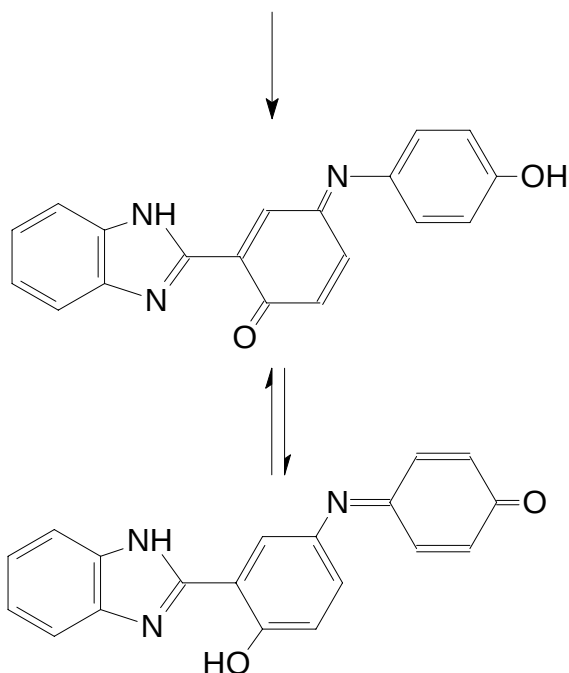
O método desenvolvido sofre a interferência de íons como Mg(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Al(III), NH_4^+ , PO_4^{3-} , HCO_3^- , HSO_3^- e S^{2-} acima de concentrações iguais a 100 mg L^{-1} desses concomitantes, e além disso o método possui limite de detecção inadequado para a quantificação de fenol em águas.

Filik e Tavman [23] desenvolveram um método baseado na reação entre o PAP e o 2-(2-Hidroxifenil)-1H-benzimidazol (HPBI) em meio oxidante produzindo um composto cromóforo azul, chamado indofenol. O PAP é inicialmente desprotonado e oxidado com o periodato de potássio, e na sequência ocorre um acoplamento entre este composto formado e o HPBI por uma reação de substituição eletrofílica, de acordo com a Equação 3.



HBPI

(3)



A novidade desse método é uma etapa de pré-concentração utilizando a técnica de ponto nuvem. Essa técnica baseia-se na separação em duas fases de uma solução de surfatante, após um aumento de temperatura. Inicialmente prepara-se uma solução do surfatante em uma concentração adequada e ao aquecê-la a uma determinada temperatura o sistema anteriormente contendo uma fase isotrópica, separa-se em duas fases. A fase superior é rica em micelas do surfatante e a fase inferior é rica em água com monômeros do surfatante. Compostos mais apolares particionam preferencialmente

para o interior das micelas na fase superior. As grandes vantagens dessa técnica são o baixo custo, obtém-se altos índices de pré-concentração e o fato de ser ambientalmente segura [24]. O surfatante utilizado foi o polioxietileno octil fenil éter ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$) com ($n = 9-10$), também conhecido como Triton X-100 a uma concentração de 0,4 % (m/m) em uma temperatura de incubação (para a separação de fase) de 80 ° C por 3 min. O método exibe um limite de detecção de $55 \mu g L^{-1}$ que não é adequado para análises de PAP em corpos de água e em formulações farmacêuticas [23].

Várias outras técnicas analíticas são aplicadas também a determinação de PAP em paracetamol e outras matrizes. A Tabela 5 mostra várias destas técnicas e seus limites de detecção e quantificação. Observando os dados mostrados na Tabela 5 conclui-se que as técnicas cromatográficas são as mais sensíveis, apresentando limites de detecção de até $1 \mu g L^{-1}$, porém estas são de custo elevado. As técnicas baratas e simples, em muitos casos, não atendem as necessidades das legislações, mostrando assim a importância de desenvolver métodos sensíveis e em acordo com os princípios da química verde [25].

Tabela 5. Limites de detecção e quantificação de diversas técnicas usadas na determinação de PAP

Técnica	Matrizes	LOD($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
EAM UV/Vis (4-AAP)	Águas	100	-	17
EAM UV/Vis (NPS)	Águas	≈ 50	-	21
EAM UV/Vis (HPBI)	Águas	55	-	23
Espectrometria UV	Paracetamol	46	-	26
Espectrometria UV	Paracetamol	41	-	26
CLAE-UV	Paracetamol	100	300	27
CLAE-UV	Paracetamol	25	-	26
CLAE-UV	Paracetamol	50	145	28
CLAE-DE	Paracetamol	1,0	3,5	29
CLAE-DE	Paracetamol	4,0	-	29
CLAE-DE	Paracetamol e Urina	50	-	30
EC-UV	Paracetamol	11	37	31
EC-DE	Paracetamol	120	-	32
EC-DE	Paracetamol	540	-	33
FIA-EAM UV/Vis	Paracetamol	-	10	34

EAM UV/Vis = Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta/vísivel

UV = Ultravioleta

CLAE-UV = Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta

CLAE-DE = Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de elétrons

EC-UV = Eletroforese capilar com detector ultravioleta

EC-DE = Eletroforese capilar com detector de elétrons

FIA-EAM UV/Vis = Análise de injeção em fluxo com detector de Espectrometria de absorção molecular no ultravioleta/vísivel

1.3. Referências Bibliográficas

- [1]. Gianfreda, L.; Sannino, F.; Rao, M. A; Bollag, J.-M. Water Research 37 (2003) 3205
- [2] Sarnaik, S.; Kanekar, P. J. Appl. Microbiol. 79 (1995) 459.
- [3] Simões, N. G.; Cardoso, V. V.; Ferreira, E.; Benoliel, M. J.; Almeida, C. M. M. Chemosphere 68 (2007) 501.
- [4] Barreto-Rodrigues, M.; Aguiar, C. M.; Cunha, M. A. A. J. Hazard. Mater. 164 (2009) 1556.
- [5] Steevensz, A.; Al-Ansari, M. M.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; Biswas, N. J. Chem. Technol. Biotechnol. 84 (2009) 761.
- [6] Ahmaruzzaman, M.; Sharma, D. K. J. Colloid Interface Sci. 287 (2005) 14
- [7] Conselho Nacional do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/conama>, acessada em Dezembro de 2009
- [8] Shaw, J. Anal. Chem. 23 (1951) 1788
- [9] Xu, H.; Duan, C.; Zhang, Z.; Chen, J.; Lai, C.; Lian, M.; Liu, L.; Cui, H.; Water Research 39 (2005) 396

- [10] Hazardous Substances Data Bank (HSDB) – United States National Library of Medicine, <http://toxnet.nlm.nih.gov>, acessada em Dezembro de 2009
- [11] Harmon, R. C.; Kiningham, K. K.; Valentovic, M. A.; Toxicol. Appl. Pharm. 2006 (213) 179
- [12] Khan, S. A.; Hamayun, M.; Ahmed, S. Enzym. Microb. Tech. 38 (2006) 10
- [13] Harmon, R. C.; Kiningham, K. K.; Valentovic, M. A. Toxicol. Appl. Pharm. 213 (2006) 179
- [14] European Pharmacopoeia 4th edition, 2002 ISSN 1013-5294
- [15] British Pharmacopoeia 2009 Volume I & II, Market Towers London 2009
- [16] US Pharmacopeia 2007, ISSN 1068 5456
- [17] Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed., American Public Health Association, Washington DC, 1999
- [18] Emerson, E. J. Org. Chem. 08 (1943) 417
- [19] Ettinger, M.; Ruchhoft, C.; Lishka, R. Anal. Chem. 23 (1951) 1783

- [20] Constan, A.; Sprankle, C.; Peters, J.; Kedderis, G.; Everitt, J.; Wong, B.; Gonzalez, F.; Butterworth, B. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 160 (1999) 120
- [21] Kang, C.; Wang, Y.; Li, R.; Du, Y.; Li, J.; Zhang, B.; Zhou, L.; Du, Y.; *Microchem. J.* 64 (2000) 161
- [22] Nagaraj, P.; Bhandari, J. M.; Achar, B .N. *Indian J. Chem.* 32A (1993) 641
- [23] Filik, H.; Tavman, A. J. *Anal. Chem.* 62 (2007) 530
- [24] Bezerra, M. D.; Arruda, M. A. Z.; Ferreira, S. L. C. *Appl. Spectroscopy. Rev.* 40 (2005) 269
- [25] Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. *Quim. Nova* 26 (2003) 123
- [26] Hewala, I. I. *Anal. Lett.* 27 (1994) 561
- [27] Monser, L.; Darghouth, F.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 851
- [28] Rao, R. N.; Narasaraju, A.; *Anal. Sci.* 22 (2006) 287
- [29] Wyszeccka-Kaszuba, E.; Warowna-Grzeskiewics, M.; Fijalek, Z. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1081

- [30] Liu, Z.; Li, J.; Dong, S.; Wang, E.; Anal. Chem. 68 (1996) 2432
- [31] Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Tomas, V.; Galera, R.; J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 87
- [32] Chen, G.; Ye, J.; Bao, H.; Yang, P. J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 843
- [33] He, F. Y.; Liu, A. L.; Xia, X. H. Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 1062
- [34] Bloomfield, M. S. Talanta 580 (2002) 1301

Capítulo 2

Sistemas aquosos bifásicos

O primeiro pesquisador a relatar a formação de um sistema aquoso bifásico foi Beijerinck [1,2] no final do século 19. Ele observou que ao misturar soluções aquosas de amido solúvel com gelatina, ou ágar com gelatina em concentrações adequadas e em uma determinada temperatura, formava-se uma mistura que apresentava turbidez; que depois de algum tempo em repouso separava-se espontaneamente em duas fases límpidas. Ele ainda observou que a água era o principal componente das duas fases do sistema, com a fase superior rica em gelatina e fase inferior rica em ágar (ou amido).

Ostwald e Herte [3,4] em estudos posteriores observaram que amidos provenientes de diferentes origens (arroz, milho, trigo etc.), isto é, com diferentes proporções de amilose e amilopectina produziam diferentes diagramas de fase. Este comportamento mostrou a grande influência que variações mínimas nas interações intermoleculares tinham sobre as composições em equilíbrio.

Já no final da década de 40, Dobry e Boyer-Kawenoki [5,6] a fim de verificar o comportamento de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, estudaram a miscibilidade de diferentes pares de polímeros dissolvidos em solventes orgânicos ou em água. Eles observaram a generalidade da incompatibilidade entre polímeros, já que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas quatro não geravam um sistema bifásico.

As potencialidades desses sistemas ficaram evidentes apenas na década de 50 com os trabalhos de Albertsson [7], onde a aplicação destes sistemas para partição/purificação de materiais biológicos, como células e proteínas foi conhecida

pela comunidade científica. Como as fases inferior e superior eram formadas majoritariamente por água, elas ofereceram um ambiente menos drástico para as biomoléculas do que os solventes orgânicos utilizados nas extrações líquido-líquido tradicionais (ELLT), evitando assim, que elas perdessem suas conformações responsáveis por suas atividades biológicas.

Na década de 80 Zvarova et al. [8] estudaram o comportamento de partição de íons metálicos na presença de extratantes solúveis em água em sistemas aquosos bifásicos (SAB). A partir de então os SAB têm sido largamente aplicados na separação, purificação e pré-concentração de diversos tipos de solutos como organelas celulares, [9,10] proteínas [11], membranas [12], DNA [13], anticorpos [14], nanopartículas [15], corantes [16-17] e íons [18-22].

Os SAB são formados espontaneamente após a mistura de duas soluções aquosas de polímeros hidrossolúveis quimicamente diferentes [23], ou após a mistura de uma solução aquosa de polímero e uma solução de eletrólito [24] ou então a mistura de duas soluções de sal [25]. A formação do sistema bifásico só ocorre em determinadas condições termodinâmicas como temperatura, pressão e concentração dos componentes, condições estas que são específicas para cada SAB [26]. Considerando SAB formados por mistura de soluções aquosas de polímero e sal nas condições necessárias para a formação de um sistema heterogêneo, a fase superior será rica em polímero, e a fase inferior enriquecida com sal [26], como na Figura 1.

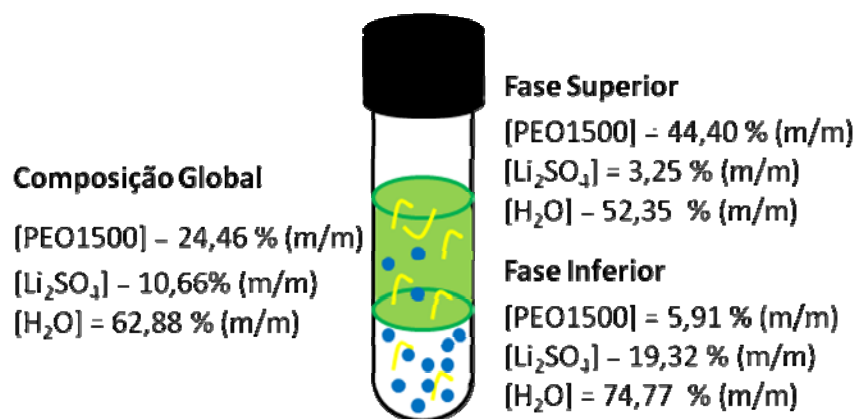


Figura 1. Composições do SAB composto por Poli(óxido de etileno) 1500 g mol⁻¹ (PEO1500) + sulfato de lítio + água á 25 ° C [27]

As composições das fases em equilíbrio termodinâmico são representadas por um diagrama de fases. Este diagrama pode ser representado graficamente de forma triangular, onde cada um dos três eixos representa a composição de um componente, ou retangular como na Figura 2.

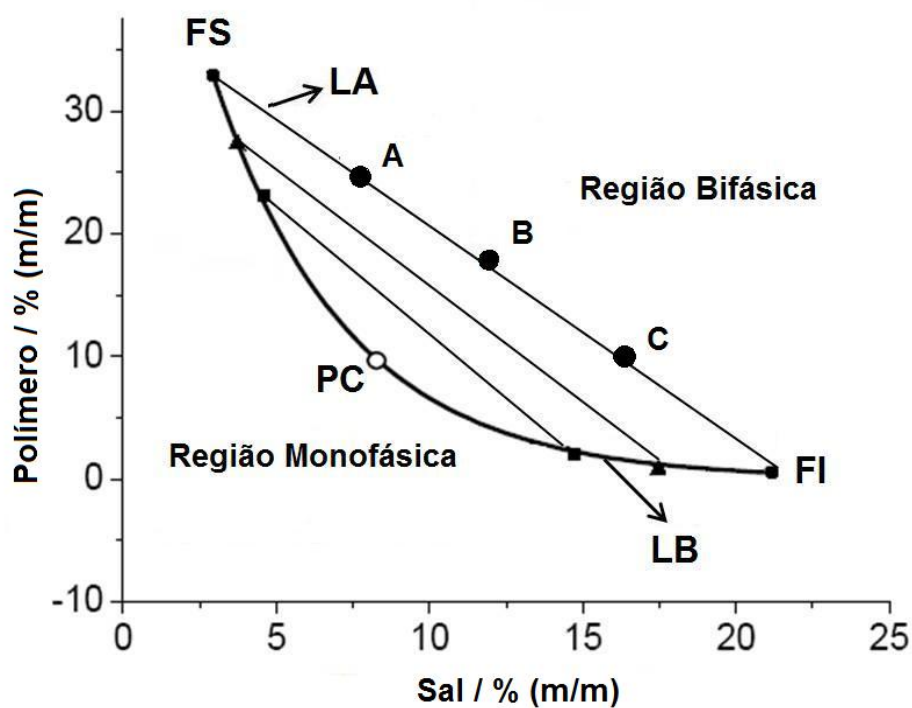


Figura 2. Representação gráfica de um diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares para um SAB formado por polímero + sal + água.

Nesses diagramas retangulares a concentração de polímero se encontra no eixo das ordenadas e a concentração de sal no eixo das abscissas, sendo que essas concentrações são dadas em porcentagem mássica, % (m/m).

Informações importantes são obtidas através da análise de um diagrama. A linha binodal (LB) delimita as regiões de composição onde o sistema é homogêneo ou bifásico, ou seja, as composições que estão representadas infinitesimalmente acima da LB são as concentrações mínimas para se obter um sistema bifásico. A posição da LB pode variar com a temperatura do sistema, pH, natureza química do sal, pressão, e com a natureza química e massa molar média do polímero [28]. Existem diferentes métodos para a obtenção da linha binodal, entretanto o mais utilizado envolve titulação turbidimétrica e análise das composições das fases [23]. A Figura 2 apresenta também as linhas de amarração, LA, que determinam a concentração das duas fases em equilíbrio termodinâmico. Ao longo de uma mesma LA, em qualquer ponto de composição global utilizado para o preparo de um SAB, todas as propriedades termodinâmicas intensivas serão iguais, enquanto as propriedades termodinâmicas extensivas das fases serão diferentes. Por exemplo, os pontos de composição global A, B e C terão uma mesma composição de fase superior, identificada pelo ponto FS, e uma mesma composição de fase inferior, dada por FI. Em compensação, os volumes das fases serão diferentes em cada um destes pontos [27].

Um parâmetro importante no estudo de um SAB é o comprimento de linha de amarração, CLA. Este é um valor numérico calculado que mede a distância entre os pontos FS e FI no diagrama de fases, expressando a diferença entre as propriedades intensivas de ambas as fases. Ou seja, quanto maior o valor de CLA, mais distintas são estas propriedades entre as duas fases, o que sabidamente eleva o coeficiente de partição do analito de interesse. Este parâmetro é calculado de acordo com a Equação 2 [24].

$$CLA = \sqrt{(C_{pol}^{FS} - C_{pol}^{FI})^2 + (C_{sal}^{FS} - C_{sal}^{FI})^2} \quad (1)$$

Sendo que C_{pol}^{FS} e C_{pol}^{FI} são as concentrações de polímero em fase superior e inferior, respectivamente, e C_{sal}^{FS} e C_{sal}^{FI} são as concentrações de sal em fase superior e inferior, respectivamente. O CLA é fundamental quando se deseja comparar o comportamento de partição de um soluto em diferentes SAB. Neste caso, os CLA dos sistemas estudados devem ser os mais próximos possíveis [24].

2.1 Comportamento de partição de um soluto em um SAB

A adição de um soluto num determinado SAB resultará numa concentração preferencial deste soluto em uma das fases, determinada por interações específicas entre este e os componentes de cada fase. Na ausência dessas interações a força motriz de partição será a entropia. Esta característica dos SAB torna-os viáveis para a aplicação em separação, concentração e purificação de várias substâncias.

O parâmetro que caracteriza a distribuição do analito entre as duas fases aquosas do SAB é o coeficiente de partição, K , que é definido como:

$$K = \frac{a_{FS}}{a_{FI}} \cong \frac{C_{FS}}{C_{FI}} \quad (2)$$

onde, a_{FS} e a_{FI} são as atividades do soluto na fase superior e na fase inferior respectivamente, e C_{FS} e C_{FI} são as concentrações do soluto na fase superior e na fase

inferior respectivamente. Em situações em que o soluto está muito diluído os valores da concentração e atividade tornam-se muito próximos.

O comportamento de partição do soluto é influenciado por diversos fatores ligados a natureza do soluto e ao SAB utilizado. Em relação a natureza do soluto os principais fatores são: a presença de carga elétrica, hidrofobicidade, composição e conformação. Já em relação ao SAB a massa molar e a concentração do polímero, além da presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica influenciam no comportamento de partição; bem como o pH, a temperatura, e o eletrólito formador do sistema.

A termodinâmica de partição de um soluto no SAB é discutida pelo modelo de Johansson et al. [29], que é um conjunto de equações analíticas que expressam o coeficiente de partição em termos das contribuições entrópicas e entálpicas. Este modelo é baseado na teoria de Flory–Huggins para soluções poliméricas, onde estas soluções são tratadas como uma rede tridimensional, onde os sítios são ocupados por uma molécula do solvente, segmentos do polímero (em um volume correspondente ao tamanho da molécula do solvente), e pela molécula do sal; e então contribuições entálpicas e entrópicas são abordadas.

A equação para a contribuição entrópica é representada na Equação 3, onde considera-se inexistente a contribuição entálpica para a variação da energia livre de Gibbs [29].

$$\ln K = \frac{M}{\rho} \left(\frac{n_{FS}}{V_{FS}} - \frac{n_{FI}}{V_{FI}} \right) \quad (3)$$

onde, M é a massa molar do soluto particionado, ρ é o número de sítios por unidade de volume de todo sistema aquoso bifásico, n_{FS} e n_{FI} são os números total de moléculas

na fase superior e inferior respectivamente, V_{FS} e V_{FI} são os volumes da fase superior e inferior respectivamente.

A Equação 3 mostra que só haverá contribuição entrópica se houver diferença de densidade numérica entre as duas fases. Caso não exista essa diferença o soluto presente no SAB terá o mesmo número de possibilidades de distribuírem-se espacialmente em ambas as fases. A entropia impulsionará o soluto para a fase com maior número de moléculas por unidade de volume, já que nesta fase haverá um maior número de possibilidades de distribuir as moléculas espacialmente, aumentando a contribuição da entropia configuracional para a minimização da variação da energia livre de mistura. As moléculas de água estão presentes em maior número na maioria dos SAB conhecidos, por isso ela é o componente determinante para a densidade numérica das fases. Então a contribuição entrópica, na ausência de efeitos entálpicos, fará o soluto particionar para a fase com maior número de moléculas de água [30].

Em um SAB formado por um eletrólito e um polímero [24,26-28], forças de natureza entrópica farão com que o soluto particione para a fase rica em eletrólito, pois esta contém uma maior densidade numérica. Neste tipo de SAB então, o soluto irá para fase polimérica somente se houver forças de natureza entálpicas.

O fator entálpico também é de grande importância em alguns processos de partição, principalmente quando a diferença de densidade numérica entre as fases é pequena, e quando há interações fortes entre o soluto e algum componente do SAB. A Equação 4 representa todas as interações entálpicas que ocorrem dentro do SAB [29].

$$\ln K = -\frac{M_s}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq s)}^m (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{is} - \sum_{i=1(i \neq s)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq s)}^m (\phi_i^{FS} \phi_j^{FS} - \phi_i^{FI} \phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (4)$$

onde, M_s representa a massa molar do soluto, R é a constante geral dos gases, T é a temperatura, ϕ_i^{FS} e ϕ_i^{FI} são as frações volumétricas do componente i na fase superior e inferior respectivamente, w_{is} é a energia de formação do par entre o soluto e o componente i e w_{ij} é a energia resultante da formação do par entre os componentes i e j .

Na Equação 4 o primeiro somatório representa as interações entre o soluto com cada componente formador do SAB, e o valor desse somatório é proporcional à diferença de composição entre as fases. O componente que interagir mais fortemente com o soluto, apresentará um valor de w_{is} mais negativo, isto é contribuirá mais para a minimização da energia livre de Gibbs; portanto o soluto particionará para a fase mais rica do componente com que ele interaja mais fortemente [30].

O segundo somatório na equação 4 representa as interações entálpicas entre os componentes do SAB, associado ao processo de transferência de fase do soluto. Este termo independe da natureza do soluto particionado, e pode ser interpretado como o conteúdo energético de cada fase. Quando o soluto sofre o processo de transferência de fase, ele libera um volume na fase que estava, possibilitando assim a interação entre os componentes desta fase, e ao chegar à outra fase ele formará uma cavidade impedindo, no volume ocupado, a interação entre os componentes desta fase. O saldo energético deste processo influenciará na partição deste soluto no SAB.

Baseado nas discussões das Equações 3 e 4, pode-se inferir sobre a influência de alguns fatores, como por exemplo, o CLA e a massa molar do polímero utilizado no SAB, no comportamento de partição.

Quanto menor o valor do CLA, mais o coeficiente de partição se aproximará de 1; já que menor é a diferença entre a composição das fases e consequentemente menor é a diferença entre elas em termos da densidade numérica, da auto energia e da energia de interação. Com o aumento do CLA a diferença entre as fases com relação a essas

variáveis também aumenta, crescendo também a tendência do soluto por uma das fases. Portanto, o coeficiente de partição cada vez mais se distancia de 1 a medida que o CLA aumenta.

Em relação á massa molar do polímero, o aumento desta aumentará o grau de polimerização, como consequência haverá uma diminuição da entropia configuracional. Em geral, uma massa molar maior do polímero em uma fase, na ausência de efeitos entálpicos, fará com que o soluto particione preferencialmente para a outra fase.

2.2. Referências Bibliográficas

[1] Beijerinck, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. *Zbl. Bakt. II Natur.* **1896**, 627, 697-699.

[2] Beijerinck, M. W. Ueber Emulsionsbildung bei der vermischung wässriger lösungen gewisser gelatinierender kolloide. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1910**, 7, 16-20.

[3] Ostwald, W.; Hertel, R. H. Kolloidchemische reaktionen zwischen solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. I. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, 47, 258-268.

[4] Ostwald, W.; Hertel, R. H. Kolloidchemische reaktionen zwischen solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. II. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, 47, 357-370.

[5] Dobry, A.; Boyer-Kawenoki, F. J. Phase separation in polymer solution. *Polym. Sci.* **1947**, 2, 90-100.

[6] Dobry, A. Sur lincompatibilite des macromolecules en solution. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1948**, 57, 280-285

[7] Albertsson, P. A. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. *Nature* **1956**, 177, 771-774.

- [8] Zvarova, T. I.; Shkinev, V. M.; Vorob'eva, G. A.; Spivakov, B. Ya.; Zolotov, Yu. A. Liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: Application of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Microchim. Acta* **1984**, *84*, 449-458.
- [9] Banik, R. M.; Santhiagu, A.; Kanari, B.; Sabarinath, C.; Upadhyay, S. N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *19*, 337-348.
- [10] Santesoon, S.; Ramirez, I. B. R.; Viberg, P.; Jergil, B.; Nilsson, S. Affinity two-phase partitioning in acoustically levitated drops. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 303-308.
- [11] Haghtalab, A.; Mokhtarani, B.; Maurer, G. Experimental results and thermodynamic modeling of the partitioning of lysozyme, bovine serum albumin, and α -amylase in aqueous two-phase systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). *J. Chem. Eng. Data* **2003**, *48*, 1170-1177.
- [12] Everberg, H.; Clough, J.; Henderson, P.; Jergil, B.; Tjerneld, F.; Ramirez, I. B. R. Isolation of *Escherichia coli* inner membranes by metal affinity two-phase partitioning. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1118*, 244-252.
- [13] Frerix, A.; Schonewald, M.; Geilenkirchen, P.; Muller, M.; Kula, M. R.; Hubbuch, J. Exploitation of the Coil-Globule Plasmid DNA Transition Induced by Small Changes

in Temperature, pH Salt, and Poly(ethylene glycol) Compositions for Directed Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *Langmuir* **2006**, *22*, 4282-4290.

[14] Azevedo, A. M.; Gomes, A. G.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Pisco, A. M. M. O.; Aires-Barros, M. R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *65*, 14-21.

[15] Alejandro, N.; T. C. Ling; Lyddiatt, A. Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4. *J. Chromatogr. B* **2007**, *854*, 13-19.

[16] Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanka, S. The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta* **1999**, *48*, 1133-1137.

[17] Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minin, L. A.; *Journal Chromat. A*, **2009**, *1216*, 7623-7629

[18] da Silva, L. H. M.; da Silva, M.C.H.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minin, L. A.; Coimbra, J. S. R. PEO-[M(CN)₅NO]^{x-} (M = Fe, Mn or Cr) Interaction as Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: The Strong Effect of the Central Atom. *J. Phys. Chem. B*. **2008**, *112*, 11669-11678.

[19] da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; de Aquino, R. A. N.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minin, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as driving force for partitioning of the [Fe(CN)₅NO]²⁻ anion in aqueous two-

phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 23540-23546.

[20] da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Júnior, J. A.; Martins, J. P.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Hydrophobic effect on the partitioning of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *60*, 103-112.

[21] Rogers, R. D.; Willauer, H. D.; Griffin, S. T.; Huddleston, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic system. *J. Chromatogr. B* **1998**, *711*, 255-266.

[22] Rodrigues, G. D.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Paggiolli, F. J.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *62*, 687-693.

[23] Zaslavsky, B. Y. Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical Chemistry and Bio-analytical Applications. Marcel Dekker, New York, **1995**

[24] de Lemos, L. R.; Santos, I. J. B.; Rodrigues, G. D.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, L. H. M.; da SILVA, M. D. H. ;de Carvalho, R. M. M., Phase Compositions of Aqueous Two phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*, **2009**, *54*, p. 10.1021/-je900589h,

- [25] Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). *Green Chem.* **2007**, *9*, 177-183.
- [26] da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Júnior, J. A.; Guimarães, R. O.; Martins, J. P. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Mixture of Triblock Copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, Li₂SO₄, or MgSO₄. *J. Chem. Eng. Data* **2006**, *51*, 2260-2264.
- [27] Martins, J. P.; Carvalho, P. C.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. R.; da Silva, M. C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *J. Chem Eng. Data* **2008**, *53*, 238-241
- [28] da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Mesquita, A. F.; Nascimento, K. S.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH, *J. Chem. Eng. Data* **2005**, *50*, 1457-1461
- [29] Johansson, H.; Karlström, G; Tjerneld, F.; Haynes, C. A.; Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems, *J. Chromat. B* **1998**, *711*, 3-17
- [30] da Silva, L. H. M.; Loh, W.; Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Quimica Nova* **2006**, *29*, 1345-1351

Capítulo 3

Aqueous two-phase system: a new approach for the determination of *p*-aminophenol in water and biochemical samples

Abstract

A new method has been developed for the spectrophotometric determination of *p*-aminophenol (PAP) in water, formulations of paracetamol and human urine. The procedure exploits an aqueous two-phase system (ATPS) liquid-liquid extraction technique and the reaction of PAP, sodium nitroprusside (NPS) and hydroxylamine hydrochloride (HL) in an alkaline medium (pH 12.0), producing the complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ that spontaneously concentrates in the top phase of the system ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}} = 97.7$). The ATPS is formed mostly by water and does not require organic solvent. The other components of the ATPS were the polymer, polyethylene oxide, and salts (i.e., Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$). The linear range was 5.00 to 500 mg kg^{-1} ($R \geq 0.9990$; $n = 8$) with coefficient of variation of 2.11 % ($n = 5$). The method exhibited a limit of detection (LOD) of 2.40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and a limit of quantification (LOQ) of 8.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The ATPS method showed recoveries between 96.4 – 103 % for the determination of PAP in natural water and wastewater samples, in excellent agreement with the results of the standard 4-aminoantipyrine (4-AAP) method for the same samples. The proposed method was also used for the determination of PAP in paracetamol pharmaceutical formulations and human urine samples with recovery rates between 94.9 – 101 %.

Keywords: Aqueous two-phase system; p-aminophenol; water; paracetamol; human urine.

1. Introduction

Public health and environmental safety concerns have grown over the last few decades. The disposal of toxic pollutants in water sources can be very harmful both to the environment and human health. Thus, the establishment of simple, fast, low-cost, greener, sensitive, and selective analytical methods for the determination of pollutants in water and other strategic matrices is a main line of research in environmental chemistry.

The determination of phenol and its derivative compounds (such as aminophenol) is of significant importance, since these species are toxic [1,2] and involved in many industrial processes [3–5]. For example, according to environmental legislation, the maximum concentration limits of total phenols in bodies of water are in the range 3.5–10 $\mu\text{g L}^{-1}$ [6,7].

The compound p-aminophenol (PAP) is recognized as a serious environmental pollutant, and has been widely used as a raw chemical material and important intermediate in various fields, such as medicine, sulfur and azo dyes, rubber, feeding stuff, petroleum, and photography [8–10]. Moreover, PAP is a parent material for the production of paracetamol, and can also be formed by the degradation of this analgesic and its analogs in the human body and during the storage of its medicinal preparations [11]. In addition, PAP is toxic and irritable to the eyes, skin and respiratory system, and its target sites are blood and kidney [9,12]. Furthermore, PAP increases the body temperature of humans and is characterized by a long biological half-life (the time required for half of the PAP to be removed from the organism by biophysical and biochemical processes). According to the European Pharmacopoeia [13], 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ is

the specification limit of PAP in paracetamol drug substances. Thus, PAP is both biochemically and environmentally hazardous, so the determination of its trace amounts in matrices, such as waters, pharmaceutical formulations and human fluids, is important.

Numerous analytical methods have been developed for the analysis of PAP and other phenolic compounds, including gas chromatography (GC) [14–16], liquid chromatography (LC) [17–19], capillary electrophoresis (CE) [20–22], potentiometric titration [23], nuclear magnetic resonance (NMR) [24], enzyme-based assays [25] and electrochemical analysis [20,26,27]. However, these methods do not allow for in situ continuous monitoring, require expensive instruments, demand skilled operators and require derivatization of the analytes. Spectrometric analysis has also been applied in the determination of phenols, mainly by UV–Visible detection [28–31].

The most commonly used analytical method (described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [32]) is a spectrophotometric method based on the oxidative coupling of phenols with 4-aminoantipyrine (4-AAP). However, this procedure has many disadvantages, including (i) the requirement for large amounts of reagents, especially chloroform, which is toxic and carcinogenic [33]; (ii) difficulty in finding suitable buffers, due to the sensitivity of the reaction to pH variations; and (iii) tedious operations.

An interesting spectrophotometric method for the determination of phenolic compounds has been reported by Nagaraj et al. [34] and improved by Kang et al. [35]. Based on the reaction between phenol, sodium nitroprusside (NPS) and hydroxylamine hydrochloride (HL) in an alkaline medium, a blue-colored complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ is produced. However, this procedure is not yet suitable for the determination of phenols at concentrations lower than $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$ nor for analyses in

the presence of electrolytes, such as phosphates and sulfates, which introduce errors. Moreover, a previous distillation step for sample preparation is required [36].

A convenient approach to address these limitations is to promote the complex formation reaction at the interface between the bottom and top phases of an aqueous two-phase system (ATPS). This reaction avoids salt interference and the posterior transfer of the complex to a small volume of the ATPS top phase. Within this context, ATPS can be a strategic liquid–liquid extraction technique for PAP determination. Under specific thermodynamic conditions, an ATPS can be formed by mixtures of aqueous solutions of (i) certain electrolytes and a polymer [37], (ii) two types of water–soluble polymers [38] or (iii) two types of salts [39]. The resulting systems are two immiscible liquid phases with a polymer–enriched top phase (or enriched with a salt) and a salt–enriched bottom phase (or enriched with the second polymer or salt). Moreover, water is the major component of both phases, thus providing an extraction technology that eliminates the use of hazardous solvents. Finally, ease of use, low costs, shorter times for phase splitting and recycling of the system components are the advantages of the technique [40]. The ATPS methodology has already been applied successfully by Rodrigues et al. in the determination of phenol and o–cresol in different water samples [36].

This work aimed to determine PAP in water, formulations of paracetamol and human urine, using an ATPS composed of polyethylene oxide 1500 (PEO1500) + salt (Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$) + water. The proposed method is based on the reaction between PAP, NPS and HL in an alkaline medium and spectrophotometric detection of the reaction product. Specific parameters, such as the nature of the ATPS electrolyte, ATPS tie–line length (TLL), and partitioning behavior and influence of *p*-chlorophenol (PCP) in the analysis, were also investigated.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Spectrophotometric measurements were performed with a UV–Visible (UV/Vis) spectrophotometer (Shimadzu, UV–2550) using quartz microcells with a 1.00 cm optical path length and a total capacity of 450 μL . The slit width was kept at 2.0 nm. The software used for system control and data acquisition was UVProbe. The pH measurements were collected with a combined glass electrode using a digital pH meter (Digicron Analítica Ltda, Digimed model DM-20). An ultrasonic bath (Ultra–Cleaner, USC 1400) and a centrifuge (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 11R) were used to prepare the paracetamol formulations.

2.2. Chemicals

All reagents were of analytical-grade quality and used as received without further purification. Distilled water was used throughout the experiments. The polymer was polyethylene oxide (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) with an average molar mass (M_m) of 1500 g mol^{-1} (denoted as PEO1500). The chemicals in the proposed method, Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , KOH , NaOH , NPS and HL, were obtained from Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). The reagents for the 4–AAP procedure [32] were 4–aminoantipyrine, NH_4OH , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Darmstadt, Germany), K_2HPO_4 and KH_2PO_4 (Vetec). *p*–aminophenol and *p*–chlorophenol (PCP) were also purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.3. ATPS composition, solutions and standards

The three ATPS types applied in the development of the procedure were PEO1500 + Li₂SO₄ + water; PEO1500 + Na₂SO₄ + water [37] and PEO1500 + (K₂HPO₄ + KOH) + water. For each system, at least three different compositions were studied to verify the effect of the TLL in the partitioning behavior of the [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ complex (Table 1). Moreover, global compositions shown in Table 1 are relative to an ATPS composed of 2.00 g of the top phase and 10.0 g of the bottom phase, which were used in most assays.

All solutions were prepared with distilled water. In the ATPS method, the pH of the water was adjusted to 12.0 with NaOH because this pH is more favorable to the complete reaction of NPS with PAP. For systems composed of the salts K₂HPO₄ + KOH, correction was not necessary because the pH was 12.0. Stock solutions of the top and bottom phases were prepared in distilled water (pH 12.0). The PEO1500 and salt concentrations in the phase stock solutions are provided in Table 1. These solutions were used as solvents to prepare the solutions of NPS and HL. The HL working stock solutions (259 mg kg⁻¹) were prepared by weighing the appropriate quantity of hydroxylamine hydrochloride in the bottom phase using an analytical balance (Shimadzu, AY 220) with an uncertainty of ±0.0001 g. The NPS working stock solutions (1.99 g kg⁻¹) were obtained by dissolving the appropriate amount of salt in the top phase. Working standard solutions of PAP between 0.125 and 50.0 mg kg⁻¹ were prepared daily by using water as the solvent and the appropriate dilution of a 1.00 g kg⁻¹ stock solution. In the 4–AAP method, the solutions and standards were prepared as described in the literature [32].

Table 1. Percent composition (w/w) for PEO1500 (w_p), salt (w_s) and water (w_w) in aqueous two-phase systems (ATPS) at 25.0 °C.

Tie-line length (TLL)	Global		
	w_p	w_s	w_w
PEO1500 + Li₂SO₄ + water			
29.43	11.4	13.83	74.77
34.97	12.0	14.73	73.27
41.71	12.3	16.64	71.06
46.36	12.8	17.62	69.58
51.67	13.5	18.79	67.71
PEO1500 + (K₂HPO₄ + KOH) + water			
24.65	9.38	13.19	77.43
34.45	9.09	16.09	74.82
36.83	8.97	17.71	73.32
46.55	7.00	21.65	71.35
52.30	7.52	24.43	68.05
PEO1500 + Na₂SO₄ + water			
32.51	7.45	13.50	79.05
35.96	7.52	15.17	77.31
40.10	7.87	16.53	75.60

2.4. Procedure

Liquid–liquid equilibrium cells were used for ATPS preparation. Working stock solutions of 2.00 g of NPS and 10.0 g of HL were weighed. Next, 0.2000 g of a PAP working standard solution were added to the system. A similar technique was adopted in the analysis of the samples. A final composition of PAP between 2.50 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the bottom phase was obtained, and the global concentrations of NPS and HL were 332 mg kg^{-1} and 216 mg kg^{-1} , respectively. The final concentrations of PEO1500 and salt in the ATPS varied depending on the TLL (Table 1). Subsequently, the biphasic systems were manually stirred for 3 min and allowed to settle for 20 min at (25.0 ± 0.1)

°C in a temperature-controlled bath (Microquímica, MQBTC 99-20). Finally, aliquots of the top phase were collected with a syringe and diluted by a factor of 1.50. The UV/Vis spectrophotometric measurements were carried out at 720.0 nm.

The afore-mentioned parameters (pH, NPS concentration, HL concentration, sample stirring time and phase splitting time) were previously investigated and optimized by Rodrigues *et al.* [36].

2.5. Partitioning experiments

To determine the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex partition coefficient ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$) between the two phases, the ATPS was kept for 24 h in a temperature-controlled bath to reach thermodynamic equilibrium. Subsequently, aliquots of the top and bottom phases were collected. Therefore, the parameter $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ can be defined as

$$K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}} = \frac{A_T}{A_B} \quad (1)$$

where A_T and A_B are the absorbance (at 720.0 nm) of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex in the top and bottom phases, respectively.

The influence of the TLLs in the partitioning behavior of the complex anion was studied by determining $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ as a function of the TLL for the ATPS composed by PEO1500 + Li_2SO_4 + water.

2.6. Water Samples

To determine the applicability of the method in environmental samples, the recovery rates provided by the proposed method were determined in samples such as

natural river water, industrial water, distilled water, tap water and samples from waste water treatment plants (WWTPs). In these cases, the appropriate amounts of PAP were added to the samples without the distillation step. The 4–AAP method [32] was also applied to the same samples for comparison and to check the accuracy of the proposed method.

2.7. Determination of PAP in paracetamol formulation

Paracetamol formulations were obtained from different manufacturers. Ten tablets, containing 750 mg of paracetamol per tablet, were finely pulverized, homogenized and accurately weighed. Each weighed sample was extracted with 25 mL of ethanol for 15 min in an ultrasonic bath. The suspension was centrifuged for 20 min at 3000 rpm to obtain a clear supernatant, to which the appropriate amounts of PAP were added. The experiments were carried out according to the general procedure and the recovery rates of PAP in the samples were determined. In our previous studies, it was observed that the addition of ethanol quantities lower than 0.200 g in the system has no influence in the analytical response.

2.8. Analysis of urine samples

The same assays were used for the analysis of urine samples from healthy volunteers. Urine samples were collected 5 hours after the administration of a single 750 mg dose of paracetamol and then stored in plastic containers. The samples were 100–fold diluted with distilled water and the appropriate amounts of PAP were added. The experiments were carried out according to the general procedure and the recovery rates of PAP in the samples were determined.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical and spectral characteristics

The proposed method is based on the reaction of PAP, NPS and HL according to the mechanism studied by Kang et al. [35]. In an alkaline medium, the phenol group is deprotonated, which makes the benzene ring very reactive. The higher electronic density in the phenolate enables the electrophilic reaction to take place more easily. In the reaction of PAP, the nitroso group (^+NO) of the nitroprusside attacks the benzene ring, preferably, in the ortho-position to yield the green-blue complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ [36].

Figure 1 shows the absorption spectra of the reaction product $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ obtained in the ATPS top phase. The product shows an absorption spectrum with a maximum at 720.0 nm, a wavelength fortunately with an insignificant blank signal. According to spectra obtained in aqueous solutions by Kang et al. [35], the product of the reaction among PAP, NPS and HL exhibits maximum absorbance at 700 nm. The different environment surrounding the product in the ATPS top phase compared with the aqueous solution in previous experiments may account for this shift in the absorption maximum.

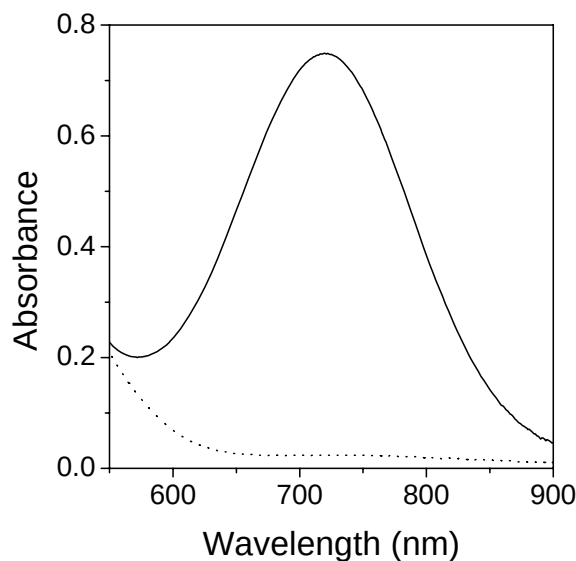


Fig. 1. Absorption spectra of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion formed by the reaction system between NPS, HL and (—) PAP, and (···) a blank assay spectrum in the PEO1500/ Li_2SO_4 aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) of 41.71 % (w/w).

In general, cyan complexes are photosensitive, so the experiments were performed in the absence of light to avoid complex decomposition. The stability of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex was previously investigated by Rodrigues et al. [36]. Spectral analysis revealed that the signal relative to the maximum absorbance of the complex remained constant for over 75 hrs.

3.2. Phase diagrams

All of the phase diagrams were previously constructed and are reported in the literature [37], except for the ATPS composed of PEO1500 + (K_2HPO_4 + KOH) + water. After mixing the components, at a specific global composition (Table 1), the systems spontaneously separated into two isotropic transparent phases, with the top and bottom phases being enriched in macromolecules and salt, respectively.

The tie-lines were obtained by linear regression of the corresponding set of overall bottom- and top-phase concentrations. At least four tie-lines were determined for each system.

3.3. Influence of tie-line length (TLL) and electrolyte on the partitioning behavior

In order to improve the sensibility of the proposed method, it is very important to determine the partitioning behavior of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion as a function of the tie-line length (TLL). The increase in the preferential transfer process of the complex anion in the top phase makes it possible to increase the absorbance signal, decreasing the limit of detection. The TLL is a thermodynamic parameter in the ATPS that expresses the difference in intensive thermodynamic functions between the top and bottom phases at constant pressure and temperature [41]. The TLL is expressed by the difference between polymer and salt concentrations present in the different phases, and is commonly used as a variable determining the processes of solute partitioning. The TLL is calculated by Equation 2:

$$TLL = [(C_p^T - C_p^B)^2 + (C_s^T - C_s^B)^2]^{1/2} \quad (2)$$

where C_p^T and C_p^B are the polymer concentrations in the top and bottom phases, respectively, and C_s^T and C_s^B are the corresponding salt concentrations.

Figure 2 shows the partition coefficient ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$) of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion plotted against TLL in ATPS composed of PEO1500 + salt (Li_2SO_4 or K_2HPO_4 + KOH or Na_2SO_4) + water. As shown in Figure 2, the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex anion has a spontaneous concentration in the polymer-rich phase, reaching values of 97.7 for a TLL of 51.67 % (w/w) in the PEO1500/ Li_2SO_4 ATPS. To explain the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$

partitioning to the ATPS top phase, the simple Haynes' model was used, which was derived from the Flory–Huggins theory. This model consists of analytical equations that express the partition coefficient in terms of enthalpic and entropic contributions.

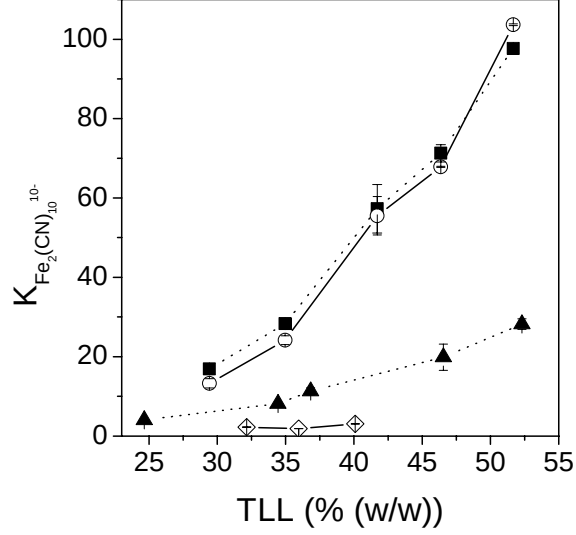


Fig. 2. Partition coefficient ($K_{[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}}$) of $[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$ anion water ATPS as a function of increasing tie-line length (TLL), in ATPS composed of PEO 1500 + salt + water. (▲) $K_2HPO_4 + KOH$; (◇) Na_2SO_4 ; (■) Li_2SO_4 and (○) Li_2SO_4 in the presence of PCP.

In Haynes' model, the entropic contribution to partitioning is described by Equation (3):

$$\ln K_C = \frac{M_C}{\rho} \left(\frac{n^T}{V^T} - \frac{n^B}{V^B} \right) \quad (3)$$

where M_C is the molar mass of the partitioning solute ($[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$), n^T and n^B are the total number of molecules in the top and bottom phases, respectively, which result

in a parameter called the phase number density when divided by the phase volume, V^T e V^B , and ρ is the number of lattice sites per unit volume.

Based on Equation 3, the complex transferring process leads to a decrease in the entropy of the system in the absence of enthalpic effects, such that the solute will partition to the phase with the larger number of molecules per unit volume. Therefore, the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion should partition to the ATPS bottom phase, which has a higher number density than the polymer-rich phase, mainly due to the larger water content in the salt-rich phase, as shown in Table 1. However, Figure 2 shows that the complex concentrates preferably in the top phase, decreasing the entropy of the system, indicative that the solute partitioning is an enthalpy-driven process.

The Haynes's model enthalpy contribution to the partition coefficient is given by Equation 4:

$$\ln K_C = -\frac{M_C}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq C)}^m (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{iC} - \sum_{i=1(i \neq C)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq C)}^m (\Phi_i^T \Phi_j^T - \Phi_i^B \Phi_j^B) w_{ij} \right] \quad (4)$$

where Φ_i^T and Φ_i^B are the volume fractions of the ATPS-forming compounds on the top and bottom phases, respectively, w_{ij} is the effective pair-wise interchange energy defined as: $w_{ij} = z[\varepsilon_{ij} - (1/2)(\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj})]$, where z is the number of nearest neighbors and ε_{ij} is the potential energy of an i-j pair.

In Equation 4, the enthalpic contribution is described by two terms. The first, $\left[\sum_{i=1(i \neq C)}^m (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{iC} \right]$, is a energetic contribution relative to interactions between the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion and all of the remaining ATPS components. Stronger i-complex interactions (ic) lead to more negative w_{iC} values and a more enthalpically favorable

transfer of the complex to the i-component rich phase. Considering that the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anions are concentrated in the PEO-rich phase, the enthalpic molecular interactions between the complex molecules and polymer molecules are the driving force of the partitioning behavior.

The second term, $\sum_{i=1(i \neq C)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq C)}^m \Phi_i^T \Phi_j^T w_{ij}$, is the self-energy of the top phase and

gives the total enthalpy of this phase formation (in the absence of the complex anion) divided by the number of lattice sites in the top phase. Insertion of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion into a phase requires breaking interactions between the original components of the phase to create a cavity into which the complex fits. Although this process is dependent on the solute volume, da Silva et al. [42–44] demonstrated that the phase self-energy does not significantly contribute to the partitioning behavior. Consequently, the anion partition behavior can be attributed to specific enthalpic interactions between $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ and macromolecules, which are concentrated on the top phase.

The value of $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ increases as the TLL increases (Figure 2). With increasing TLL, the differences between the intensive thermodynamic properties of the top and bottom phases (salt and polymer compositions) become higher [45–47]. As a consequence, higher concentrations of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ are observed in the top phase. In other words, the higher TLL increases the number of interactions of the complex with polymer molecules, such that the first term of Equation 4 becomes more negative, thereby increasing the $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ value [45].

The effect of the electrolyte nature on the partitioning behavior of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ was investigated (Figure 2). For similar TLL values, systems composed by the electrolyte Li_2SO_4 present higher values of $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$, in comparison to ATPSs formed by Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$. This behavior may be explained by the model

proposed by da Silva and Loh [48], who investigated the thermodynamics of ATPS formation. According to their model, when PEO and salt are mixed, there is an interaction between the salt cations and the PEO macromolecule, which is driven by an entropy increase due to the release of some water molecules. The interaction of the cation–PEO pair is driven by an increase in the system entropy caused by releasing some water molecules that were solvating the macromolecule and the ions. This process continues as more salt is added, until the macromolecule becomes saturated with ions and no further gain in entropy is possible, and therefore phase splitting becomes more favorable. After splitting phases, the polymer–rich phase contains the PEO macromolecules solvated with cations of the salt, resulting in a positively charged polymer surface called a pseudopolycation, which can interact with negatively charged species. Through calorimetric measurements, da Silva and Loh [48] noted that Li^+ cations interact more strongly with the EO segments of the macromolecules than the other cations, indicating that more Li^+ is necessary energetically to saturate the polymer chain. Consequently, in the ATPS composed of Li_2SO_4 , the macromolecule of PEO is more positively charged than the systems composed of $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$ or Na_2SO_4 , enabling a stronger electrostatic interaction between the pseudopolycation and the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex.

Figure 2 presents the study of the partitioning behavior of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ produced by the reaction among PAP, NPS and HL, in the presence and absence of PCP in an ATPS composed by PEO1500/ Li_2SO_4 . The reactivity is determined by the electrophilic or electrophobic properties of the substituents in the benzene ring, which affect the reaction extension and consequently the formation of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex [49]. Due to the position and electrophilic properties of the chlorinated substituent, the reaction of the proposed method does not take place with PCP, although

its presence does not interfere with the reaction with PAP and the partitioning of the complex to the top phase of the ATPS. A study on the selectivity of the proposed method showed that PCP has no interference at concentrations under 7.00 mg kg^{-1} , when considering a sample with 1.00 mg kg^{-1} of PAP. This selectivity of the reaction allows for the quantification of certain phenolic compounds in the presence of other nonreactive derivatives.

3.4. Study of the sensitivity of the method

Figure 3 shows the influence of the TLL on the sensitivity of the method for PAP determination for the three kinds of ATPSs. These data were obtained by plotting analytical curves for all of the TLLs of the ATPS and then comparing with absorbance values of the PAP standard ($600 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). The ATPS PEO1500/ Na_2SO_4 studies in TLLs $> 40.10 \text{ } \%$ (w/w) were not practical due to the precipitation of sulfate. The absorbance increases as the TLL increases, but the signal becomes constant or even decreases at higher TLL values. Increased TLLs cause increased differences between the intensive thermodynamic properties of the top and bottom phases [42]. As a consequence, higher concentrations of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ were observed in the top phase. This partitioning behavior contributes to the enhanced sensitivity observed for smaller TLL values. However, the increase in TLL also induces an increase in the ATPS salt concentration (Table 1), which interferes with the formation of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$, as described by Kang [35]. This decrease on the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ concentration causes a decreased sensitivity of the method at higher TLL values. Thus, the sensitivity of the method depends on the balance between the formation of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ and its concentration in the top phase, which in turn depends on the TLL. Since the reaction occurs at the interfaces in the ATPS method, the interference of ions, such as sulfate and phosphate, is insignificant in

comparison to reports by Nagaraj et al. [34] and Kang et al. [35], indicating that the tolerance limit for sulfate and phosphate is lower than 25,000 and 5,000 mg L⁻¹, respectively.

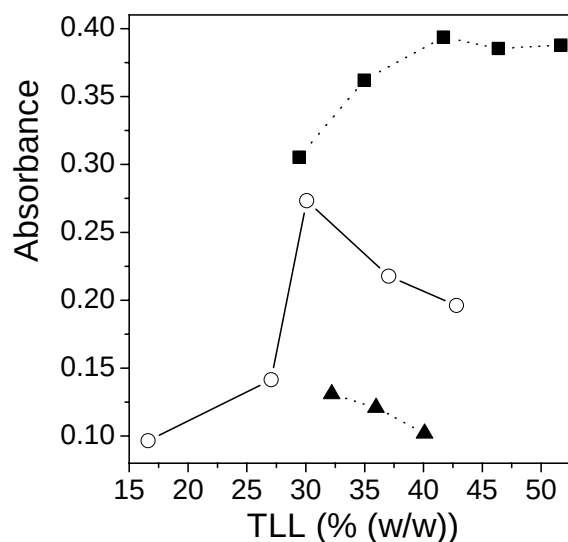


Fig. 3. Effect of tie-line length (TLL) and electrolytes on the PAP determination in an aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEO1500, salt and water: (■) Li₂SO₄, (○) K₂HPO₄ + KOH and (▲) Na₂SO₄

Figure 3 also shows the effect of electrolyte nature on the sensitivity of the method. A TLL value of 41.71 % (w/w) using the PEO1500/Li₂SO₄ ATPS presented the highest response among all of the systems studied, previously explained by its partitioning behavior, according to the da Silva and Loh model [48]. Therefore, the PEO1500/Li₂SO₄ ATPS system is more suitable for applying the proposed method in the determination of trace concentrations of PAP in industrial and environmental water samples.

3.5. Analytical features of the developed procedure

Additional experiments were performed under optimal conditions [36] to establish the analytical features of the proposed method. Due to the higher sensitivity (Fig. 3), the ATPS composed by PEO1500 + Li₂SO₄ + water was applied in these studies. To improve the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), an ATPS with 1.00 g of the top phase and 23.0 g of the bottom phase was used, offering a higher concentration factor of [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ and consequently a reduction in the range of the analytical curve.

Table 2 shows the main characteristics of the proposed method compared to the standard method [32]. The linear response ($R = 0.9990$, $n = 8$) was within 5.00 to 500 mg kg⁻¹ of PAP, which is suitable for the determination of phenols in water samples according to the limits established in American and Brazilian legislation [6,7]. The method has an LOD of 2.40 µg kg⁻¹ and an LOQ of 8.00 µg kg⁻¹. These values are lower than those obtained using the 4–AAP method [32] without extraction. The 4–AAP method provides a lower LOD when three consecutive extractions with chloroform are used. However, this procedure produces large amounts of waste (approximately, 550 mL per determination) and the use of chloroform is harmful to the environment and human health.

Moreover, the coefficient of variation (CV) was 2.11 %, and the proposed method offers a significant reduction in the volume of waste compared to the reference method. Hence, the new procedure is an environmentally friendly alternative to methods available in the literature that employ hazardous solvents, such as chloroform, or generate large amounts of waste. Furthermore, these results support the feasibility of applying the proposed method to the determination of PAP in several strategic samples.

Table 2. Comparison of the analytical figures of merit of the proposed method (ATPS) with the standard method (4–AAP) [32].

Parameter	Proposed method	4–AAP method [32] ^a
Linear Range	5.00–500 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1000–5000 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
$R (n = 8)$	0.9990	0.9998
Cell optical path	1.00 cm	1.00 cm
LOD	2.40 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
LOQ	8.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$	NA
CV (%) ($n = 5$)	2.11	0.350
Waste volume (mL) ^b	24.0	100

^a without extraction, ^b Estimated per determination; NA means not available,

3.6. Application to real samples

Table 3 shows the results of recovery studies on water samples. The ATPS method was compared with the standard 4–AAP method [32] to check the accuracy and reliability of the proposed procedures. Studies were carried out using natural river water, industrial water, tap water, distilled water and samples from WWTPs. Recovery rates between 96.4 – 103 % were obtained, and the results had excellent agreement with the standard method [32] at the 95 % confidence level according to a paired t–test [50].

The proposed method was also used for the determination of PAP in paracetamol pharmaceutical formulations and human urine samples spiked with approximately 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of PAP.

Table 3. Recoveries (%) of PAP in several water samples ($n = 3$).

Water sample	ATPS method	4-AAP method
Distilled	99.8 ± 3.4	97.9 ± 0.5
Tap	103 ± 1	96.4 ± 0.6
River	102 ± 3	99.3 ± 0.6
Industrial	98.0 ± 0.5	98.0 ± 0.9
WWTP 1	98.6 ± 4.8	99.8 ± 0.6
WWTP 2	101 ± 4	96.6 ± 0.6

WWTP: wastewater treatment plant.

Table 4 shows the recovery results for two paracetamol formulations and two urine samples. The method is capable of quantifying $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ of PAP with recovery rates between 94.9 – 101 %. Moreover, blanks assays were analyzed without added PAP in the system and no signal relative to the analyte was observed. Therefore, the present method could be used for the quantitative detection of trace PAP in urine and real pharmaceutical formulation samples, such as paracetamol tablets, and can be extended to other systems.

Table 4. Determination of PAP in pharmaceutical and human urine samples ($n = 3$).

Sample	PAP added ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	PAP found ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (%)
Paracetamol A	98.2	97.9	99.7 ± 0.7
Paracetamol B	97.5	97.3	99.7 ± 3.9
Urine A	102	96.8	94.9 ± 3.7
Urine B	96.2	97.1	101 ± 2

4. Conclusions

The above experimental results demonstrated for the first time the capability and advantages of the proposed ATPS for the determination of PAP in environmental and industrial water, pharmaceutical formulations and human urine samples. The procedure exploits the reaction between PAP, NPS and HL, producing the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex, which concentrates in the top phase of the ATPS, offering high sensitivity to the method. The ATPS offers clearly advantageous analytical features in comparison to the standard method [32], including an enhanced sensitivity and linear range as well as reduced waste volumes and no organic solvents. Due the reaction takes place at the interfaces of the ATPS, the interference of ions, such as sulfate and phosphate, is significantly lower in comparison to other spectrophotometric methods that employ the same reaction [34, 35]. Furthermore, since the presence of PCP in the system has no interference on the reaction among PAP, NPS and HL, the method is suitable to determination of certain phenolic compounds in the presence of other nonreactive derivatives. Pre-concentration of analyte in the polymer-rich phase of the system allows the method to reach LOD and LOQ values that are suitable for determining PAP in water, pharmaceutical formulations and urine with high accuracy and in compliance with the regulatory requirements of environmental agencies [6,7] and pharmacopoeia [13].

5. Acknowledgments

We gratefully acknowledge Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financially supporting this project. G. D. R. and L. R. L. thank CNPq for research fellowships. P. R. P. thanks FAPEMIG for research fellowship.

6. References

- [1] K.P. Kringstad, E. Lindstrom, Spent liquors from pulp bleaching, *Environ. Sci. Technol.* 18 (1984) 236A–248A.
- [2] U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov>, accessed in February 2010.
- [3] Y. Chung, K. Lee, Separation and determination of eleven environmental protection agency priority phenols by reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography with indirect fluorophotometric detection and solid phase extraction, *Microchem. J.* 69 (2001) 45-54.
- [4] M. Ahmaruzzaman, D.K. Sharma, Adsorption of phenols from wastewater, *J. Colloid Interface Sci.* 287 (2005) 14–24.
- [5] M. Barreto–Rodrigues, C.M. Aguiar, M.A.A. Cunha, Biotreatment of an effluent from a wood laminate industry using *Lentinula edodes* UEC, 2019 *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 1556–1560.
- [6] J. Švitel, S. Miertuš, Development of tyrosinase-based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 828–832.
- [7] Conselho Nacional do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/conama>, accessed

in February 2010 (Portuguese).

[8] S. Mitchell, Kirk–Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, vol. II, 4th ed., Wiley, New York, USA, 1992.

[9] S.A. Khan, M. Hamayun, S. Ahmed, Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain ST-4, Enzyme Microb. Technol. 38 (2006) 10–13.

[10] H. Xu, C.F. Duan, Z.F. Zhang, J.Y. Chen, C.Z. Lai, M. Lian, L.J. Liu, H. Cui, Flow injection determination of *p*-aminophenol at trace level using inhibited luminol–dimethylsulfoxide–NaOH–EDTA chemiluminescence, Water Res. 39 (2005) 396–402.

[11] H. Filik, M. Hayvalı, E. Kılıç, R. Apak, D. Aksu, Z. Yanaz, T. Çengel, Development of an optical fibre reflectance sensor for *p*-aminophenol detection based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline, Talanta 77 (2008) 103–109.

[12] R.C. Harmon, K.K. Kinningham, M.A. Valentovic, Pyruvate reduces 4-aminophenol in vitro toxicity, Toxicol. Appl. Pharm. 213 (2006) 179–186.

[13] European Pharmacopoeia, 4th ed., Council of Europe, Strasbourg, France, 2002.

[14] S. Vichi, A. Romero, J. Tous, E.L. Tamames, S. Buxaderas, Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance, J. Chromatogr. A. 1211 (2008) 1–7.

- [15] B.N. Estevinho, I. Martins, N. Ratola, A. Alves, L. Santos, Removal of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol from waters by sorption using coal fly ash from a Portuguese thermal power plant, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 535–540.
- [16] A. Kumar, A. Pamwar, Gas chromatographic separation of isomeric aminophenols, aniline, phenol, benzoquinone and azobenzene on an HP-1 capillary column, *Microchim. Acta*, 111 (1993) 177–182.
- [17] M. Lotfi, D. Frida, Simultaneous LC determination of paracetamol and related compounds in pharmaceutical formulations using a carbon-based column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 851–860.
- [18] M. Kartal, LC method for the analysis of paracetamol, caffeine and codeine phosphate in pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 857–864.
- [19] H.M. Oliveira, M.A Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants, *Talanta* 77 (2009) 1466–1472.
- [20] Q. Chu, L. Jiang, X. Tian, J. Ye, Rapid determination of acetaminophen and *p*-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection, *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 246–251.
- [21] S. Zhao, W. Bai, H. Yuan, D. Xiao, Detection of paracetamol by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta*, 559 (2006) 195–

199.

[22] W. Wei, X.B. Yin, X.W. He, pH-mediated dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis determination of phenol and m-nitrophenol, *J. Chromatogr. A.* 1202 (2008) 212–215.

[23] J. Barek, A. Berka, H. Skokánková, Oxidation of organic substances by compounds of trivalent manganese: XXV. Determination of benzene polyhydroxy and aminohydroxy derivatives with a standard solution of the fluoride complex of trivalent manganese, *Microchem. J.* 28 (1983) 308–313.

[24] J. Forshed, F.O. Andersson, S.P. Jacobsson, NMR and Bayesian regularized neural network regression for impurity determination of 4-aminophenol, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 495–505.

[25] E. Valero, P. Carrion, R. Varon, F. Garcia–Carmona, Quantification of acetaminophen by oxidation with tyrosinase in the presence of Besthorn's hydrazone, *Anal. Biochem.* 318 (2003) 187–195.

[26] S.Y. Sheikheldin, T.J. Cardwell, R.W. Catrall, M.D.L. de Castro, S.D. Kolev, Determination of phenol in water by pervaporation–flow injection analysis, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 9–16.

[27] M.A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse, A. Chtaini, Electrochemical determination of *para*-nitrophenol at apatite-modified carbon paste electrode:

Application in river water samples, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 323–328.

[28] O. Agrawal, V. K. Gupta, Sub-parts-per-million spectrophotometric determination of phenol and related pesticides using diazotized *p*-aminoacetophenone, *Microchem. J.* 62 (1999) 147–153.

[29] M. S. Nezio, M. F. Pistonesi, W. D. Fragoso, M. J. C. Pontes, H. C. Goicoechea, M. C. U. Araújo, B. S. F. Band, Successive projections algorithm improving the multivariate simultaneous direct spectrophotometric determination of five phenolic compounds in sea water, *Microchem. J.* 85 (2007) 194–200.

[30] M. Manera, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Multi-syringe flow injection solid-phase extraction system for on-line simultaneous spectrophotometric determination of nitro-substituted phenol isomers, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 41–49.

[31] M. Shaghghi, J.L. Manzoori, A. Jouyban, Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method, *Food Chem.* 108 (2008) 695–701.

[32] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton, Standard methods for the examination of water and wastewater, twentieth ed., American Public Health Association, Washington DC, 1999.

[33] M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, A novel micellar medium using

triblock copolymer for cobalt determination, *Anal. Sci.* 21 (2005) 933–937.

[34] P. Nagaraj, J.M. Bhandari, B.N. Achar, Rapid spectrophotometric determination of trace amounts of phenol, *Indian J. Chem.* 32A (1993) 641–643.

[35] C. Kang, Y. Wang, R. Li, Y. Du, J. Li, B. Zhang, L. Zhou, Y. Du, A modified spectrophotometric method for the determination of trace amounts of phenol in water, *Microchem. J.* 64 (2000) 161–171.

[36] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two phase system, *Talanta* 80 (2010) 1139–1144

[37] J.P. Martins, P.C. Carvalho, L.H.M. da Silva, J.S.R. Coimbra, M.C.H. da Silva, G.D. Rodrigues, L.A. Minim, Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 53 (2008) 238–241.

[38] X. Zeng, K. Osseo-Asare, Partitioning behavior of silica in the PEG/dextran/H₂O aqueous biphasic system, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 226 (2003) 45–54.

[39] N.J. Bridges, K.E. Gutowski, R.D. Rogers, Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS), *Green Chem.* 9 (2007) 177–183.

- [40] G.D. Rodrigues, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Liquid liquid extraction of metal ions without use of organic solvent, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 687–693.
- [41] J.P. Martins, A.B. Mageste, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, P.R. Patricio, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 2891–2894.
- [42] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, R.A.N. de Aquino, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as driving force for partitioning of the $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 23540–23546.
- [43] L.H.M da Silva, M.D.H. da Silva, J.A. Júnior, J.P. Martins, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Hydrophobic effect on the partitioning of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts, *Sep. Purif. Technol.* 60 (2008) 103–112.
- [44] L.H.M da Silva, M.C.H. da Silva, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, $\text{EO}-[\text{M}(\text{CN})_5\text{NO}]^{x-}$ ($\text{M} = \text{Fe}, \text{Mn}$ or Cr) Interaction as Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: The Strong Effect of the Central Atom, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 11669–11678.

- [45] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7623–7629.
- [46] L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, R.C.S. de Sousa, J.P. Martins, G.D. Rodrigues, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Surface excess enthalpy of PEO + salt + water and L35 + salt + water aqueous two-phase systems, *J. Chem. Eng. Data* 54 (2009) 531.
- [47] V.G. Lacerda, A.B. Mageste, I.J.B. Santos, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Separation of Cd and Ni from Ni-Cd batteries by an environmentally safe methodology employing aqueous two-phase systems, *J. Power Sources* 193 (2009) 908–913.
- [48] L.H.M. Silva, W. Loh, Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran), *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069–10073.
- [49] C. Terashima, T.N. Rao, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, Electrochemical Oxidation of Chlorophenols at a Boron-Doped Diamond Electrode and Their Determination by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection, *Anal. Chem.* 74 (2002) 895–902.
- [50] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, fourth ed., Prentice Hall, 2000.