

YARA LUIZA COELHO

**NOVAS DESCOBERTAS SOBRE A PARTIÇÃO DE CORANTES
FENOTIAZÍNICOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Coelho, Yara Luiza, 1990-
C672n Novas descobertas sobre a partição de corantes
2016 fenotiazínicos em sistemas aquosos bifásicos / Yara
Luiza Coelho. - Viçosa, MG, 2016.
xii, 70f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Luis Henrique Mendes da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Compostos heterocíclicos - Síntese.
2. Fenotiazina. 3. Termodinâmica. 4. Sistemas
aquosos bifásicos. 5. Partição de fases. 6. Corantes.
7. Força motriz. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação
em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 574.59

YARA LUIZA COELHO

**NOVAS DESCOBERTAS SOBRE A PARTIÇÃO DE CORANTES
FENOTIAZÍNICOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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: 18 de fevereiro de 2016.

Alvaro Vianna Novaes de Carvalho
Teixeira

Sukarno Olavo Ferreira

Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

Dedico esta conquista
À minha mãe Sonia, ao meu pai Fernando e
Às minhas irmãs Márcia, Cláudia, Karla e Valéria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica pela infraestrutura para desenvolver o projeto e meu mestrado.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro. Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

Agradeço imensamente ao meu orientador professor Luis Henrique Mendes da Silva, pela oportunidade, orientação, incentivo e valorosa sabedoria. Sua dedicação e postura profissional e humana foi fonte de admiração e inspiração que fizeram deste trabalho uma atividade gratificante.

À professora Maria do Carmo Hespanhol da Silva, por todos os ensinamentos e orientação.

À minha Mãe, Sonia, por ser tudo em minha vida! Agradeço pelo amor, carinho, generosidade, e por me transmitir paz.

Ao meu Pai, Fernando, pelo exemplo de vencedor que representa.

Às minhas irmãs, por nunca me abandonarem! Pela preocupação, suporte e apoio sempre que precisasse.

Aos meus sobrinhos João e Luiz, pelo carinho, e por tantos favores prestados.

Ao Ronan, pela dedicação, amor, paciência e por tantos momentos privados em prol das minhas realizações. Sem o seu apoio e incentivo jamais teria conseguido.

À Pamela, pela fundamental contribuição na realização deste trabalho, e por tantos ensinamentos profissionais e pessoais. Sua amizade e generosidade fizeram meus dias mais felizes!

Ao Guilherme e Gabriel, pelo aporte experimental e conceitual, e por tantos ensinamentos no decorrer desses dois anos.

Aos integrantes do Grupo QUIVECOM pelo apoio.

Aos amigos Isabelle, Luiz, Francielle, Agatha, Mariane e Jussara, pelas experiências compartilhadas e pelas discussões que muitas vezes foram fontes de inspiração para superar as barreiras e desafios encontrados pelo caminho.

Aos professores Alvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Sukarno Olavo Ferreira, por aceitarem o convite para participar da defesa desta dissertação.

Por fim, agradeço infinitamente a Deus, por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Corantes fenotiazínicos.....	2
2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos	9
2.2.1 Termodinâmica de partição de solutos em SABs.....	13
2.2.2 Modelo de Johansson <i>et al.</i> (1998) contribuição entálpica e entrópica sob o coeficiente de partição (K).....	17
2.3 Fundamentação teórica para determinação da entalpia de transferência e entalpia de excesso	21
2.3.1 Termodinâmica de mistura	21
2.3.2 Entalpia de excesso.....	25
2.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	30
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2: New insights about phenothiazine dyes partitioning in aqueous two-phase systems.	42
ABSTRACT	42
1 INTRODUCTION.....	43
2 EXPERIMENTAL SECTION	44
2.1 Materials	44
2.2 Preparation of aqueous two-phase systems and determination of dyes (MB, AZA, AZB and TA) partition coefficients	44
2.3 Thermodynamic parameters of dyes transfer	46
2.3.1 Dyes transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G_o$).....	46
2.3.2 Dyes transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_o$)	46
2.3.3 Dyes transfer standard entropy change ($\Delta_{tr}S_o$)	47
2.4 Measurement of fluorescence spectra	47

3 RESULTS AND DISCUSSION	48
3.1 Dependence of the partition coefficient with the concentration of methylene blue	48
3.2 Phenothiazine dyes partition thermodynamic.....	50
3.3 Cation effect on phenothiazine dyes partition behavior	61
3.4 Anion effect on the phenothiazine dyes partition behavior.....	63
4 CONCLUSION.....	66
REFERENCES.....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estruturas químicas dos corantes AM, AZA, AZB e AT.....	3
Figura 2. Espectros dos corantes (a) AM, (b) AZB, (c) AZA, (d) AT.....	4
Figura 3. Espectros de absorção do monômero e do dímero de azul de metileno	5
Figura 4. Dimerização do AM	5
Figura 5. Espectros de absorção de soluções aquosas de AM em diferentes concentrações	6
Figura 6. Espectros de emissão de fluorescência de soluções aquosas de AM em diferentes concentrações a 25°C.....	7
Figura 7. Representação gráfica dos orbitais moleculares HOMO e LUMO para os corantes catiônicos AM e TN	9
Figura 8. Composição do SAB formado por poli(óxido de etileno) 1500 g mol ⁻¹ (PEO 1500) + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O á 25°C.....	11
Figura 9. Representação esquemática do diagrama de fases retangular de um SAB.....	12
Figura 10. Descrição do Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC)	32
Figura 11. Termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).....	33

CAPÍTULO 2

Figure 1. Chemical structures of phenothiazine dyes	44
Figure 2. Methylene blue K values as function of its total concentration in PEO 1500 + H ₂ O + Li ₂ SO ₄ ATPS in 5th TLL and 298.15 K.....	48

Figure 3. Emission spectra of different concentrations of MB (λ_{ex} 620 nm) in top (a) and bottom (b) phases of 5th TLL (51.67 % w/w) PEO 1500 + H ₂ O + Li ₂ SO ₄ , at 298.15 K	49
Figure 4. Maximum fluorescence intensity of MB versus its concentration in (a) top phase and the (b) bottom phase of 5th TLL PEO 1500 + H ₂ O + Li ₂ SO ₄ ATPS, at 298.15 K	50
Figure 5. Partition coefficient of phenothiazine dyes versus TLL in PEO 1500 + MgSO ₄ + H ₂ O, at 298.15 K	51
Figure 6. Phenothiazine dyes $\Delta_{\text{tr}}G^o$ as function of the TLL for PEO 1500 + MgSO ₄ + H ₂ O ATPS, at 298.15 K	52
Figure 7. K (a) and $\Delta_{\text{tr}}G^o$ (b) values for phenothiazine dyes versus TLL in PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O ATPS, at 298.15 K	53
Figure 8. Phenothiazine H_{dye}^E as a function of the [dye] measured at 298.15 K	54
Figure 9. H_{dye}^E values of dyes MB (a, b), AZB (c, d) and AZA (e, f) as function of [dye], in top (a, c, e) and bottom (b, d, f) phases for PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O ATPS: (○) 1th TLL, (▲) 2th TLL, (■) 3th TLL, (●) 4th TLL, (▼) 5th TLL	56
Figure 10. $\Delta_{\text{tr}}H^o$ of phenothiazine dyes versus TLL for PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O ATPS, at 298.15 K	59
Figure 11. Phenothiazine dyes $\Delta_{\text{tr}}S^o$ versus TLL for PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O ATPS, at 298.15 K	60
Figure 12. Cation effect on K values for the MB, AZB, AZA and TA partition in the PEO 1500 + MgSO ₄ + H ₂ O (●), H ₂ O PEO 1500 + Na ₂ SO ₄ + H ₂ O (■), and PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O (▲) ATPSs, at 298.15 K	62

Figure 13. Anion effect on K values for the MB, AZB, and AZA partition in the PEO
1500 + Na₂C₄H₄O₆ + H₂O (●), PEO 1500 + Na₃C₆H₅O₇ + H₂O (■), and
PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O (▲) ATPSs, at 298.15 K.....64

RESUMO

COELHO, Yara Luiza. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016.
NOVAS DESCOBERTAS SOBRE A PARTIÇÃO DE CORANTES FENOTIAZÍNICOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS. Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) têm provado ser um método eficiente e ambientalmente seguro para a extração de muitas espécies químicas. No entanto, a termodinâmica de partição de solutos nesses sistemas ainda é pouco compreendida. Há poucos estudos que trazem um enfoque termodinâmico que contribua para compreensão das forças motrizes que regem o processo de transferência de solutos em SABs. Uma abordagem estratégica para estudar as forças que determinam a partição é a utilização de compostos químicos com estruturas químicas semelhantes, como sondas moleculares, para através da termodinâmica compreender a relação existente entre a estrutura e a partição destes compostos. O azul de metileno (AM), azure A (AZA), azure B (AZB) e acetato de tionina (AT) são corantes catiônicos que apresentam o mesmo grupo central fenotiazínico, se diferenciando apenas no número de substituintes metila. Essas características podem fornecer informações úteis sobre os fatores que governam a partição destes compostos em SABs. Neste trabalho, um estudo termodinâmico completo do comportamento de partição dos corantes (MB), (AZB), (AZA) e (TA) foi investigado utilizando os SABs: PEO 1500+MgSO₄+H₂O; PEO 1500+Na₂SO₄+H₂O; PEO1500+Li₂SO₄+H₂O. Os parâmetros termodinâmicos de transferência, tais como a variação da energia livre de Gibbs padrão de transferência ($\Delta_{tr}G^0$), a variação da entalpia padrão de transferência ($\Delta_{tr}H^0$) e a variação da entropia padrão de transferência ($\Delta_{tr}S^0$), e sua dependência com a estrutura do corante, natureza do eletrólito e comprimento da linha de amarração (CLA) foram avaliados. Além disso, as energias entálpicas de interação corante-PEO e corante-SAL foram determinadas. Pela primeira vez, foi descoberto que cátions se concentram preferencialmente na fase enriquecida em polímero dos SABs, com valores de K entre 6,16 e 225, 60 e valores de $\Delta_{tr}G^0$ compreendidos entre -4,16 kJ mol⁻¹ a -13,47 kJ mol⁻¹. O processo de transferência dos corantes fenotiazínicos foi entálpicamente dirigido, $-11,40 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}H^0 < -51,24 \text{ kJ mol}^{-1}$, resultante das interações específicas atrativas corante-PEO e interações repulsivas corante-Sal, e ocorreram mesmo com um decréscimo entrópico do sistema ($-4,93 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} < T\Delta_{tr}S^0 < -38,78 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). A diferença na estrutura química dos corantes teve um efeito pouco pronunciado sobre os valores das energias

entálpicas de interação corante-PEO e corante-Sal, mostrando que essa interação é promovida principalmente pelo anel condensado do corante. Também foi observado que o processo de partição dos corantes fenotiazínicos é dependente da linha de amarração e natureza do ânion, entretanto pouco influenciado pela natureza do cátion.

ABSTRACT

COELHO, Yara Luiza Coelho. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2016.
NEW INSIGHTS ABOUT THE PARTITION OF PHENOTHIAZINES DYES IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS. Advisor: Luis Henrique Mendes da Silva.
Coadvisor: Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Aqueous two-phase systems (ATPSs) have proven to be an efficient and environmentally safe method for extraction of chemical species. However, the solutes partition phenomenon in these systems is still little understood. There are few studies carrying a thermodynamic focus that contributes for the understanding of the driving forces governing solute transfer in ATPSs. A strategic approach for studying it is to use chemical compounds with similar chemical structures, as molecular probes, for comprehending thermodynamically the relationship between the structures and partition these compounds. The methylene blue (MB), azure A (AZA), azure B (AZB) and thionine acetate (TA) are cationic dyes that have the same phenothiazine core group and differ only in the number of methyl substituents. These characteristics may provide useful information about the factors that govern the partition process of these compounds in ATPSs. In this paper, the thermodynamic partition behavior of MB, AZA, AZB and TA dyes was investigated using the following ATPSs: PEO 1500 + MgSO_4 + H_2O ; PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O ; PEO1500 + Li_2SO_4 + H_2O . Standard transfer parameters such as free energy change of transfer ($\Delta_{\text{tr}}G^\circ$), enthalpy change of transfer ($\Delta_{\text{tr}}H^\circ$), entropy change of transfer ($\Delta_{\text{tr}}S^\circ$) and its dependence on the dye structure, electrolyte nature and tie line length (TLL) were evaluated. Besides, the dye-PEO enthalpy energy interaction and dye-salt interaction were determined. For the first time cations were discovered to concentrate in the polymer enriched phase, with K values ranging from 6.16 to 225.60, and $\Delta_{\text{tr}}G^\circ$ values ranging from 4.16 to -13.47 kJ mol^{-1} . The transfer process of phenothiazine dyes was enthalpy driven, with -11.40 $\text{kJ mol}^{-1} < \Delta_{\text{tr}}H^\circ < -51.24 \text{ kJ mol}^{-1}$, resulting from specific attractive dye-PEO interactions and repulsive dye-salt interactions, occurring even with a system entropy decrease ($-4.93 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} < T\Delta_{\text{tr}}S^\circ < -38.78 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). The dyes chemical structure differences had insignificant effect on the dye-PEO and dye-salt enthalpy interaction energy values, showing that interactions in these systems are mainly promoted by the dye condensed ring. It was also observed that the phenothiazine dyes

partition process is dependent of tie line and nature of the anion, however, little influenced by the cation nature.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) consistem em um método separação líquido-líquido de grande eficácia e simplicidade, além disso são constituídos principalmente por água, tendo como demais componentes, polímero e sal, que por vez, são atóxicos, biodegradáveis e de baixo custo¹. Desde 1958, com o trabalho pioneiro de Albertson², estes sistemas vêm sendo utilizados na extração e purificação de um grande número de espécies químicas, tais como enzimas³, proteínas^{4,5}, metais⁶, nanopartículas⁷, nanotubos de carbono⁸, corantes sintéticos^{9,10} e naturais^{11,12}. Entretanto, as forças motrizes que dirigem a distribuição destes diferentes solutos nos SABs ainda são pouco estabelecidas, sobretudo, porque existem poucos trabalhos fundamentados na termodinâmica de partição. Dessa forma, compreender os parâmetros termodinâmicos que regem o processo de transferência nestes sistemas é fundamental para otimizar sua aplicação.

Uma abordagem estratégica para estudar as forças motrizes que determinam a partição consiste em utilizar compostos químicos com estruturas parecidas como sondas moleculares para, através da termodinâmica, compreender qual a relação entre a estrutura e o comportamento de partição destas espécies. Os corantes fenotiazínicos, azul de metileno (AM) e seus derivados, azure A (AZA), azure B (AZB) e acetado de tionina (AT), são estruturalmente semelhantes, possuem estruturas compostas por um sistema de anel aromático tricíclico planar que se difere apenas no número de substituintes metilo, são solúveis em água, e apresentam coeficientes de absorvidade molar elevados, o que possibilita serem estudados como sondas na investigação do processo de partição, fornecendo informações úteis sobre os fatores que regem a transferência de cátions em sistemas aquosos bifásicos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento de partição dos corantes AM, AZA, AZB e AT em diferentes SABs formados por poli (óxido de etileno) + sal + água, avaliando o efeito do comprimento de linha de amarração (CLA) e a natureza do eletrólito sobre o processo de transferência destes corantes. Além disso, foram determinados os parâmetros termodinâmicos de transferência como a variação da energia livre de Gibbs padrão de transferência ($\Delta_{tr}G^0$), a variação da entalpia padrão de transferência ($\Delta_{tr}H^0$) e a variação da entropia padrão de transferência ($\Delta_{tr}S^0$), com o

objetivo de conhecer as forças motrizes que dirigem o processo de partição destes compostos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Corantes fenotiazínicos

Os corantes, azul de metileno (AM), azure A (AZA), azure B (AZB) e acetato de tionina (AT) pertencem ao grupo dos corantes fenotiazínicos, são catiônicos, não tóxicos, e solúveis em água (20 - 40 g L⁻¹ em água a 20°C). Historicamente estes corantes foram inicialmente utilizados em tinturarias e indústrias têxteis, para o tingimento de lãs, algodão, e coloração de papel. Com o decorrer dos anos novas aplicações em diversas áreas foram descobertas, sendo as principais na medicina, biologia e química^{13,14,15}.

O AM é utilizado como um indicador de oxidação-redução na química, e na biologia como um sensibilizador na foto-oxigenação e como um trocador de elétrons com efeito fotogalvânico. Possui várias aplicações medicinais tais como, tratamento de infecções do trato urinário, distinção entre tecido canceroso e normal, sonda de sistema micro-heterogêneo e inativação de microorganismos^{16,17,18}. Já os corantes AZA e AZB vem sendo utilizados principalmente para coloração de substratos em estudos biológicos e na medicina como materiais fotossensibilizantes em terapias fotodinâmicas, atividade antimalárica e efeito foto-quimioterápico contra carcinomas^{13,19,20}.

Apesar de suas diversificadas aplicações, estes corantes têm atraído a atenção de muitos cientistas não somente por seus usos práticos, mas pelas propriedades físico-químicas únicas que exibem em solução^{13,21,22}.

Bernthsen em 1885 estabeleceu pela primeira vez a estrutura química do Azul de metileno. Posteriormente AZA e AZB foram obtidos a partir da forma impura do azul de metileno, quimicamente formados por meio de sua oxidação²³. Estes corantes são estruturalmente semelhantes, possuindo configurações compostas por um sistema de anel aromático tricíclico planar que constitui um sistema altamente conjugado, funcionando como cromóforo destas moléculas, e dois grupos aminos doadores de elétrons¹³. Suas estruturas são mostradas na Figura 1.

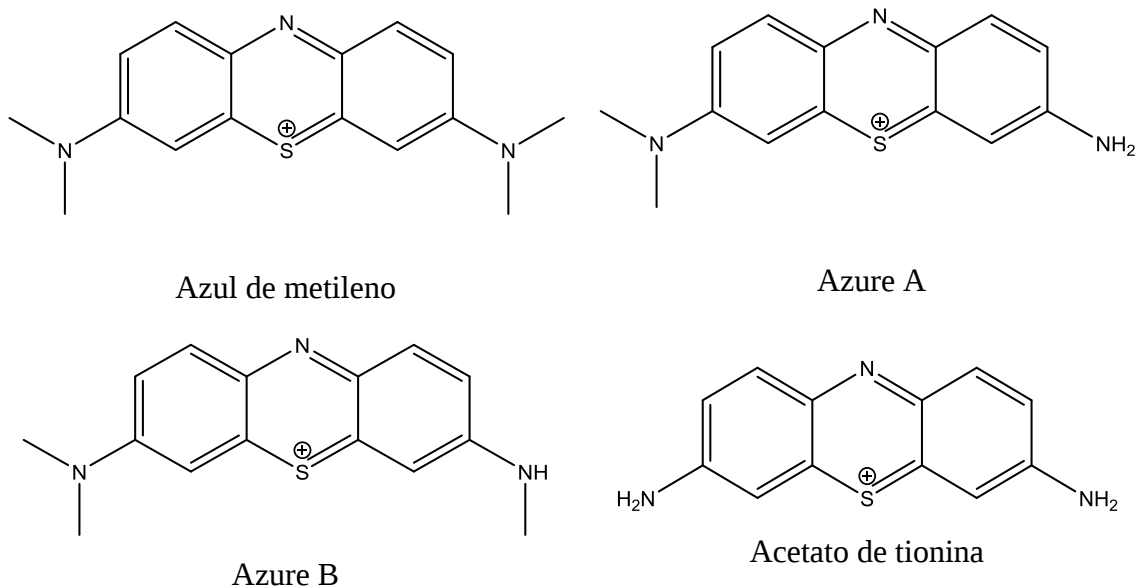


Figura 1. Estruturas químicas dos corantes AM, AZA, AZB e AT.

As propriedades espectrais dos corantes fenotiazínicos são conhecidas como sendo sensíveis ao seu ambiente e concentração²⁴. Os corantes AM, AZB, AZA e AT possuem coeficientes de absorvidade molar elevados, e em soluções aquosas diluídas apresentam uma banda máxima de absorção em aproximadamente 664, 652, 637 e 604 nm respectivamente, correspondente à forma monomérica dos corantes (Figura 2). No caso do AM o espectro apresenta um ombro em torno de 610 nm, que neste caso é atribuído apenas à resolução vibracional de uma única banda eletrônica, correspondente a uma transição com acoplamento vibracional, característico do corante²⁵.

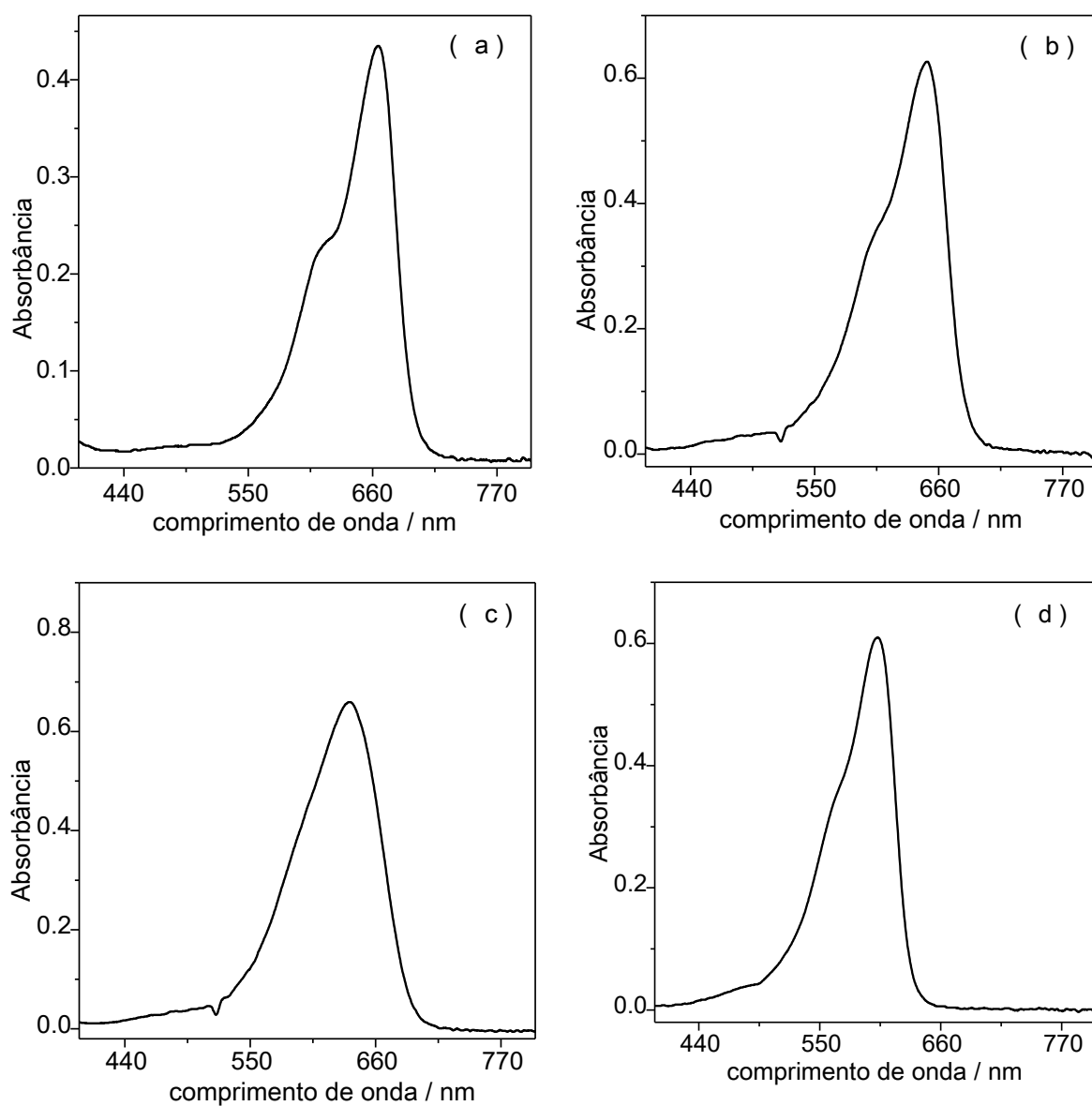


Figura 2. Espectros dos corantes (a) AM, (b) AZB, (c) AZA, (d) AT.

O aumento gradativo da concentração dos corantes no meio ocasiona uma diminuição na intensidade de absorção no comprimento de onda correspondente aos monômeros, e o aparecimento de uma nova banda, figura 3.

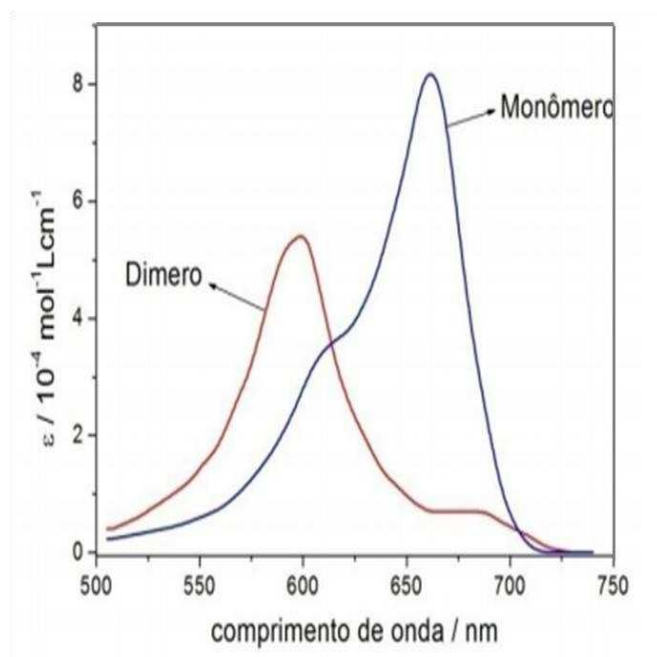


Figura 3. Espectros de absorção do monômero e do dímero de azul de metileno²⁶.

É possível observar claramente que para o AM a curva de absorbância x [AM] não segue a relação linear que a lei de Beer-Lambert prevê quando as concentrações do corante não são altas. Esse comportamento é atribuído principalmente à interação de elétrons π entre os anéis aromáticos de duas moléculas de AM, formando um sanduíche, também chamado de dímero²⁷, como mostra a Figura 4.

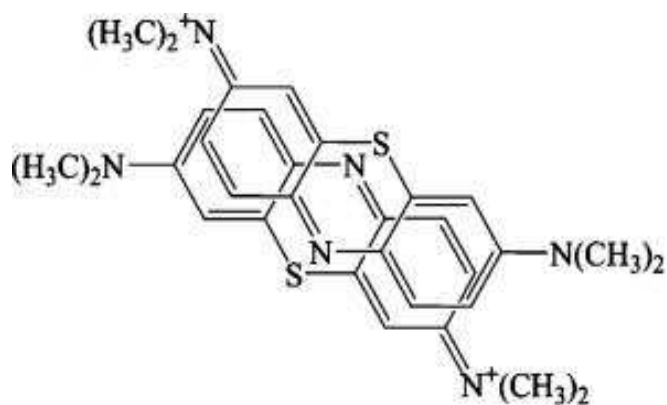


Figura 4. Dimerização do AM.

No processo de dimerização do AM parece ocorrer uma compensação entálpica-entrópica quando moléculas do corante em solução se estruturam passando de monômeros para dímeros^{22,28,29,30}. Contudo, a tendência que estes corantes apresentam

em se agregarem em solução não pode ser atribuída a uma única força. Em geral estão envolvidas forças de van der Waals, ligações de hidrogênio intermoleculares, ligações de hidrogênio com o solvente e interações hidrofóbicas de dispersão e de elétrons π , sendo muitas vezes difícil avaliar a contribuição individual das forças envolvidas neste fenômeno^{31,32,33}.

A dimerização envolve mudanças nos estados eletrônicos fundamental e excitado das moléculas de corante. O processo transição entre os novos níveis eletrônicos provocam modificações nos espectros de absorção, resultando em bandas em comprimentos de onda diferentes, como está ilustrado na Figura 5, que mostra os espectros do azul de metileno em diferentes concentrações em solução aquosa^{26,34,35}.

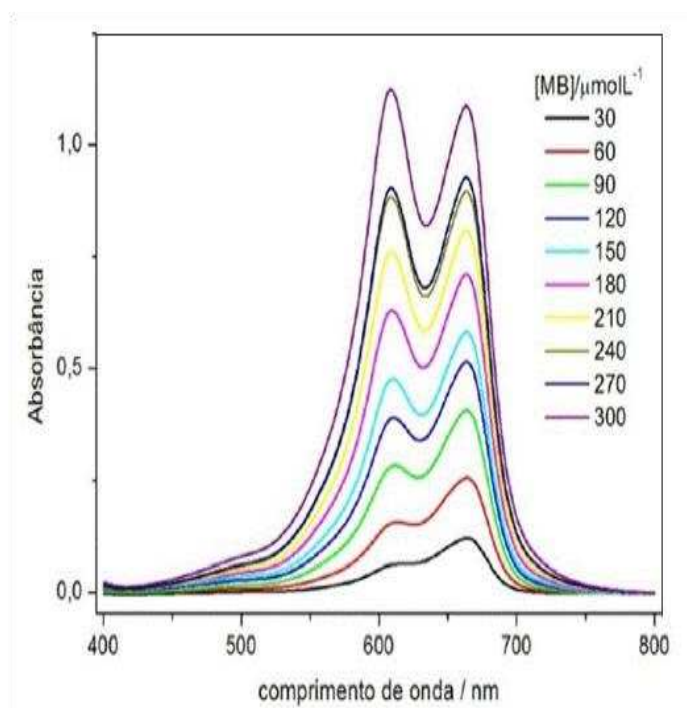


Figura 5. Espectros de absorção de soluções aquosas de AM em diferentes concentrações³⁶.

À medida que a concentração de AM vai se tornando maior, é possível observar outras bandas em torno de 580 nm, que são atribuídas a processos eletrônicos de formação de trímeros e agregados maiores. Este comportamento pode ser observado para praticamente todos os corantes com estruturas químicas similares ao azul de metileno, como os corantes azure A e azure B³⁰.

As propriedades espectroscópicas do AM, AZA, AZB e AT vão além da capacidade de absorverem luz. Estes corantes são moléculas fluorescentes que exibem espectros de emissão no comprimento de onda de 600-750 nm, com intervalo máximos

em 684, 645 e 662 nm, respectivamente, quando excitado a 620, 632 e 648 nm respectivamente^{25,20,13,21,37}. Contudo é importante ressaltar que a capacidade florescente destas espécies se restringe aos monômeros, uma vez que a autoagregação destes corantes provoca o *quenching* de sua fluorescência^{30,38,39}. A Figura 6 mostra a supressão de fluorescência e deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão dos monômeros de AM em virtude da formação de dímeros e agregados maiores, provenientes do fenômeno de agregação do corante em virtude do aumento de sua concentração no meio.

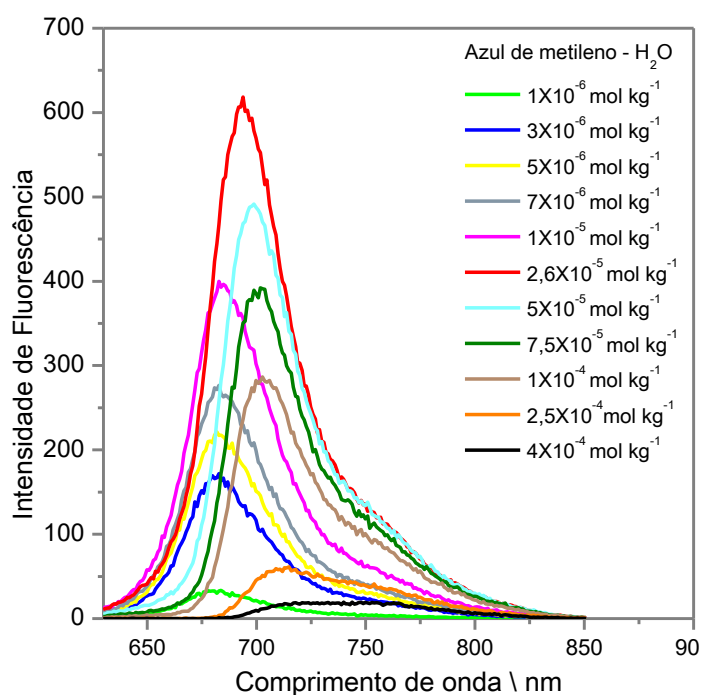


Figura 6. Espectros de emissão de fluorescência de soluções aquosas de AM em diferentes concentrações a 25°C.

O espectro de emissão mostra as intensidades de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão, em nanômetros Figura 6. Ele representa a transição do nível vibracional mais baixo do primeiro estado excitado para o estado fundamental. O comportamento de tais espectros é altamente sensível à estrutura química dos fluoróforos e a polaridade do solvente no qual são dissolvidos⁴⁰.

Estudos teóricos que busquem caracterizar as propriedades espectroscópicas e eletrônicas dos diferentes corantes estudados são de fundamental importância para elucidar as forças motrizes que regem a partição destas espécies em sistemas aquosos bifásicos, bem como os aspectos que determinam seus diferentes comportamentos no meio.

Yates e Patel estudaram alguns corantes catiônicos, dentre eles o azul de metileno (AM) e o tionina (TN) em suas formas carregadas, utilizando métodos quânticos semiteóricos. Estes corantes apresentam uma cadeia aromática principal idêntica, e os radicais substituintes diferentes, os grupos CH_3 da estrutura do AM são substituídos por átomos de H. Neste trabalho o autor analisou as variações da geometria, do calor de formação, do potencial de ionização, do momento de dipolo e das cargas atômicas em função das diferenças nas estruturas dos corantes. Entre suas descobertas tem-se que o átomo de enxofre é o responsável pelas diferenças geométricas do anel central, no entanto ambos os corantes apresentam estruturas planares; e que a carga dos corantes fenotiazínicos se concentra sobre o átomo de enxofre⁴¹.

Posteriormente Mello também utilizou métodos de química quântica para estudar as propriedades eletrônicas e o espectro de absorção de seis corantes catiônicos, entre eles o (AM) e (TN). A princípio, foi realizado um estudo para verificar a influência do solvente na geometria e no espectro desses corantes. As otimizações realizadas utilizando métodos teóricos forneceram estruturas planares para todos os corantes estudados. Foram obtidas geometrias muito semelhantes, com apenas pequenas diferenças que apareceram em torno do heteroátomo enxofre do anel central (C-S-C), resultados estes semelhantes aos obtidos por Yates e Patel. As estruturas dos corantes em meio aquoso apresentaram o ângulo formado entre os dois carbonos e o heteroátomo (C-S-C) menor do que as respectivas estruturas obtidas no vácuo. Quando esse ângulo se torna menor, o heteroátomo fica mais exposto ao solvente, aumentando a interação enxofre-solvente e a estabilização do soluto³³.

Na sequência, segundo o mesmo autor, foram calculadas as energias de excitação no vácuo e em meio aquoso para as estruturas dos corantes obtidas anteriormente. O corante TN apresentou máximos de absorção deslocados em cerca de 50 nm em relação ao AM. Os dados teóricos demonstraram que a substituição dos grupos CH_3 por átomos de H na estrutura dos corantes acima descritos, tem um efeito muito menor nos comprimentos de absorção calculados do que nos experimentais. Para procurar explicar essa diferença de comportamento, foram analisados os orbitais moleculares que mais contribuem para a transição eletrônica, que são os orbitais HOMO (último orbital molecular ocupado) e o LUMO (primeiro orbital molecular desocupado). A representação gráfica desses orbitais (Figura 7) mostra que os grupos metila do AM possuem pequena contribuição tanto ao orbital HOMO quanto LUMO. E a diferença nos comprimentos de absorção calculados, em relação aos observados

experimentalmente foi atribuída a diferente solvatação dos grupos metila nas moléculas maiores em relação àquela dos átomos de hidrogênio nas moléculas menores³³.

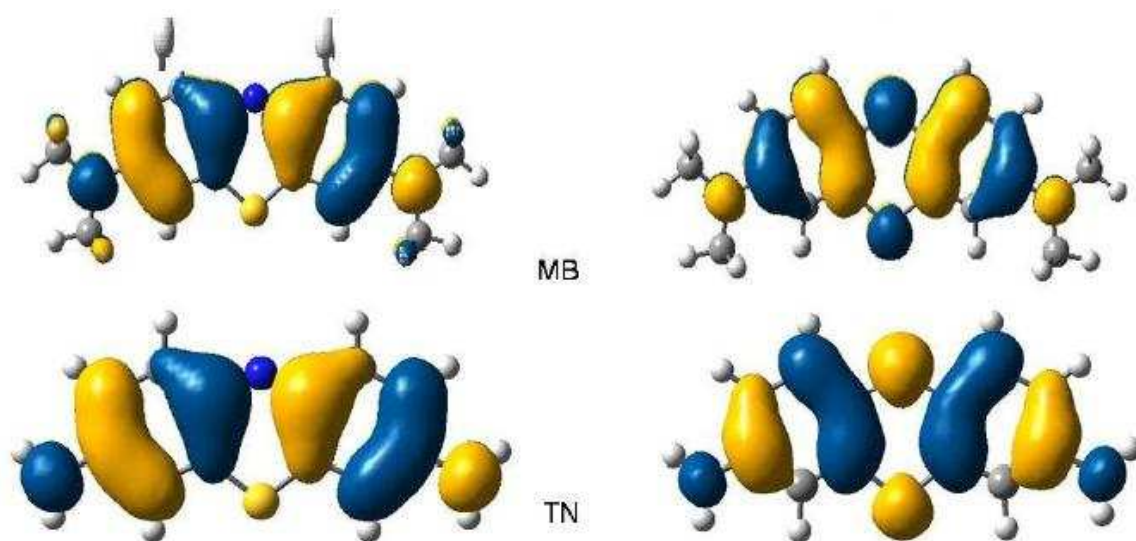


Figura 7. Representação gráfica dos orbitais moleculares HOMO e LUMO para os corantes catiônicos AM e TN³³.

Quintão e colaboradores utilizaram alguns métodos teóricos semi-empíricos para estudar três diferentes clusters de azul de metileno com uma molécula de água, com o objetivo de esclarecer a influência das ligações de hidrogênio nas propriedades espectroscópicas do corante. Os autores concluíram que o corante faz múltiplas ligações de hidrogênio com a água atuando como aceitadora de prótons. Porém, essa interação pouco influencia nos espectros de infravermelho e de absorção, o que indica a estabilidade da molécula do corante⁴².

2.2 Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) são sistemas heterogêneos formados por duas fases ricas em água, com diferentes composições e em equilíbrio termodinâmico, obtidas espontaneamente quando dois polímeros quimicamente distintos, solúveis em água, tais como poli(óxido de etileno) (PEO) e dextrana, dois eletrólitos ou ainda um polímero e um eletrólito são dissolvidos em água em determinadas condições termodinâmicas específicas de temperatura, concentração e pressão⁴³.

O marco inicial do desenvolvimento dos SABs ocorreu em 1896 com os trabalhos pioneiros de Beijerinck em 1896. Segundo este autor, soluções aquosas formadas por gelatina e Agar ou gelatina e amido solúvel, em uma determinada faixa de

temperatura e concentração tornavam turvas e após alcançarem o equilíbrio termodinâmico separavam em duas fases imiscíveis e límpidas, possuindo a fase superior rica em gelatina, e a fase inferior em agar (ou amido), sendo a água o componente majoritário em ambas as fases⁴⁴.

Em meados da década de 1950, Albertsson propôs a utilização dos SABs como uma alternativa às técnicas de extração líquido-líquido tradicionais, ficando evidente para a academia a potencialidade de aplicação destes sistemas na partição e purificação de materiais biológicos^{2,45}. Diante destas descobertas, estudos que visam o desenvolvimento de novos SABs e a compreensão de suas propriedades termodinâmicas para posteriores aplicações vem sendo cada vez mais realizados^{11,46,10,9}.

Os SABs são considerados ambientalmente seguros por serem constituídos majoritariamente por água (60-90%), fornecendo várias vantagens sobre os métodos de extração convencionais, tais como biocompatibilidade, não inflamável, não volátil, simplicidade, não toxicidade, e potencial para aplicação em larga escala tanto nas separações industriais como em aplicações ambientais^{1,47,48}. A extração líquido-líquido utilizando SABs vem sendo utilizada para separar e purificar produtos biológicos, íons de metais⁶, corantes^{10,9}, moléculas de drogas, e pequenas espécies orgânicas⁴⁹, a partir das misturas complexas nas quais são produzidos.

Entre SABs adequados para separação de solutos, aqueles formados por polímero, eletrólito e água têm sido utilizados predominantemente devido ao seu baixo custo e baixa viscosidade, bem como curto tempo de separação⁴⁸. Estes SABs são compostos por uma fase rica em polímero, geralmente a fase superior (FS), e a outra fase rica em eletrólito, fase inferior (FI), como mostrado na Figura 8.

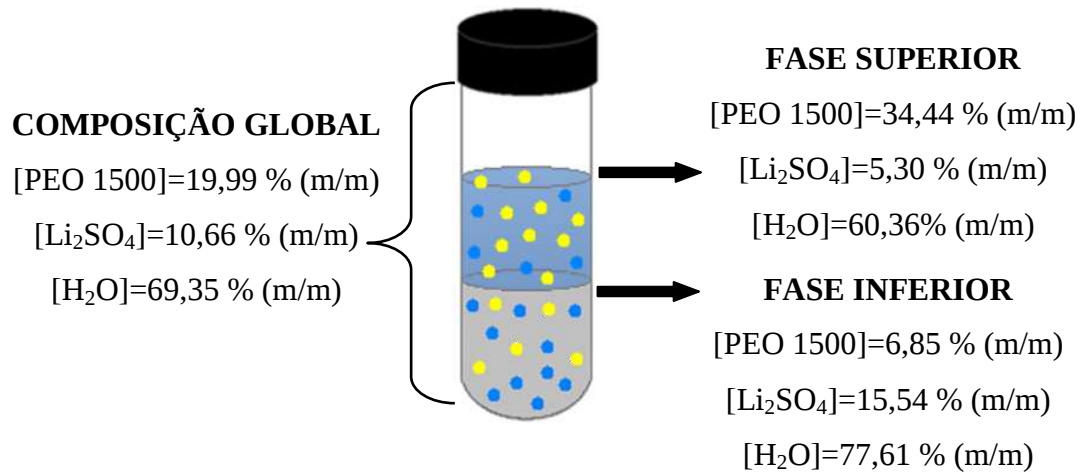


Figura 8. Composição do SAB formado por poli(óxido de etileno) 1500 g mol⁻¹ (PEO 1500) + Li₂SO₄+ H₂O á 25°C⁵⁰.

As propriedades termodinâmicas de um SAB dependem das interações intermoleculares presentes entre os componentes em solução, e das variações entrópicas resultantes do processo de mistura¹. Esse balanço pode ser representado em termos do parâmetro energia livre de Gibbs de mistura ($\Delta_{mix}G$), que expressa a diferença entre a energia livre de Gibbs da solução G_{sol} e o somatório da energia livre de Gibbs de cada componente quando puro G_i^* (Equação 1).

$$\Delta_{mix}G = G_{sol} - \sum_{i=1}^3 G_i^* = \sum_{i=1}^3 \mu_i n_i - \sum_{i=1}^3 \mu_i^* n_i = \sum_{i=1}^3 (\mu_i - \mu_i^*) n_i. \quad (1)$$

Onde, μ_i e μ_i^* , são os potenciais químicos do componente i na solução e puro respectivamente, e n_i é o número de mols do componente i.

Quando valores de ($\Delta_{mix}G < 0$) são obtidos, uma solução homogenia será formada, no entanto, se ($\Delta_{mix}G > 0$) o sistema buscará uma nova condição de menor energia livre de Gibbs, separando em fases, que posteriormente procurarão alcançar o equilíbrio termodinâmico¹.

As condições termodinâmicas que levam a formação de SABs, podem serem determinada utilizando o diagramas de fases de coordenadas retangulares (Figura 9).

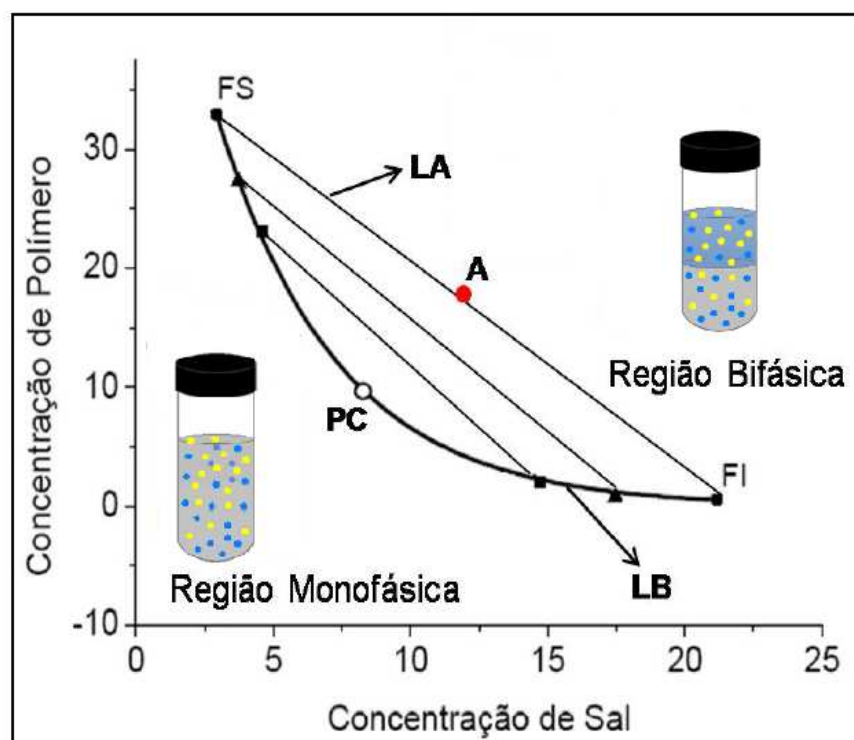


Figura 9. Representação esquemática do diagrama de fases retangular de um SAB.

Os diagramas de fases são representações gráficas que possibilitam prever a formação de um sistema bifásico ou um sistema monofásico, bem como a faixa de concentração em que estes processos ocorrem. Os dados de equilíbrio que neles são apresentados estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema, e auxiliam na compreensão dos fatores que governam a partição de solutos, como por exemplo um corante nos SABs⁴⁷.

Nestes diagramas a concentração do eletrólito é representada no eixo da abscissa, enquanto a concentração de polímero é representada no eixo da ordenada, cujos valores são expressos em % m/m. A fronteira entre a região monofásica e a região bifásica é delimitada pela Linha Binodal (LB), sua localização no diagrama é específica e depende dos componentes formadores do sistema como, massa molecular do polímero e do eletrólito formador, e das propriedades termodinâmicas como temperatura, pressão, pH, dentre outras. Na Binodal está localizado o ponto crítico (Pc), neste ponto, as concentrações e os volumes das fases são teoricamente iguais, sendo, portanto, impossível identificar a formação de fases distintas. As linhas de amarração (LA), são retas do digrama que unem as composições das fases em equilíbrio termodinâmico. Em uma mesma LA, todos os pontos sobre esta reta apresentam fases superior e inferior com mesmas propriedades termodinâmicas intensivas (composição, densidade, etc), no

entanto contém diferentes propriedades termodinâmicas extensivas (volume, massa, etc).

Por meio dos diagramas de fases é possível determinar o comprimento da linha de amarração (CLA), este parâmetro expressa a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio, e é calculado em função das diferenças nas concentrações dos componentes em cada fase, conforme indicado na Equação 2.

$$CLA = \left[(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2 \right]^{1/2}. \quad (2)$$

Em que C_P^S e C_P^I são as concentrações de polímero e C_S^S e C_S^I são as concentrações do sal (% (m/m)) nas fases superior e inferior, respectivamente. À medida que o valor do CLA aumenta, torna-se maior a diferença de composição entre as fases superior e inferior, o que favorece a extração e/ou partição do soluto de interesse, possibilitando desta forma, comparar a capacidade de extração ou de partição de dois ou mais sistemas que apresentam o mesmo valor de CLA¹².

2.2.1 Termodinâmica de partição de solutos em SABs

Quando um soluto qualquer, é adicionado a um sistema formado por dois líquidos imiscíveis em equilíbrio (SAB), o componente adicional se distribuirá entre as duas fases líquidas até que a razão de sua concentração em cada fase atingirá um determinado valor⁵¹, denominado coeficiente de partição (K), como definido pela Equação 3.

$$K = \frac{a_{FS}}{a_{FI}} \cong \frac{C_{FS}}{C_{FI}}. \quad (3)$$

Na qual, a e C fazem referência à atividade e à concentração do soluto nas fases. Os subscritos FS e FI representam a fase superior e inferior respectivamente do SAB. A aproximação na equação anterior só pode ser utilizada em um regime de diluição infinita do soluto no sistema, pois é quando os valores de concentração e atividade são muito próximos¹.

O coeficiente de partição (K) é definido como a razão entre as concentrações de equilíbrio de um composto não ionizável entre duas fases de uma mistura de dois

solventes imiscíveis. É um parâmetro termodinâmico associado a espécie química individuais, ou seja, o potencial químico de cada componente deverá ser investigado individualmente. É importante também adicionar ao SAB quantidades traços do soluto, de forma a assegurar o regime de diluição infinita, assumindo desta forma que as interações que ocorrem entre as próprias moléculas da espécie particionada sejam desprezíveis.

A base para o particionamento de solutos em SAB é um resultado direto de sua distribuição seletiva entre as duas fases, regido pela afinidade da molécula alvo para com uma determinada fase¹. Contudo, a partição é muito dependente das propriedades termodinâmicas do sistema e pode ser afetada por diferentes variáveis. Segundo Asenjo e Andrews as prováveis causas da partição de solutos em SABs podem ser listadas como⁵²:

- Diferença de hidrofobicidade: quando uma fase apresenta uma maior hidrofobicidade do que a outra e é usada para levar um soluto hidrofóbico para essa fase.
- Eletroquímica: Ocorre devido ao isolamento do soluto com carga elétrica definida em uma fase, ocasionado por uma ampla diferença de potencial elétrico entre fases.
- Tamanho do soluto: Ocorre um processo de exclusão molecular do soluto de uma fase por seu tamanho.
- Interações específicas: quando existem interações específicas entre o soluto e um componente presente majoritariamente em uma das fases.

Em um estudo de partição de um soluto em SABs é importante determinar qual das causas anteriores predomina em sua partição. Conhecer o mecanismo de partição do soluto nestes sistemas facilita desenvolver metodologias para aplicar SABs na extração e purificação em escala industrial⁵³.

De acordo com Brito, mesmo com inúmeros estudos e resultados de partição, ainda não se compreende totalmente as forças motrizes que governam o comportamento de partição de solutos em SABs⁵⁴. Portanto, com o intuito de melhor compreender e determinar as forças motrizes que provocam um dado processo termodinâmico, a análise do processo de interação em termos energéticos se faz necessário.

Ao adicionar um soluto em um SAB, como por exemplo, uma molécula de corante, o sistema sai da sua condição inicial de equilíbrio termodinâmico e busca um

novo estado de equilíbrio. Sendo assim, considerando que o sistema esteja em condições de temperatura e pressão constante o potencial termodinâmico dos componentes no sistema será a energia livre de Gibbs.

A variação da energia livre de Gibbs do sistema para cada etapa de transferência do soluto, será a soma do produto dos potenciais químicos (μ) de cada componente multiplicado pela variação infinitesimal do número de mols para cada componente formador do SAB (sal+polímero+água), mais a soma do potencial químico do corante vezes a variação infinitesimal do seu número de mols, durante o processo de transferência (Equação 4).

$$dG = \mu_{H_2O}^{FS} dn_{H_2O}^{FS} + \mu_{Sal}^{FS} dn_{Sal}^{FS} + \mu_P^{FS} dn_P^{FS} + \mu_C^{FS} dn_C^{FS} + \mu_{H_2O}^{FI} dn_{H_2O}^{FI} + \mu_{Sal}^{FI} dn_{Sal}^{FI} + \mu_P^{FI} dn_P^{FI} + \mu_C^{FI} dn_C^{FI}. \quad (4)$$

Onde, $\mu_{H_2O}^{FS}$, μ_{Sal}^{FS} , μ_P^{FS} e μ_C^{FS} refere-se aos potenciais químicos da água, sal, polímero e corante na fase superior, $\mu_{H_2O}^{FI}$, μ_{Sal}^{FI} , μ_P^{FI} e μ_C^{FI} são os potenciais químicos da água, sal, polímero e corante na fase inferior, e n o número de mols dos componentes água, sal, polímero e corante em ambas as fases.

Deste modo, considerando que o soluto não mude a composição das fases (regime de diluição infinita), a única maneira para que ocorra a transferência do soluto da fase superior para a fase inferior, em um SAB, será com a diminuição da variação da energia livre de Gibbs do sistema (Equação 5).

$$dG = (\mu_C^{FS} - \mu_C^{FI})dn. \quad (5)$$

Assim após ser atingida à nova condição de equilíbrio termodinâmico do sistema, a variação da energia livre de Gibbs ficará igual a zero, sendo assim, o potencial químico do soluto i na fase superior (μ_C^{FS}) ficará igual ao potencial químico do componente i na fase inferior (μ_C^{FI}), como mostra a Equação 6, 7 e 8 respectivamente.

$$dG = (\mu_C^{FS} - \mu_C^{FI})dn = 0. \quad (6)$$

$$\mu_C^{FS} - \mu_C^{FI} = 0. \quad (7)$$

$$\mu_C^{FS} = \mu_C^{FI}. \quad (8)$$

O potencial químico do soluto nas fases superior e inferior, podem ser descritos pelas Equações 9 e 10 abaixo relacionadas:

$$\mu_C^{FS} = \mu_C^0(FS) + RT \ln a_C^{FS}. \quad (9)$$

$$\mu_C^{FI} = \mu_C^0(FI) + RT \ln a_C^{FI}. \quad (10)$$

Onde $\mu_C^0(FS)$ e $\mu_C^0(FI)$ referem-se ao potencial químico padrão do corante C na fase superior e inferior respectivamente, e a_C^{FS} e a_C^{FI} são a atividade do corante C em cada uma das fases, R é a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta do sistema.

Deste modo, igualando as Equações 9 e 10 e rearranjando, obtém-se a Equação 11:

$$\mu_C^0(FS) - \mu_C^0(FI) = RT \ln \frac{a_C^{FS}}{a_C^{FI}}. \quad (11)$$

Nesta equação a diferença do potencial químico padrão do soluto “C” entre as fases superior e inferior é definida como a variação da energia livre de Gibbs de transferência ($\Delta_{Tr}G$), que corresponde à energia envolvida no processo de transferência de um mol da espécie química “C” da fase inferior para a fase superior do SAB, estando o soluto em regime de diluição infinita. Sabendo que a razão das atividades do soluto particionado em cada fase é igual a K (Equação 3), a equação acima pode ser reescrita conforme a Equação 12.

$$\Delta_{Tr}G = \mu_C^0(FS) - \mu_C^0(FI) = -RT \ln K. \quad (12)$$

Conhecendo a constante de partição do soluto em uma temperatura específica é possível determinar $\Delta_{Tr}G$, que por vez é dependente das interações intermoleculares e dos estados configuracionais dos componentes do sistema.

De posse dos valores $\Delta_{Tr}G$, os demais parâmetros termodinâmicos $\Delta_{Tr}H$ e $\Delta_{Tr}S$ devem ser obtidos afim de realizar uma análise termodinâmica completa

da partição dos corantes AM, AZA e AZB nos SABs. No processo de transferência destes corantes em um SAB, a variação de entalpia de transferência $\Delta_{Tr}H$, é uma função de estado que possibilita verificar em que fase está presente os componentes com os quais estes corantes apresenta interações intermoleculares mais favoráveis.

$\Delta_{Tr}H$, pode ser determinada medindo o coeficiente de partição dos corantes em diferentes temperaturas e aplicando a aproximação de Van't Hoff (Equação 13). Entretanto, apesar de sua ampla utilização, esta metodologia não é muito precisa, sobretudo em processos onde a temperatura tem uma influência no resultado⁵⁵.

$$\ln \left[\frac{K(T2)}{K(T1)} \right] \approx \frac{\Delta_{Tr}H}{R} \left(\frac{1}{T1} - \frac{1}{T2} \right). \quad (13)$$

Uma outra forma de se determinar $\Delta_{Tr}H$ de solutos é utilizando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Esta técnica permite a determinação direta e sem aproximações do valor da variação de entalpia de interação, como será abordado no tópico técnicas experimentais.

Consequentemente, $\Delta_{Tr}S$ pode ser obtido pela diferença entre a variação da energia entálpica de transferência e a variação de energia livre de Gibbs de transferência na respectiva temperatura em que foi determinado o valor de K, como mostrado pela Equação 14:

$$\Delta_{Tr}S = \frac{\Delta_{Tr}G - \Delta_{Tr}H}{T}. \quad (14)$$

2.2.2 Modelo de Johansson *et al.* (1998) contribuição entálpica e entrópica sob o coeficiente de partição (K)

As forças motrizes que dirigem a partição de solutos nos SABs podem ser interpretadas de um ponto de vista molecular por meio de modelos matemáticos, tal como o desenvolvido por Johansson e colaboradores⁵⁶. Estes autores sugeriram que o processo de partição de um soluto em um SAB, tal como um corante, pode ser dividido em contribuições entrópicas e entálpicas sob os valores de coeficiente de partição (K). Onde a contribuição entrópica está relacionada com o aumento ou redução do número de possibilidades de distribuir a espécie entre as fases superior e inferior do sistema, e a

contribuição entálpica está associada com as interações intermoleculares rompidas e formadas ao longo do particionamento do soluto.

Quando um corante se particiona entre as fases de um sistema aquoso bifásico, no equilíbrio termodinâmico $\mu_c^{FS} = \mu_c^{FI}$, onde μ_c^{FS} é o potencial químico do corante na fase superior e é dado pela Equação 15:

$$\mu_c^{FS} = \left(\frac{\partial \Delta G_{mix}^{FS}}{\partial n_c^{FS}} \right)_{T,P,n_c \neq n_j} = \mu_c^0 + RT \ln \phi_c^{FS} + (\mu_c^{ex})^{FS}. \quad (15)$$

Onde, μ_c^0 é o potencial químico do componente puro c , ΔG_{mix}^{FS} é a variação da energia livre de Gibbs da fase com c , n_c^{FS} é o número de mols de c na fase superior, ϕ_c^{FS} é a fração do soluto na fase (em que $\phi_c^{FS} = M_c n_c^{FS} / N$, sendo M_c o grau de polimerização e N o numero total de moléculas), e $(\mu_c^{ex})^{FS}$ é o excesso de potencial químico de c na fase superior. Se, no entanto, o corante é infinitamente diluído, pode-se assumir que a sua adição não irá alterar as composições das fases em equilíbrio. Isto simplifica em grande parte a análise. Sob tais condições, K pode ser determinado diretamente a partir do diagrama de fase livre de soluto, segundo a Equação 16.

$$\ln K = \ln \frac{\phi_c^{FS}}{\phi_c^{FI}} = \frac{1}{RT} [(\mu_c^{ex})^{FI} - (\mu_c^{ex})^{FS}]. \quad (16)$$

Em que $(\mu_c^{ex})^{FI}$ representa o excesso de potencial químico de c na fase inferior associado ao excesso de entropia de mistura dos componentes de formação das fases, e as interações não ideais entre os componentes na fase inferior (por exemplo, corante-polímero, polímero-solvente, etc...).

2.2.2.1 Contribuição entrópica ao coeficiente de partição (K)

Segundo o modelo proposto por Johansson *et al.* a energia livre de Gibbs de mistura é dada pela Equação 17.

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T \Delta S^C = NRT \sum_{i=1}^m \frac{\phi_i}{M_i} \ln \phi_i + N \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m \phi_i \phi_j w_{ij}. \quad (17)$$

Aplicando a Equação 15 na Equação 17, e assumindo que ΔH_{mix} é zero, encontra-se a contribuição entrópica para o potencial químico do soluto C:

$$\mu_C - \mu_C^0 = T \left(\frac{\partial \Delta S^c}{\partial n_C} \right)_{T,P,n_C \neq n_j} = RT \left[\ln \phi_C - \phi_C + 1 - M_p \sum_{C \neq j}^m \frac{\phi_j}{M_j} \right]. \quad (18)$$

O termo logarítmico $RT \ln \phi_C$, da equação 16, representa a variação ideal da entropia molar parcial quando ocorre o processo termodinâmico de mistura. Os três termos restantes representam o μ_C^{ex} na fase, conforme definido na Equação 15. O coeficiente de partição do soluto é, por conseguinte dado por:

$$\begin{aligned} \ln K_C &= -(\phi_C^{FS} - \phi_C^{FI} + M_C \left(\sum_{C \neq j}^m \frac{\phi_j^{FS}}{M_j} - \sum_{C \neq j}^m \frac{\phi_j^{FI}}{M_j} \right)) \\ &= M_C \left(\sum_{C \neq j}^m \frac{\phi_j^{FS}}{M_j} - \sum_{C \neq j}^m \frac{\phi_j^{FI}}{M_j} \right). \end{aligned} \quad (19)$$

Onde a segunda igualdade decorre do fato de que na condição de diluição infinita, ϕ_C^{FS} e ϕ_C^{FI} devem de ter valores semelhantes e pequenos, portanto, $(\phi_C^{FS} - \phi_C^{FI}) = 0$ e, $(\phi_j^{FS}/M_j) = (n_j^{FS}/N^{FS}) = (n_j^{FS}/\rho V^{FS})$, em que N^{FS} é o número de sítios da rede da fase superior, ρ é o número de sítios da rede por unidade de volume, o V^{FS} volume da fase superior, e M_C é a massa molar do soluto C. Desta forma a contribuição entrópica sobre a constante de partição K pode ser descrita pela Equação 20.

$$\ln K_C = \frac{M_i}{\rho} \left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right). \quad (20)$$

Onde, n^{FS} e n^{FI} são o número total de moléculas na fase superior e inferior, respectivamente. Esta relação indica que na ausência de efeitos entálpicos, o corante se particionará entre ambas as fases devido à diferença do número de moléculas por unidade de volume (densidade numérica) entre a fase superior e a inferior do SAB. Sob tais condições, o soluto irá particionar preferencialmente para a fase com a maior densidade em número. Esta situação resulta do fato de que a entropia da mistura aumenta em proporção com o número de formas distintas de distribuir as moléculas do

corante espacialmente, contribuindo para minimização da energia livre de Gibbs de mistura. Em essência, na fase com maior densidade numérica é possível acomodar o soluto em um maior número de formas diferentes, aumentando assim a seu particionamento para essa fase. Nos SABs formados por macromolécula + sal há uma maior densidade numérica na fase inferior em relação a fase superior, causada pela diferença de moléculas de água entre as fases. Desde modo, na ausência de forças entálpicas, um soluto particionado nestes sistemas se concentrará preferencialmente na fase inferior.

2.2.2.2 Contribuição entálpica ao coeficiente de partição (K)

Na ausência da contribuição entrópica, por exemplo, um SAB onde as densidades numéricas das fases são idênticas, o processo de partição do corante no SAB será depende apenas da diferença na entalpia molar parcial do soluto nas fases superior e inferior. Nessas condições o coeficiente de partição ser representada pela Equação 21.

$$\ln K = \frac{M_c}{RT} \left[\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{ic} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij} \right]. \quad (21)$$

Onde, Φ_i^T e Φ_i^B são a fração de volume do componente i (i = água, macromolécula, ou S sal) na fase superior e na fase inferior, M_c é a massa molar do corante, e w_{ic} e w_{ij} são as energias do par potencial i-j e i-c. As energias w_{ic} ou w_{ij} pode ser definido pela Equação 22:

$$W_{ij} = Z(\epsilon_{ij} - \frac{1}{2}(\epsilon_{ii} + \epsilon_{jj})). \quad (22)$$

Em que Z é o número de moléculas vizinhas que interagem com o componente i, enquanto ϵ_{ij} , ϵ_{ii} e ϵ_{jj} representam as energias envolvidas na formação de um par potencial i-j e rompimento da interação i-i e j-j, respectivamente.

De acordo com a Equação 21 todas as interações presentes no SAB podem ser representadas por dois somatórios, o primeiro $\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^T - \Phi_i^B) w_{ic}$ representa a energia absorvida ou liberada no processo de interação do corante com os componentes da fase superior e inferior. Por outro lado, o segundo somatório $\sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^T \Phi_i^T - \Phi_i^B \Phi_i^B) w_{ij}$

denominada como auto-energia do sistema, representa a energia do processo de formação de uma cavidade (rompimento de interação intermolecular) na fase superior e o fechamento de uma cavidade (formação de interação intermolecular) na fase inferior quando o corante é transferido da fase inferior para a fase superior.

2.3 Fundamentação teórica para determinação da entalpia de transferência e entalpia de excesso

2.3.1 Termodinâmica de mistura

Uma solução é definida como um sistema homogêneo, formado pela mistura de dois ou mais componentes, estando a mistura nos estados físicos sólidos ou líquidos ou gasosos⁵⁷. Admitindo-se que uma solução seja formada pela mistura de um componente puro A*, com um componente puro B*, tem-se:



↓
Solução

Onde, o " * " refere-se aos componentes puros.

A dissolução de um soluto em um determinado solvente envolve trocas de energia na forma de calor entre o sistema e vizinhança, que em condições de pressão constante é conhecida como variação da entalpia de mistura⁵⁷. O conteúdo de entalpia que existe nessa solução formada, não é igual a soma das entalpias dos componentes puros antes da mistura. Essa diferença, provém do fato de que as interações intermoleculares que os componentes fazem em solução são diferentes de quando puros. Assim, pode-se definir a variação de entalpia que ocorre no processo de mistura como:

$$\Delta_{mix}H = H_{sol} - (H_A^* + H_B^*). \quad (16)$$

Em que, H_{sol} é a entalpia da solução formada pela mistura dos componentes A + B, enquanto H_A^* e H_B^* são as entalpias dos componentes puros A e B.

A H_{sol} é uma função de estado da solução, podendo ser especificado pelas variáveis temperatura (T), pressão (P) e números de mols (n), deste modo,

$$H_{sol} = H_{sol}(T, P, n_i). \quad (17)$$

A partir da diferencial total de H_{sol} tem-se:

$$H_{sol} = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{P, n_i} dt + \left(\frac{\partial H}{\partial P}\right)_{P, n_i} dP + \left(\frac{\partial H}{\partial n_i}\right)_{P, n_i \neq j} dn_i. \quad (18)$$

O parâmetro entalpia molar parcial ($\bar{h}_j$) de um componente ‘j’ na solução pode ser definido como sendo:

$$\bar{h}_j = \left(\frac{\partial H_{sol}}{\partial n_j}\right)_{T, P, n_i \neq j}. \quad (19)$$

Onde, H_{sol} é a entalpia da solução e a derivada parcial é obtida mantendo constantes T, P e todos os números de mols, exceto n_j . A entalpia molar parcial representa a taxa de variação da entalpia na solução quando uma quantidade infinitesimal do componente “j” for adicionado a solução, mantendo a pressão, temperatura e a composição constante. De posse do parâmetro $\bar{h}_j$, a equação 18 pode ser escrita como:

$$H_{sol} = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{P, n_i} dt + \left(\frac{\partial H}{\partial P}\right)_{P, n_i} dP + \sum_i \bar{h}_i dn_i. \quad (20)$$

Para valores constantes de temperatura (T), pressão (P) e frações molares da solução (x_i), H_{sol} é proporcional ao número total de mols (n) da solução, sendo definido pela equação 21.

$$H_{sol} = nf(T, P, x_A, x_B). \quad (21)$$

Onde, $n = \sum_i n_i$ e f é uma função de T, P e das frações molares. A diferenciação da equação 21 fornece:

$$dH_{sol} = f(T, P, x_A, x_B)dn. \quad (22)$$

Nas condições T e P constantes a Equação 20 pode ser reescrita:

$$dH_{sol} = \sum_i \bar{h}_i dn_i. \quad (23)$$

Sabendo que $x_i = \frac{n_i}{n}$ ou $n_i = x_i n$. Portanto, $dn_i = x_i dn + n dx_i$, para x_i constante $dx_i = 0$, deste modo $dn_i = x_i dn$, substituindo na equação 23 tem-se:

$$dH_{sol} = \sum_i x_i \bar{h}_i dn. \quad (24)$$

Igualando as equações 22 e 24, tem-se:

$$f(T, P, X_A, X_B) dn = \sum_i x_i \bar{h}_i dn. \quad (25)$$

Logo:

$$f = \sum_i x_i \bar{h}_i. \quad (26)$$

A equação 21 pode ser reescrita:

$$H_{sol} = n \sum_i x_i \bar{h}_i. \quad (27)$$

Uma vez que $x_i = \frac{n_i}{n}$:

$$H_{sol} = \sum_i n_i \bar{h}_i. \quad (28)$$

Este resultado expressa a entalpia da solução em termos das entalpias molares parciais $\bar{h}_i$ dos componentes da solução. Considerando uma solução formada pelos componentes A e B.

$$H_{sol} = (n_A \bar{h}_A^{sol} + n_B \bar{h}_B^{sol}). \quad (29)$$

Onde n_A e n_B são os números de mols dos componentes A e B na solução, $\bar{h}_A^{sol}$ e $\bar{h}_B^{sol}$ são as entalpias molares parciais de A e B na solução.

Já as entalpias dos componentes A* e B* quando puros pode ser definido como:

$$H^* = n_i H_{mi}^*. \quad (30)$$

Em que H_{mi}^* é a entalpia molar do componente “i” puro. Considerando uma substância pura como um caso especial de solução, pode-se definir:

$$\bar{h}_j^* = \left(\frac{\partial H}{\partial n_j} \right)_{T,P,n_{i \neq j}} = \left(\frac{\partial H^*}{\partial n_j} \right)_{T,P,n_{i \neq j}} = H_{mi}^*. \quad (31)$$

Logo:

$$H_A^* = n_A^* \bar{h}_A^*. \quad (32)$$

$$H_B^* = n_B^* \bar{h}_B^*.$$

Onde n_A e n_B são os números de mols dos componentes A e B puros, $\bar{h}_A^*$ e $\bar{h}_B^*$ são as entalpias molares parciais de A* e B* puros.

De posse das equações 29 e 32, $\Delta_{mix}H$ pode ser determinado pela equação 33:

$$\Delta_{mix}H = H_{sol} - (H_A^* + H_B^*) = (n_A \bar{h}_A^{sol} + n_B \bar{h}_B^{sol}) - (n_A \bar{h}_A^* + n_B \bar{h}_B^*). \quad (33)$$

Rearranjando a equação 33:

$$\Delta_{mix}H = n_A (\bar{h}_A^{sol} - \bar{h}_A^*) + n_B (\bar{h}_B^{sol} - \bar{h}_B^*). \quad (34)$$

Como não é possível medir a entalpia da solução, uma vez que somente é possível medir as diferenças de entalpia, considera-se a entalpia da solução relativa à entalpia de algum sistema de referência, que podendo considerar como sendo os componentes puros. Desta forma a Equação 34 permite calcular a variação de entalpia

que ocorre quando uma solução é formada a partir da mistura de dois componentes puros.

2.3.2 Entalpia de excesso

As propriedades termodinâmicas de uma solução de dois líquidos são em muitos casos expressas em termos de funções de excesso. A entalpia de excesso (H^E) de uma mistura de líquidos é definida como a diferença entre a entalpia real (H) da solução, e a entalpia de uma solução ideal hipotética (H^{id}) com as mesmas T , P e composição que a solução real. Uma solução ideal pode ser definida como uma solução onde as moléculas das várias espécies são tão semelhantes umas às outras que a substituição de moléculas de uma espécie por moléculas de outra espécie não altera a estrutura espacial ou a energia de interação intermolecular da solução⁵⁷. Deste modo H^E pode ser expressa como:

$$H^E = H - H^{id}. \quad (35)$$

As funções de excesso são determinadas a partir de propriedades de mistura. Temos:

$$H^E = H - H^{id} = H - H^{id} + H^* - H^* = \underbrace{(H - H^*)}_{\Delta_{\text{mix}}H} - \underbrace{(H^{id} - H^*)}_{\Delta_{\text{mix}}H^{id}}. \quad (36)$$

Logo:

$$H^E = \Delta_{\text{mix}}H - \Delta_{\text{mix}}H^{id}. \quad (37)$$

Onde H^* é a entalpia dos componentes puros que compõem a solução. Sabendo que $\Delta_{\text{mix}}H^{id} = 0$, a Equação 37 pode ser reescrita:

$$H^E = \Delta_{\text{mix}}H. \quad (38)$$

A determinação do parâmetro entalpia de excesso pode ser feita por meio de um experimento de titulação, misturando soluções concentradas do corante com um solvente puro ou com uma solução diluída do corante, em misturas consecutivas.

Considerando o solvente como H₂O, na primeira titulação tem-se que a variação de entalpia resultante da mistura da solução de corante concentrado com o solvente puro é igual a:

$$\Delta_{\text{mix}}H_1 = H_{\text{sol}}^1 - (H_{\text{H}_2\text{O}}^* + H_{\text{sol}}^{\text{conc}}). \quad (39)$$

Onde, H_{sol}^1 corresponde a entalpia da solução formada após a primeira titulação; $H_{\text{H}_2\text{O}}^*$ é a entalpia da água pura, e $H_{\text{sol}}^{\text{conc}}$ é a entalpia da solução concentrada do corante. O $\Delta_{\text{mix}}H_1$ é oriundo das mudanças nas interações intermoleculares entre os componentes da mistura formada, resultado do rompimento e formação de novas interações. Considerando que $H_{\text{sol}} = \sum_i n_i \bar{h}_i$ (Equação 28), e $H_i^* = n_i^* \bar{h}_i^*$ (Equação 32), a Equação 39 pode ser reescrita:

$$\Delta_{\text{mix}}H_1 = (n_{\text{H}_2\text{O}} \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^1 + n_{\text{cor}} \bar{h}_{\text{cor}}^1) - (n_{\text{H}_2\text{O}}^* \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^* + n_{\text{cor}}^{\text{con}} \bar{h}_{\text{cor}}^{\text{con}} + n_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}} \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}). \quad (40)$$

Onde: $n_{\text{H}_2\text{O}}$ é o número de mols de água na solução após a primeira titulação; $\bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^1$ é a entalpia molar parcial da água na solução após a primeira titulação; n_{cor}^1 é o número de mols de corante na solução após a primeira titulação, $\bar{h}_{\text{cor}}^1$ é a entalpia molar parcial do corante na solução após a primeira titulação, $n_{\text{H}_2\text{O}}^*$ é o número de mols de água pura presente antes da primeira titulação; $\bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^*$ é a entalpia molar parcial da água pura; $n_{\text{cor}}^{\text{con}}$ é o número de mols do corante presentes na alíquota de solução concentrada de corante que foi titulado, $\bar{h}_{\text{cor}}^{\text{con}}$ é a entalpia molar parcial do corante na solução concentrada, $n_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}$ é o número de mols de água presente na alíquota titulada de solução corante concentrado e $\bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}$ é a entalpia molar parcial da água presente na alíquota de solução concentrada do corante que foi titulado. Considerando que $n_{\text{H}_2\text{O}} = n_{\text{H}_2\text{O}}^* + n_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}$, e rearranjando a Equação 40, tem-se:

$$\Delta_{\text{mix}}H_1 = (n_{\text{H}_2\text{O}}^* + n_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}) \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^1 + n_{\text{cor}} \bar{h}_{\text{cor}}^1 - (n_{\text{H}_2\text{O}}^* \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^* + n_{\text{cor}}^{\text{con}} \bar{h}_{\text{cor}}^{\text{con}} + n_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}} \bar{h}_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{con}}). \quad (41)$$

Agrupando os termos, a equação 41 pode ser reescrita:

$$\Delta_{mix}H_1 = n_{H_2O}^*(\bar{h}_{H_2O}^1 - \bar{h}_{H_2O}^*) + n_{cor}^1(\bar{h}_{cor}^1 - \bar{h}_{cor}^{con}) + n_{H_2O}^{con}(\bar{h}_{H_2O}^1 - \bar{h}_{H_2O}^{con}). \quad (42)$$

Uma análise de $\Delta_{mix}H_1$ permite separá-lo em três termos. O primeiro termo $n_{H_2O}^*(\bar{h}_{H_2O}^1 - \bar{h}_{H_2O}^*)$, mostra que parte da energia contida em $\Delta_{mix}H_1$ deve estar vindo da diferença da entalpia molar parcial da água após a primeira titulação ($\bar{h}_{H_2O}^1$) quando comparado com a entalpia molar parcial da água antes da titulação, quando havia apenas água pura ($\bar{h}_{H_2O}^*$). Essa diferença expressa o quanto as interações H₂O-H₂O são mudadas na presença do corante, que neste caso, devido a baixa concentração do corante na solução, pode ser considerada pequena. O segundo termo $n_{H_2O}^{con}(\bar{h}_{H_2O}^1 - \bar{h}_{H_2O}^{con})$ representa a diferença da entalpia molar parcial da água após a primeira titulação ($\bar{h}_{H_2O}^1$) em relação a entalpia molar parcial da água contida na solução concentrada de corante ($\bar{h}_{H_2O}^{con}$), essa variação de energia é grande, e esta associada a mudança nas interações H₂O-H₂O decorridas pela presença de um maior número de mols do corante. Já o terceiro termo $n_{cor}^1(\bar{h}_{cor}^1 - \bar{h}_{cor}^{con})$ mostra a diferença da entalpia molar parcial do corante que está contido na solução resultante da primeira titulação ($\bar{h}_{cor}^1$), em relação a entalpia molar parcial do corante presente na solução concentrada ($\bar{h}_{cor}^{con}$), essa diferença é grande, e decorre da mudança nas interações intermoleculares entre os componentes, ou seja, interações H₂O-corante, corante-corante, H₂O-H₂O, ocasionada pelas interações H₂O-corante.

Considerando agora uma segunda titulação, a variação de entalpia resultante da mistura de uma alíquota de solução concentrada do corante, com uma solução diluída do mesmo (solução obtida após a primeira titulação) pode ser definida como:

$$\Delta_{mix}H_2 = H_{sol}^2 - (H_{sol}^1 + H_{sol}^{conc}). \quad (43)$$

Onde H_{sol}^2 corresponde a entalpia da solução formada após a segunda titulação; H_{sol}^1 é a entalpia da solução resultante da primeira titulação, e H_{sol}^{conc} é a entalpia da solução concentrada do corante. Considerando que $H_{sol} = \sum_i n_i \bar{h}_i$ (Equação 28) tem-se:

$$\Delta_{\text{mix}}H_2 = (n_{H_2O}^2 \bar{h}_{H_2O}^2 + n_{cor}^2 \bar{h}_{cor}^2) - [(n_{H_2O}^1 \bar{h}_{H_2O}^1 + n_{cor}^1 \bar{h}_{cor}^1) + (n_{cor}^{con} \bar{h}_{cor}^{*con} + n_{H_2O}^{con} \bar{h}_{H_2O}^{con})]. \quad (44)$$

Onde: $n_{H_2O}^2$ é o número de mols de água na solução após a segunda titulação; $\bar{h}_{H_2O}^2$ é a entalpia molar parcial da água na solução após a segunda titulação; n_{cor}^2 é o número de mols de corante na solução após a segunda titulação, $\bar{h}_{cor}^2$ é a entalpia molar parcial do corante na solução após a segunda titulação. Admitindo que $n_{H_2O}^2 = n_{H_2O}^1 + n_{H_2O}^{con}$:

$$\Delta_{\text{mix}}H_2 = (n_{H_2O}^1 + n_{H_2O}^{con}) \bar{h}_{H_2O}^2 + (n_{cor}^1 + n_{cor}^{con}) \bar{h}_{cor}^2 - [(n_{H_2O}^1 \bar{h}_{H_2O}^1 + n_{cor}^1 \bar{h}_{cor}^1) + (n_{cor}^{con} \bar{h}_{cor}^{*con} + n_{H_2O}^{con} \bar{h}_{H_2O}^{con})]. \quad (45)$$

Rearranjando e agrupando os termos, a Equação 45 pode ser reescrita:

$$\Delta_{\text{mix}}H_2 = n_{H_2O}^1 (\bar{h}_{H_2O}^2 - \bar{h}_{H_2O}^1) + n_{cor}^1 (\bar{h}_{cor}^2 - \bar{h}_{cor}^1) + n_{H_2O}^{con} (\bar{h}_{H_2O}^2 - \bar{h}_{H_2O}^{con}) + n_{cor}^{con} (\bar{h}_{cor}^2 - \bar{h}_{cor}^{*con}). \quad (46)$$

Semelhante a primeira titulação, $\Delta_{\text{mix}}H_2$ é resultado da contribuição de vários termos, que correspondem a energia resultante das mudanças nas interações intermoleculares entre os componentes da mistura formada, quando o número de mols de corante é alterado.

Para as demais titulações ($\Delta_{\text{mix}}H_3$; $\Delta_{\text{mix}}H_4$; $\Delta_{\text{mix}}H_5$... $\Delta_{\text{mix}}H_i$) uma Equação análoga a (46) deve ser obtida, podendo de maneira generalizada ser descrita pela Equação 47.

$$\Delta_{\text{mix}}H_i = n_{H_2O}^j (\bar{h}_{H_2O}^i - \bar{h}_{H_2O}^j) + n_{cor}^j (\bar{h}_{cor}^i - \bar{h}_{cor}^j) + n_{H_2O}^{con} (\bar{h}_{H_2O}^i - \bar{h}_{H_2O}^{con}) + n_{cor}^{con} (\bar{h}_{cor}^i - \bar{h}_{cor}^{*con})]. \quad (47)$$

Onde “i” refere-se a solução formada após a titulação, e “j” representa a solução que existia antes da titulação.

Quando se deseja analisar as energias de interações soluto-solvente sem ter em conta a influencia das interações soluto-soluto, a entalpia de excesso para condição de diluição infinita do soluto ($H^{E\infty}$) pode ser obtida. Para tanto um gráfico dos valores de ($\Delta_{\text{mix}}H$) obtidos em cada titulação versus a concentração do soluto pode ser construído, e os valores de $H^{E\infty}$ calculados extrapolando a concentração do soluto a zero, por meio do ajuste da curva obtida a uma equação exponencial.

Nessa condição hipotética de diluição infinita as interações soluto-soluto são desprezíveis, e as interação específicas entre o soluto e o solvente podem então ser determinadas. Por meio do parâmetro $H^{E\infty}$ as interações específicas entre um soluto e os componentes das fases de um SAB podem ser determinados, possibilitando calcular $\Delta_{\text{tr}}H^0$ resultante do processo de transferência do soluto da fase inferior para fase superior do SAB.

Como já descrito, a fase superior do SAB é composta majoritariamente por água e PEO, enquanto a fase inferior é composta em maioria por sal e água. Sendo assim, determinando $H^{E\infty}$ do corante em água, nas fases superior e na fase inferior do sistema, as energias de interação corante-PEO ($E_{\text{C-EO}}$), e corante-sal ($E_{\text{C-sal}}$) podem ser determinadas utilizando as relações:

$$E_{\text{C-EO}} = H_{\text{C-FS}}^{E,\infty} - H_{\text{C-H}_2\text{O}}^{E,\infty} \quad (48)$$

$$E_{\text{C-sal}} = H_{\text{C-FI}}^{E,\infty} - H_{\text{C-H}_2\text{O}}^{E,\infty} \quad (49)$$

Onde os termos $H_{\text{C-FS}}^{E,\infty}$ e $H_{\text{C-FI}}^{E,\infty}$ referem as entalpias de excesso do corante na condição de diluição infinita obtidos em fase superior e inferior respectivamente, e o termo $H_{\text{C-H}_2\text{O}}^{E,\infty}$ representa a entalpias de excesso do corante na condição de diluição infinita obtido em água pura.

Por meio dos parâmetros $H_{\text{C-FS}}^{E,\infty}$ e $H_{\text{C-FI}}^{E,\infty}$, os valores $\Delta_{\text{tr}}H^0$ podem ser calculados:

$$\Delta_{\text{tr}}H^0 = H_{\text{C-FS}}^{E,\infty} - H_{\text{C-FI}}^{E,\infty} \quad (50)$$

Uma maneira bastante precisa de se determinar os valores de $\Delta_{\text{mix}}H$ é utilizando a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica, como será descrito na seção abaixo.

2.4 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) é considerada uma potente técnica encarregada de detectar a energia em forma de calor, absorvida ou liberada em diferentes processos termodinâmicos⁵⁸. Esta fornece uma descrição qualitativa e termodinâmica dos fenômenos, além de sua considerável sensibilidade, justificando seu uso em diferentes estudos tais como, interações entre macromoléculas e ligantes, equilíbrio de dissociação de aminoácidos em diferentes estados de protonação, estudos termodinâmicos de agregação de surfactantes, e estudos cinéticos enzimáticos^{59,60,61,62}.

A técnica de ITC é utilizada para medir a variação de calor resultante da interação de duas espécies moleculares quaisquer, permitindo determinar diretamente e sem aproximações o valor da variação de entalpia de interação. Nesta técnica os processos termodinâmicos que ocorrem no sistema são avaliados sob as condições de temperatura e pressão constantes. Desta forma, em acordo com a Equação 51 simplificada que expressa a primeira lei da termodinâmica, tem-se:

$$dU = dq + dw. \quad (51)$$

Onde, dU é a variação infinitesimal de energia interna do sistema, dq é variação infinitesimal de energia trocada entre sistema e vizinhança na forma de calor e dw é a variação infinitesimal de energia na forma de trabalho feito pelo sistema ou sobre ele.

Considerando que o processo analisado ocorra entre um estado inicial (i) e um estado final (f) e que o sistema esteja restrito apenas à realização de trabalho de expansão ou compressão com pressão constante, integrando a Equação 51 tem-se:

$$\int_i^f dU = \int_i^f dq - \int_i^f P_{\text{ext}} dV. \quad (52)$$

Em que P_{ext} é a pressão externa no sistema e dV é a variação infinitesimal do volume do sistema. Resolvendo as integrais definidas na Equação 52, obtém-se:

$$U_f - U_i = q - P_{\text{ext}}(V_f - V_i). \quad (53)$$

Reordenando os termos na Equação 53, obtém-se a Equação 54:

$$(U_f + P_{\text{ext}}V_f) - (U_i + P_{\text{ext}}V_i) = q. \quad (54)$$

À soma $U + P_{\text{ext}}V$ dá-se o nome de entalpia (H). Considerando que na equação 18 tem-se uma entalpia final e uma inicial, como resultado obtém-se uma variação de entalpia (Equação 55).

$$\Delta H = H_f - H_i = q. \quad (55)$$

A Equação 63 expressa que a variação de entalpia do sistema num dado processo termodinâmico é numericamente igual à quantidade de energia trocada na forma de calor entre sistema e vizinhança, em condições onde o sistema só pode realizar trabalho de compressão e expansão à pressão constante. Sendo essa energia oriunda da soma da energia interna do sistema (variação da energia translacional, vibracional, rotacional e eletrônica) mais o trabalho de compressão ou expansão que realize o sistema.

Em ITC utiliza-se um calorímetro, este é constituído por um par correspondente de celas de amostras e de referência que se encontram em equilíbrio térmico com suas vizinhanças num ambiente de temperatura altamente controlada. A técnica é baseada em uma titulação, onde injeções de uma solução concentrada do analito são realizadas na célula de amostra, sob agitação constante. As injeções são controladas por um motor de passo, sendo cada adição automática, e o intervalo no tempo entre uma adição e outra constante. Esse procedimento é realizado por meio de uma seringa que é acoplada a uma torre que leva a amostra até a cela de interesse⁶³, como mostra a Figura 10.

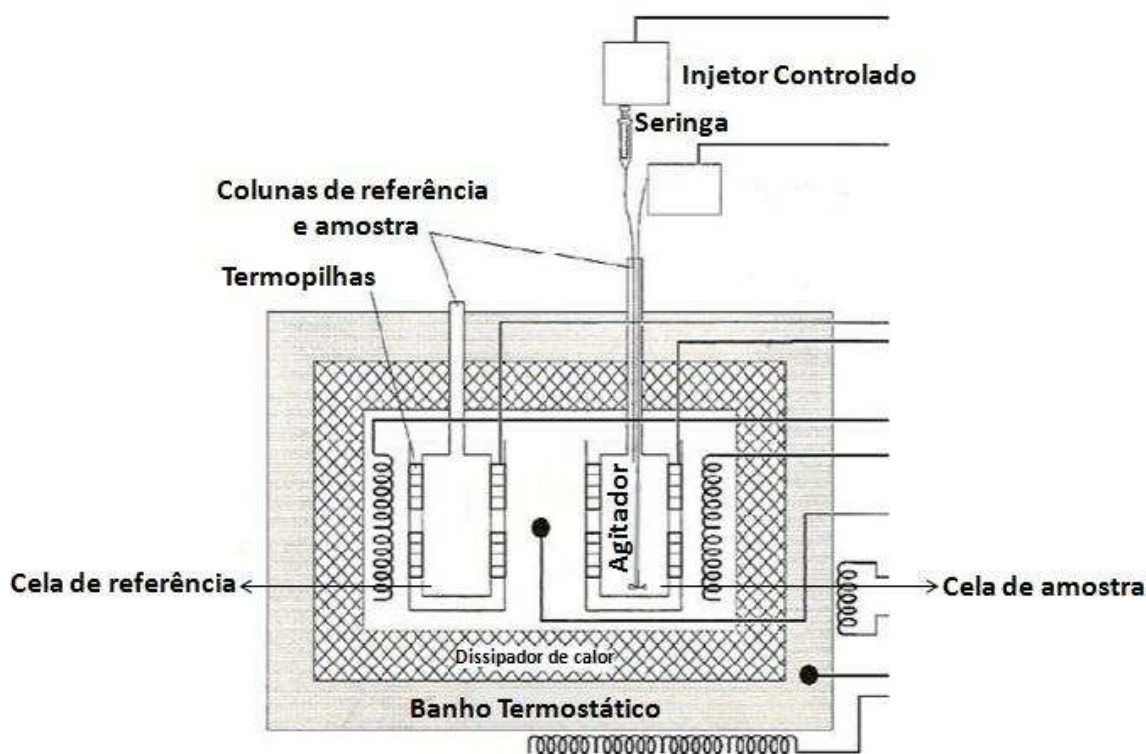


Figura 10. Descrição do Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC)⁶³.

Em um experimento típico realizado no ITC, pequenas alíquotas, de volumes conhecidos, de solução do titulante são adicionadas ao titulado no interior do vaso calorimétrico. Trocas de energia na forma de calor resultantes dos processos de mistura que envolvem o rompimento e a formação de interações intermoleculares passam a ocorrer, levando a variação da temperatura do sistema. Para que o equilíbrio térmico seja reestabelecido, a transferência de energia na forma de calor entre sistema e vizinhança começa a ocorrer. A energia resultante, absorvida ou liberada pelo sistema, na forma de calor é então detectada por meio de termopilhas que ficam localizadas próximas às células calorimétricas. Essa energia por vez gera uma diferença de potencial elétrico em seus terminais que é registrado e automaticamente convertido em potência como mostra a Equação 56.

$$P = \frac{dq}{dt}. \quad (56)$$

Permitindo obter um gráfico de potência em função do tempo denominado termograma (Figura 11). Onde cada pulso (sinal térmico) mostrado no termograma indica o momento da adição de um volume conhecido do titulante.

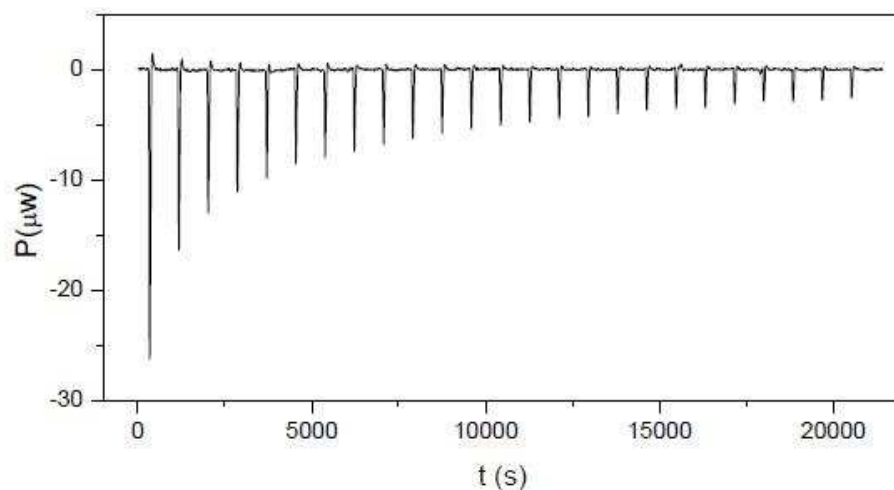


Figura 11. Termograma de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC).

Integrando a curva de potência em função do tempo, a quantidade de energia na forma de calor correspondente a cada injeção é encontrada, e conseqüentemente a variação de entalpia transferida no processo sob investigação pode ser obtida (Equação 57).

$$\Delta H = q = \int_{t_1}^{t_2} P \, dt. \quad (57)$$

Por meio do procedimento relatado, os valores de $\Delta_{Tr}H$ de cada corante estudado (AM, AZA, AZB) para diferentes SABs podem ser determinados.

REFERÊNCIAS

- (1) Da Silva, L. H. M.; Loh, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos E Aplicações Para Partição/purificação de Proteínas. *Quim. Nova* **2006**, 29 (6), 1345–1351.
- (2) Albertsson, P.-Å. Particle Fractionation in Liquid Two-Phase Systems The Composition of Some Phase Systems and the Behaviour of Some Model Particles in Them Application to the Isolation of Cell Walls from Microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, 27, 378–395.
- (3) Duarte, A. W. F.; Lopes, A. M.; Molino, J. V. D.; Pessoa, A.; Sette, L. D. Liquid–liquid Extraction of Lipase Produced by Psychrotrophic Yeast *Leucosporidium Scottii* L117 Using Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, 156, 215–225.
- (4) da Silva, N. R.; Ferreira, L. A.; Madeira, P. P.; Teixeira, J. A.; Uversky, V. N.; Zaslavsky, B. Y. Analysis of Partitioning of Organic Compounds and Proteins in Aqueous Polyethylene Glycol-Sodium Sulfate Aqueous Two-Phase Systems in Terms of Solute-Solvent Interactions. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1415, 1–10.
- (5) Chow, Y. H.; Yap, Y. J.; Anuar, M. S.; Tejo, B. A.; Ariff, A.; Show, P. L.; Ng, E. P.; Ling, T. C. Interfacial Partitioning Behaviour of Bovine Serum Albumin in Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, 934, 71–78.
- (6) Akama, Y.; Ito, M.; Tanaka, S. Selective Separation of Cadmium from Cobalt, Copper, Iron (III) and Zinc by Water-Based Two-Phase System of Tetrabutylammonium Bromide. *Talanta* **2000**, 53 (3), 645–650.
- (7) Fischer, I.; Morhardt, C.; Heissler, S.; Franzreb, M. Partitioning Behavior of Silica-Coated Nanoparticles in Aqueous Micellar Two-Phase Systems: Evidence for an Adsorption-Driven Mechanism from QCM-D and ATR-FTIR Measurements. *Langmuir* **2012**, 28 (45), 15789–15796.
- (8) Khripin, C. Y.; Fagan, J. A.; Zheng, M. Spontaneous Partition of Carbon Nanotubes in Polymer-Modified Aqueous Phases. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (18), 6822–6825.
- (9) de Alvarenga, J. M.; Fideles, R. A.; da Silva, M. V.; Murari, G. F.; Taylor, J. G.; de Lemos, L. R.; Dias Rodrigues, G.; Mageste, A. B. Partition Study of Textile Dye Remazol Yellow Gold RNL in Aqueous Two-Phase Systems. *Fluid Phase Equilib.* **2015**, 391, 1–8.

- (10) Ferreira, A. M.; Coutinho, J. a P.; Fernandes, A. M.; Freire, M. G. Complete Removal of Textile Dyes from Aqueous Media Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 128, 58–66.
- (11) Mageste, A. B.; Senra, T. D. A.; da Silva, M. C. H.; Bonomo, R. C. F.; da Silva, L. H. M. Thermodynamics and Optimization of Norbixin Transfer Processes in Aqueous Biphasic Systems Formed by Polymers and Organic Salts. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 98, 69–77.
- (12) Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. D. C. H.; da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A. Aqueous Two-Phase Systems: An Efficient, Environmentally Safe and Economically Viable Method for Purification of Natural Dye Carmine. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (45), 7623–7629.
- (13) Gilani, A. G.; Salmanpour, M.; Ghorbanpour, T. Solvatochromism , Dichroism and Excited State Dipole Moment of Azure A and Methylene Blue. *J. Mol. Liq.* **2013**, 179, 118–123.
- (14) Ghanadzadeh, a; Zanjanchi, M. .; Tirbandpay, R. The Role of Host Environment on the Aggregative Properties of Some Ionic Dye Materials. *J. Mol. Struct.* **2002**, 616 (1-3), 167–174.
- (15) Akers, N. L.; Moore, C. M.; Minter, S. D. Development of alcohol/O₂ Biofuel Cells Using Salt-Extracted Tetrabutylammonium bromide/Nafion Membranes to Immobilize Dehydrogenase Enzymes. *Electrochim. Acta* **2005**, 50 (12), 2521–2525.
- (16) Aksu, Z.; Ertuğrul, S.; Dönmez, G. Methylene Blue Biosorption by *Rhizopus Arrhizus*: Effect of SDS (sodium Dodecylsulfate) Surfactant on Biosorption Properties. *Chem. Eng. J.* **2010**, 158 (3), 474–481.
- (17) Vijayaraghavan, K.; Mao, J.; Yun, Y.-S. Biosorption of Methylene Blue from Aqueous Solution Using Free and Polysulfone-Immobilized *Corynebacterium Glutamicum*: Batch and Column Studies. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99 (8), 2864–2871.
- (18) Ansari, R.; Mosayebzadeh, Z. Removal of Basic Dye Methylene Blue from Aqueous Solutions Using Sawdust and Sawdust Coated with Polypyrrole. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, 7 (2), 339–350.
- (19) Vennerstrom, J. L.; Makler, M. T.; Angerhofer, C. K.; Williams, J. a. Antimalarial Dyes Revisited: Xanthenes, Azines, Oxazines and Thiazines. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39 (12), 2671–2677.

- (20) Paul, P.; Suresh Kumar, G. Spectroscopic Studies on the Binding Interaction of Phenothiazinium Dyes Toluidine Blue O, Azure A and Azure B to DNA. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *107*, 303–310.
- (21) Santin, L. R. R.; dos Santos, S. C.; Novo, D. L. R.; Bianchini, D.; Gerola, A. P.; Braga, G.; Caetano, W.; Moreira, L. M.; Bastos, E. L.; Romani, A. P.; et al. Study between Solvatochromism and Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Measurements of the Methylene Blue in Binary Mixtures. *Dye. Pigment.* **2015**, *119*, 12–21.
- (22) Golz, E. K.; Vander Griend, D. a. Modeling Methylene Blue Aggregation in Acidic Solution to the Limits of Factor Analysis. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (2), 1240–1246.
- (23) Killian, J. A. CHEMICAL STUDIES ON POLYCHROME METHYLENE BLUE ' to Form Closely Related Dye Substances with Metachromatic Properties , of Animal Cells . Bernthsen2 in 1885 First Established the Structure of and Methylene Azure as the New Dye Substances Produced in Alkali. **1926**, *48* (1906), 740–747.
- (24) Tafulo, P. a R.; Queirós, R. B.; González-Aguilar, G. On the “Concentration-Driven” Methylene Blue Dimerization. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, *73* (2), 295–300.
- (25) Lewis, G. N.; Goldschmid, O.; Magel, T. T. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer1. *J. Am. {...}* **1943**, *65* (6), 1150–1154.
- (26) Konski, T. O. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer and Complexes With Montmorillonite. **1963**, *416* (9).
- (27) Homem-de-Mello, P.; Mennucci, B.; Tomasi, J.; da Silva, A. B. F. Cationic Dye Dimers: A Theoretical Study. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118* (2), 305–314.
- (28) Konski, B. K. B. C. T. O. A Spectroscopic Study of Methilene Blue Monomer, Dimer, and and Complexes With Montmorillonite. **1963**, *416* (9).
- (29) Blue, M. Multiple Association Equilibria in the Self-Association. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63* (7), 6408–6412.
- (30) RABINOWITCH, E.; Epstein, L. F. Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene blue1. *J. Am. Chem. {...}* **1941**, *63* (5), 69–78.
- (31) Yao, H.; Isohashi, T.; Kimura, K. Electrolyte-Induced Mesoscopic Aggregation of Thiocarbocyanine Dye in Aqueous Solution: Counterion Size Specificity. *J.*

Phys. Chem. B **2007**, *111* (25), 7176–7183.

- (32) Lee, C.; Sung, Y. W.; Park, J. W. Multiple Equilibria of Phenothiazine Dyes in Aqueous Cyclodextrin Solutions. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 893–898.
- (33) Homem-de-Mello, P.; Mennucci, B.; Tomasi, J.; Da Silva, a. B. F. The Effects of Solvation in the Theoretical Spectra of Cationic Dyes. *Theor. Chem. Acc.* **2005**, *113*, 274–280.
- (34) Patil, K.; Pawar, R.; Talap, P. Self-Aggregation of Methylene Blue in Aqueous Medium and Aqueous Solutions of Bu₄NBr and Urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2* (19), 4313–4317.
- (35) Neumann, M. G.; Gessner, F.; Cione, A. P. P.; Sartori, R. a.; Schmitt Cavalheiro, C. C. Interações Entre Corantes E Argilas Em Suspensão Aquosa. *Quim. Nova* **2000**, *23* (6), 818–824.
- (36) Junqueira, H. C. Síntese E Estudo Das Propriedades Fotoinduzidas de Derivados Fenotiazínicos Em Sistemas Biométicos. *tese doutor em ciencias Inst. química são paulo* **2008**, 163.
- (37) Khan, A. Y.; Suresh Kumar, G. Spectroscopic Studies on the Binding Interaction of Phenothiazinium Dyes, Azure A and Azure B to Double Stranded RNA Polynucleotides. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *152*, 417–425.
- (38) Search, H.; Journals, C.; Contact, A.; Iopscience, M. Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation. **1979**, 1076.
- (39) Jockusch, S.; Turro, N. J.; Tomalia, D. a. Aggregation of Methylene Blue Adsorbed on Starburst Dendrimers. *Macromolecules* **1995**, *28* (22), 7416–7418.
- (40) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006.
- (41) Yates, P. C. Semiempirical Molecular Orbital Calculations on Dye Molecules. *J. Mol. Struct.* **1994**, *315*, 117–122.
- (42) Quintão, A. D.; Coutinho, K.; Canuto, S. Theoretical Study of the Hydrogen Bond Interaction Between Methylene Blue and Water and Possible Role on Energy Transfer for Photodynamics. *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, *90* (2), 634–640.

- (43) Freire, M. G.; Cláudio, A. F. M.; Araújo, J. M. M.; Coutinho, J. a. P.; Marrucho, I. M.; Lopes, J. N. C.; Rebelo, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: A Boost Brought about by Using Ionic Liquids. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (14), 4966.
- (44) Arne Tiselius, Jerker Porath, A. P. Separation and Fractionation of Macromolecules and Particles. *Science (80-)*. **1969**, 165 (3897), 971–981.
- (45) Ryden, J.; Albertsson, P. ake. Interfacial Tension of Dextran-Polyethylene Glycol-Water Two-Phase Systems. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, 37 (1), 219–222.
- (46) LEMOS, L. R. DE. Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma Nova Abordagem Para a Determinação de P-Aminofenol. *Diss. apresentada à Univ. Fed. Viçosa , Programa Pós-Graduação em Fitotec. , Magister Sci. . VIÇOSA MINAS GERAIS – Bras.* **2010**, 59.
- (47) Silva, M. do C. H. da; Silva, L. H. M. da; Paggioli, F. J.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Sistema Aquoso Bifásico: Uma Alternativa Eficiente Para Extração de íons. *Quim. Nova* **2006**, 29 (6), 1332–1339.
- (48) Glyk, A.; Scheper, T.; Beutel, S. Influence of Different Phase-Forming Parameters on the Phase Diagram of Several PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, 59, 850–859.
- (49) Willauer, H. D.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D. Solvent Properties of Aqueous Biphasic Systems Composed of Polyethylene Glycol and Salt Characterized by the Free Energy of Transfer of a Methylene Group between the Phases and by a Linear Solvation Energy Relationship. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, 41 (11), 2591–2601.
- (50) Martins, J. P.; Carvalho, C. D. P.; Silva, L. H. M. Da; Coimbra, J. S. D. R.; Silva, M. D. C. H. Da; 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 (1), 238–241.
- (51) Berthod, a.; Carda-Broch, S. Determination of Liquid-Liquid Partition Coefficients by Separation Methods. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1037 (1-2), 3–14.
- (52) Asenjo, J. A.; Andrews, B. A. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: A Perspective. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218 (49), 8826–8835.
- (53) RITOPALOMARES, M. Practical Application of Aqueous Two-Phase Partition to Process Development for the Recovery of Biological Products. *J. Chromatogr. B* **2004**, 807 (1), 3–11.

- (54) Brito, G. maia de. Termodinâmica de Partição Do ânion $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ Em Sistemas Aquosos Bifásicos. *Diss. (Mestrado em Agroquímica) – Programa Pós-Graduação em Agroquímica, Univ. Fed. Viçosa, Viçosa* **2007**, 70.
- (55) Spelzini, D.; Farruggia, B.; Picó, G. Features of the Acid Protease Partition in Aqueous Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol-Phosphate: Chymosin and Pepsin. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 821 (1), 60–66.
- (56) Johansson, H.-O. O.; Karlström, G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. a. Driving Forces for Phase Separation and Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711 (1-2), 3–17.
- (57) Levine, I. N. Physical Chemistry 6 Ed. *Mc Graw Hill* **2002**, 53 (9), 1689–1699.
- (58) Löf, D.; Niemiec, A.; Schillén, K.; Loh, W.; Olofsson, G. A Calorimetry and Light Scattering Study of the Formation and Shape Transition of Mixed Micelles of EO20PO68EO20 Triblock Copolymer (P123) and Nonionic Surfactant (C12EO6). *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111 (21), 5911–5920.
- (59) Keswani, N.; Choudhary, S.; Kishore, N. Quantitative Aspects of Recognition of the Antibiotic Drug Oxytetracycline by Bovine Serum Albumin: Calorimetric and Spectroscopic Studies. *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, 58, 196–205.
- (60) Ababou, A.; Ladbury, J. E. Survey of the Year 2004: Literature on Applications of Isothermal Titration Calorimetry. *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19 (1), 79–89.
- (61) Barbosa, A. M.; Santos, I. J. B.; Ferreira, G. M. D.; Hespanhol Da Silva, M. D. C.; Teixeira, Á. V. N. D. C.; Da Silva, L. H. M. Microcalorimetric and SAXS Determination of PEO-SDS Interactions: The Effect of Cosolutes Formed by Ions. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114 (37), 11967–11974.
- (62) Olsen, S. N. Applications of Isothermal Titration Calorimetry to Measure Enzyme Kinetics and Activity in Complex Solutions. *Thermochim. Acta* **2006**, 448 (1), 12–18.
- (63) MAGESTE, A. B. Aplicação Da Microcalorimetria E Do Espalhamento de Raios-X a Baixos ângulos No Estudo Da Interação Poli (óxido de Etileno) E Dodecil Sulfato de Sódio: Efeito de Cosolutos Iônicos. *Diss. (Mestrado em Agroquímica) – Programa Pós-Graduação em Agroquímica, Univ. Fed. Viçosa, Viçosa* **2009**.
- (64) Patrício, P. R.; Cunha, R. C.; Rodriguez Vargas, S. J.; Coelho, Y. L.; Mendes da Silva, L. H.; Hespanhol da Silva, M. C. Chromium Speciation Using Aqueous

Biphasic Systems: Development and Mechanistic Aspects. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, 158, 144–154.

- (65) Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanaka, S. The Study of the Partitioning Mechanism of Methyl Orange in an Aqueous Two-Phase System. *Talanta* **1999**, 48 (5), 1133–1137.
- (66) Tong, A. J.; Dong, J. J.; Li, L. Di. Aqueous Two-Phase Extraction System of Sodium Perfluorooctanoate and Dodecyltriethylammonium Bromide Mixture and Its Application to Porphyrins and Dyes. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 390 (1-3), 125–131.
- (67) Merchuk, J. C.; Andrews, B. a; Asenjo, J. a. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711 (1-2), 285–293.
- (68) Shu, Y.; Gao, M.; Wang, X.; Song, R.; Lu, J.; Chen, X. Separation of Curcuminoids Using Ionic Liquid Based Aqueous Two-Phase System Coupled with in Situ Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Talanta* **2016**, 149, 6–12.
- (69) Silva, M. F. F.; Fernandes-Platzgummer, A.; Aires-Barros, M. R.; Azevedo, A. M. Integrated Purification of Monoclonal Antibodies Directly from Cell Culture Medium with Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 132, 330–335.
- (70) Almeida, M. R.; Passos, H.; Pereira, M. M.; Lima, ??lvano S.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G. Ionic Liquids as Additives to Enhance the Extraction of Antioxidants in Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 128, 1–10.
- (71) da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H.; J??nior, J. A.; Martins, J. P.; Reis Coimbra, J. S. dos; Minim, L. A. Hydrophobic Effect on the Partitioning of [Fe(CN)₅(NO)]²⁻ and [Fe(CN)₆]³⁻ Anions in Aqueous Two-Phase Systems Formed by Triblock Copolymers and Phosphate Salts. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, 60 (1), 103–112.
- (72) Alc ntara, L. A. P.; Amaral, I. V.; Bonomo, R. C. F.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H.; Minim, V. P. R.; Minim, L. A. Partitioning of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from Cheese Whey in Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene Glycol) and Sodium Polyacrylate. *Food Bioprod. Process.* **2014**, 92 (4), 409–415.
- (73) Patrício, P. da R.; Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. Phase Diagram and Thermodynamic Modeling of PEO+organic salts+H₂O and PPO+organic salts+H₂O Aqueous

- (74) Leo, a.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem. Rev.* **1971**, *71* (6), 525.
- (75) Florence, N.; Naorem, H. Dimerization of Methylene Blue in Aqueous and Mixed Aqueous Organic Solvent: A Spectroscopic Study. *J. Mol. Liq.* **2014**, *198*, 255–258.
- (76) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2* (3), 175–191.
- (77) da Silva, J. S.; Junqueira, H. C.; Ferreira, T. L. Effect of pH and Dye Concentration on the N-Octanol/water Distribution Ratio of Phenothiazine Dyes: A Microelectrode Voltammetry Study. *Electrochim. Acta* **2014**, *144*, 154–160.
- (78) Rogers, R. D.; Bauer, C. B. Partitioning Behavior of Group 1 and 2 Cations in Poly(ethylene Glycol)-Based Aqueous Biphasic Systems. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1996**, *680* (1-2), 237–241.
- (79) Kumar, A.; Rai, G. Elucidation of Ionic Interactions in the Protic Ionic Liquid Solutions by Isothermal Titration Calorimetry. *J. Phys. Chem. B* **2014**, asap.
- (80) Da Silva, L. H. M.; Da Silva, M. C. H.; De Aquino, R. A. N.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Enthalpic Interaction as a 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* (46), 23540–23546.
- (81) Frenking, G.; Wichmann, K.; Fro, N.; Grobe, J. Nature of the Metal - Ligand Bond in $M(CO)_5PX_3$ Complexes (M) Cr, Mo, W; X) H, Me, F, Cl): Synthesis, Molecular Structure, and Quantum-Chemical Calculations. **2008**, *2* (16), 2921–2930.
- (82) da Silva, L. H. M.; Loh, W. 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* **2000**, *104* (43), 10069–10073.
- (83) Tajkhorshid, E.; Suhai, S. Influence of the Methyl Groups on the Structure, Charge Distribution, and Proton Affinity of the Retinal Schiff Base. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 5581–5590.

CAPÍTULO 2: New insights about phenothiazine dyes partitioning in aqueous two-phase systems.

ABSTRACT

Aqueous two-phase systems (ATPSs) have proven to be an efficient and environmentally safe method for extraction of chemical species. However, the solutes partition driven forces in these systems is still little understood. An approach to increase our knowledge is to study partitioning behavior of molecular probes with very similar chemical structure. A complete thermodynamic partitioning of methylene blue (MB), azure B (AZB), azure A (AZA) and thionine acetate (TA) dyes were investigated in poly(ethylene oxide) + salt + water ATPSs. Standard transfer parameters such as free energy change of transfer ($\Delta_{tr}G^0$), standard enthalpy change of transfer ($\Delta_{tr}H^0$), standard entropy change of transfer ($\Delta_{tr}S^0$) and its dependence on the dye structure, electrolyte nature and tie line length (TLL) were evaluated. For the first time we found that cations the concentrates in polymer enriched phase, with K values ranging from 6.16 to 225.60 ($4.16 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}G^0 < -13.47 \text{ kJ mol}^{-1}$). ATPS dyes partitioning were enthalpic drive, with $-11.40 \text{ kJ mol}^{-1} < \Delta_{tr}H^0 < -51.24 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $-4.93 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1} < T\Delta_{tr}S^0 < -38.78 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. $\Delta_{tr}H^0$ is negative and decrease as TLL increase, because dye-PEO interaction is attractive while dye-salt repulsive both of them mainly determined by benzene condensed ring.

Keywords: aqueous two-phase system; thermodynamic; phenothiazine dye; partition; driven force.

1 INTRODUCTION

Since 1958 with the pioneering work of Albertson, aqueous two-phase systems (ATPS) have proved to be an efficient and environmentally safe method for extraction and purification of a great number of chemical species, such as enzymes¹, proteins², metals^{3,4}, nanoparticles⁵, carbon nanotubes⁶, and synthetic^{7,8,9,10} and natural^{11,12} dyes. Despite these works, most of the papers investigating solutes partitioning is limited to investigate the feasibility of utilizing aqueous two-phase extraction for the separation and purification of the solutes^{8,13,14,15,16}. There are few studies that bring a systematic thermodynamic approach that enables the comprehension of the driving forces governing the transfer process of these solutes in the ATPS. Additionally, when the determination of thermodynamic parameters of partition are performed, the measurements are not made directly and experientially.

Da Silva et al. used the calorimetric measurements to determine thermodynamic parameters of partition of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ions in ATPSs formed by triblock copolymers and phosphate salts¹⁷. They showed that the transfer process for these anions is exothermic and enthalpically driven. Mageste *et al.* evaluated the partition of the natural dye norbixin in different ATPS systems formed with polymer/copolymer and salts¹¹. The norbixin partitioning in ATPS also release enthalpic energy during the transfer process, with values of transfer enthalpy change varying between -2.71 ± 0.30 and $-9.10 \pm 0.50 \text{ kJ mol}^{-1}$. However, exothermicity of solutes transfer processes is not a general trend. Studies of α -lactalbumin partition in ATPS containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate reported by Alcântara *et al.* indicated that the partitioning of α -la was accompanied by endothermic heat and was entropically driven¹⁸.

In view of the low number of thermodynamic studies describing the driving forces for solute distribution in ATPS, a systematic thermodynamic approach from a experimental point of view becomes necessary. A strategic approach for studying the driving forces that determine the partition behavior of solutes in ATPS is evaluate the partition behavior of chemical compounds with similar chemical structures, using them as molecular probes.

In this work, the phenothiazine dyes methilene blue (MB), azure B (AZB), azure A (AZA) and thionine acetate (TA) (Figure 1) were used as probes to evaluate the nature of the interactions associated with the dye partitioning on ATPS. We determine

the transfer thermodynamic parameters for the several dyes and their dependence on the following ATPS properties: TLL values, cation and anion structure.

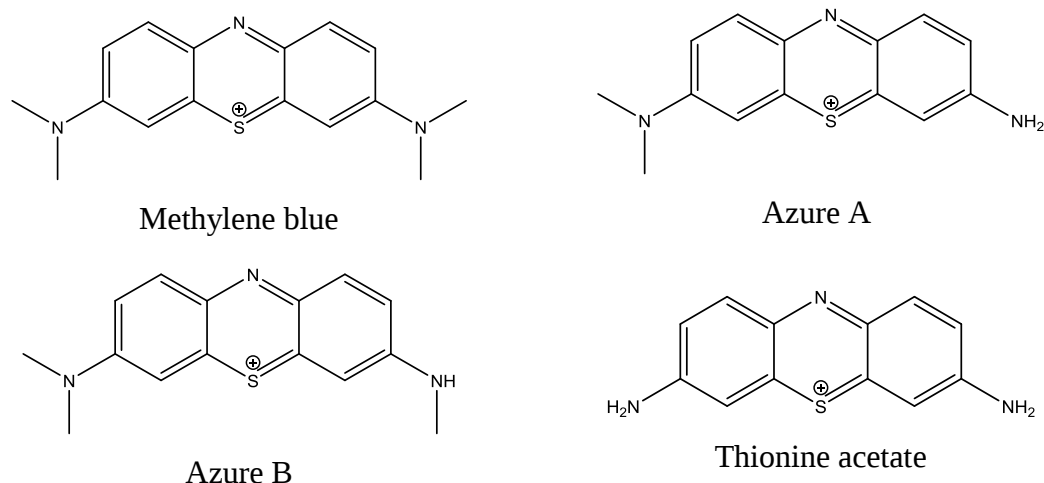


Figure 1. Chemical structures of phenothiazine dyes.

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Materials

Poly(ethylene oxide) (PEO), with a molar mass of 1500 g mol^{-1} was purchased from Synth (Brazil). The inorganic salts sodium sulfate (Na_2SO_4 ; 99.0%), magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), and lithium sulfate (Li_2SO_4 ; 99.0%), and the organic salts sodium tartrate (TartNa; $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 99.5%), and sodium citrate (CitNa; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 99.0%), were all purchased from Vetec (Brazil). The dyes MB, AZB, AZA and TA (purity > 98%) was purchased from Aldrich (USA). All chemicals used in this study were of analytical grade and used without further purification. Distilled water was used in all experiments.

2.2 Preparation of aqueous two-phase systems and determination of dyes (MB, AZA, AZB and TA) partition coefficients

The ternary mixtures compositions of ATPS used in the partitioning experiments were chosen based on the phase diagrams previously published^{19,20}. To achieve the desired compositional ratio for each ATPS, appropriate amounts of solutions PEO, salt

and water were taken into a graduated centrifuge tubes. The tubes were shaken and left to stand at 298.15 K, in a thermostatic bath (Microquimica, MQBTC 99-20), with an uncertainty of ± 0.1 K.

Once the system had achieved thermodynamic equilibrium, the two phases were collected separately for partitioning experiments. A total of 3.0 g of each phase were mixed with 60 μL of the phenothiazine dye solution stock ($3.5 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$) in glass tubes. The resultant concentration in the tubes was $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol kg}^{-1}$ to dyes investigated. For each tie line length (TLL) and each ATPS, three systems were prepared: the first being a blank without the addition of the dye, a sample and a replica. These systems were stirred manually for 3 min until the solutions became cloudy and then maintained under controlled temperature in a thermostatic bath at 298.15 K for a minimum of 24 h to reach thermodynamic equilibrium. Aliquots of the top and the bottom phases were collected with a syringe, and adequately diluted with distilled water for a spectrophotometric analysis at 664 nm (MB), 652 nm (AZB), 637 nm (AZA) and 604 nm (TA) using a Shimadzu digital double beam spectrometer (UV-2550).

The phenothiazine dyes partition coefficients (K) between the phases are determined by the concentration ratio of the analyte in each phase of the ATPS. In agreement with the Beer–Lambert law, the absorbance of the analyte at a specific wavelength is directly proportional to the dye concentration in dilute systems, where dimers are not formed. Thus, the partition coefficient (K) can be given as described in Equation 1.

$$K = \frac{(\text{Abs}^T) \cdot (\text{fd}^T)}{(\text{Abs}^B) \cdot (\text{fd}^B)} \quad (1)$$

Where (Abs^T) and (Abs^B) are the absorbances the dyes of the diluted top phase and the diluted bottom phase, respectively, discounting the absorbance of the corresponding blanks, and (fd^T) and (fd^B) are the dilution factors of the phases.

K was studied for different TLL values of each ATPS investigated. The TLL numerically expresses the difference in the intensive thermodynamic functions between the top and the bottom phases, at constant pressure and temperature. It is calculated using Equation 2:

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

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 in the top and bottom phases, respectively.

2.3 Thermodynamic parameters of dyes transfer

2.3.1 Dyes transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G^o$)

The standard Gibbs free energy change of transfer ($\Delta_{tr}G^o$) is the change in the Gibbs energy of the system when 1 mol of dye, under infinite dilution is transferred from the bottom phase to the top. For all ATPS studied, the $\Delta_{tr}G^o$ was obtained following the thermodynamic relationship:

$$\Delta_{tr}G^o = -RT \ln K. \quad (3)$$

Where R is the real gas constant and T is the absolute temperature, and K is the dyes partition coefficient.

2.3.2 Dyes transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H^o$)

Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to determine the dyes $\Delta_{tr}H^o$ from the bottom phase to the top phase the system. The experiments were conducted in a microcalorimeter CSC-4200 (Science Corp. Calorimeter).

The $\Delta_{tr}H^o$ values for MB, AZB and AZA in each TLL was obtained by the following steps: the energy associated with dilution effects (H_{ob}^{dil}), was determined by filling the reference and the sample cells with 1.80 mL of the bottom (or the top phase), and titrating the sample solution with fifteen consecutive injections of 15 μ L of dyes 5×10^{-4} mol kg^{-1} prepared in the bottom (or in the top phase) of ATPS. The flow of energy registered during the whole process was recorded as a power versus time curve, which was integrated to obtain the heat associated to the enthalpy change of each system (H_{ob}^{dil}). To discount the energy associated with friction effects (H_{ob}^f), the same

experiment were performed in the absence of the dyes. A gastight Hamilton syringe (250 μL) controlled by an instrument was utilized for the injections, and a stirrer helix stirring at 300 rpm was used throughout the experiment. Calorimetric experiment for the dye TA dye was not possible due its precipitation.

The values of excess enthalpy (H_{dye}^E) obtained for each injection were calculated by the following Equation:

$$H_{\text{dye}}^E = \frac{H_{\text{ob}}^{\text{dil}} - H_{\text{ob}}^f}{n}. \quad (4)$$

Where n is the number of moles of the dye after each injection.

The H_{dye}^E were plotted as a function of the dye concentration ($[\text{dye}]$), and the values of excess enthalpy of MB, AZB and AZA dyes for the infinite dilution condition ($H_{\text{dye}}^{E,\infty}$) were calculated extrapolating the $[\text{dye}]$ to zero. Then, the $\Delta_{\text{tr}}H^\circ$ values were obtained by using the following relationship:

$$\Delta_{\text{tr}}H^\circ = H_{\text{dye-TP}}^{E,\infty} - H_{\text{dye-BP}}^{E,\infty}. \quad (5)$$

Where $H_{\text{dye-TP}}^{E,\infty}$ and $H_{\text{dye-BP}}^{E,\infty}$ is the excess enthalpy of dyes at infinite dilution condition in top and bottom phases of ATPS.

2.3.3 Dyes transfer standard entropy change ($\Delta_{\text{tr}}S^\circ$)

The dyes (MB, AZB and AZA) entropy change of transfer ($\Delta_{\text{tr}}S^\circ$) was determined from the following classic thermodynamics relationship:

$$\Delta_{\text{tr}}G^\circ = \Delta_{\text{tr}}H^\circ - T\Delta_{\text{tr}}S^\circ. \quad (6)$$

Where $\Delta_{\text{tr}}G^\circ$ and $\Delta_{\text{tr}}H^\circ$ are values already known.

2.4 Measurement of fluorescence spectra

Fluorescence emission spectra of MB in the investigated solutions were taken on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, USA). The slits selected were 5 nm for excitation and 5 nm for emission, and the spectra were acquired

in the range from 630 to 850 nm at an excitation wavelength of 620 nm. All spectra were collected at 298.2 K using 10 mm quartz cells.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Dependence of the partition coefficient with the concentration of methylene blue

It is well known that the solute partition coefficient (K) is a thermodynamic parameter independent of solute concentration when a single chemical species is partitioned. However if chemical processes that change the nature of the solute distributed begin to occur, the K will vary with the concentration of the transferred species^{21,22}.

Methylene blue (MB) molecules in solution can self-interact to form aggregates such as dimer, and even higher order aggregates, which processes is influenced by several factors including the concentration, pH, temperature and solvent nature^{23,24}. To verify if MB partition coefficient depends on the concentration of solute, K values were determined for the MB concentration range of 2.5×10^{-5} to 8×10^{-4} mol kg⁻¹, in 5th TLL of the PEO 1500 + H₂O + Li₂SO₄ ATPS in 298.15 K, as shown in Figure 2.

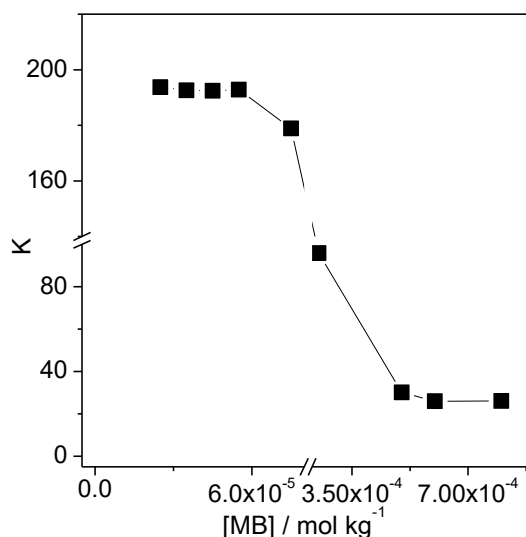


Figure 2. Methylene blue K values as function of its total concentration in PEO 1500 + H₂O + Li₂SO₄ ATPS in 5th TLL and 298.15 K.

In the $2.5 \times 10^{-5} \leq [\text{MB}] \leq 5.5 \times 10^{-5}$ mol kg⁻¹ range, the K values were constant however in $(5.5 \times 10^{-5} \leq [\text{MB}] \leq 5.0 \times 10^{-4})$ interval, K values decreases monotonically, from 192 to 26, while at $[\text{MB}] \geq 5.0 \times 10^{-4}$ mol kg⁻¹ the K values turns constant again.

The first plateau, at small MB concentration, indicate that possibly the partitioning specie was MB monomers while at higher MB concentration plateau MB dimers were distributed between both ATPS phases. The decrease in the K values observed showed that in this MB concentration interval there are a chemical equilibrium between MB monomers and dimers²⁵.

From fluorescence steady-state measurements of MB molecules we can to describe about the relative concentration of monomer and dimer present in both ATPS phases. This is possible because the fluorescence of monomer is self-quenched upon formation of dimers or even larger aggregates in solution, as the transition from lowest excited singlet state to the ground state is forbidden for such multi-molecular species^{26,27}. The MB monomer in aqueous solution, exhibits a fluorescence maximum at 684 nm with quantum yield of emission of 0.04 in water^{28,29}.

In order to confirm the presence of monomer and/ or dimers in all MB concentration studied in partitioning experiment, fluorescence spectroscopic was applied to measure the MB emission intensity in top and bottom phases of 5th TLL PEO 1500 + H₂O + Li₂SO₄ at 298.15 K, as shown in Figure 3.

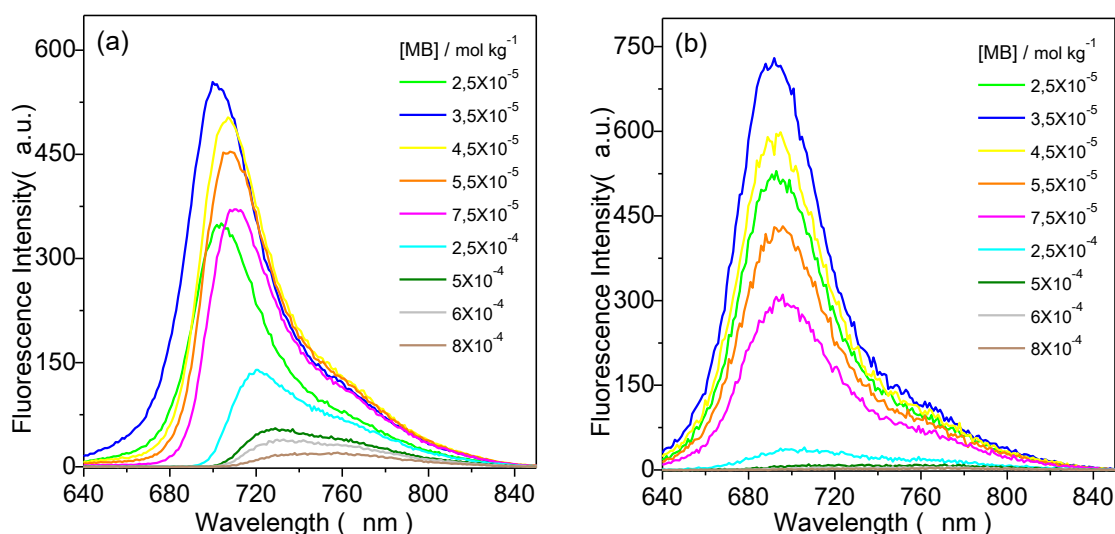


Figure 3. Emission spectra of different concentrations of MB (λ_{ex} 620 nm) in top (a) and bottom (b) phases of 5th TLL (51.67 % w/w) PEO 1500 + H₂O + Li₂SO₄, at 298.15 K.

A better way to analyze the fluorescence data obtained above is plotting MB maximum fluorescence as function of its concentration, as verified in Figure 4.

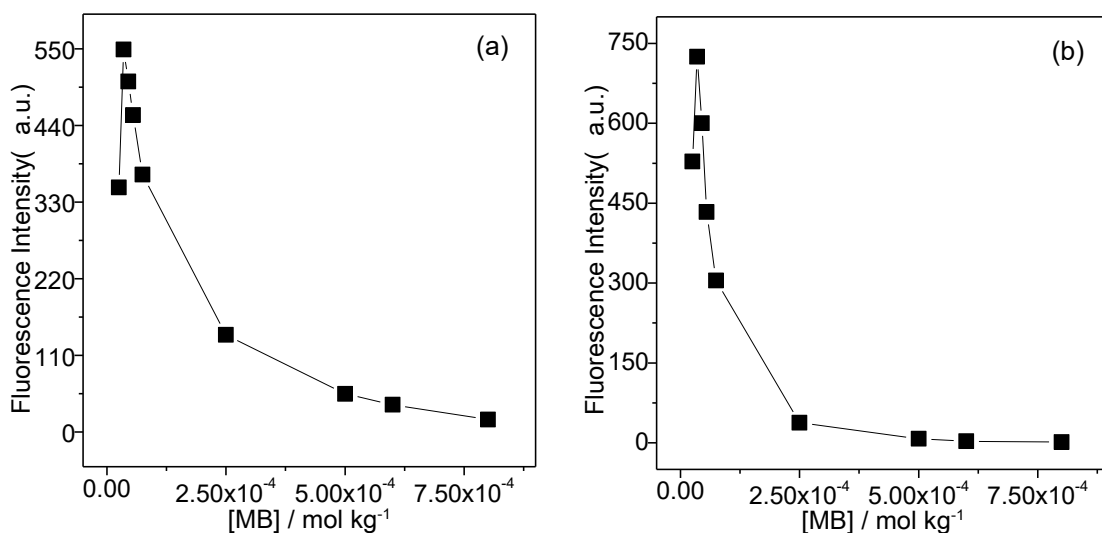


Figure 4. Maximum fluorescence intensity of MB versus its concentration in (a) top phase and the (b) bottom phase of 5th TLL PEO 1500 + H₂O + Li₂SO₄ ATPS, at 298.15 K.

For both ATPS phases, the MB concentration increase from of 2.5×10^{-5} to 3.5×10^{-5} mol kg⁻¹ led to the enhancement in dye fluorescence intensity from 350 to 550, caused by a increase in content of MB monomer. From then on the intensity of the emission band of dye decreased gradually in range from 3.5×10^{-5} to 5.0×10^{-4} mol kg⁻¹. This progressive quenching of fluorescence in agreement with a mechanism of equilibrium between monomers (fluorescent) and nonfluorescent dye aggregates in solution^{30,27}. Finally, MB florescence almost disappeared at a concentration range from 5.0×10^{-4} to 8.0×10^{-4} mol kg⁻¹ showing that in more concentrated solutions in that dimer predominate.

In order to ensure only MB monomer partitioning, in all experiment carried out this work the total concentration of dye in ATPS was set at 3.5×10^{-5} mol kg⁻¹.

3.2 Phenothiazine dyes partition thermodynamic

To further understand the driving forces that determine the distribution behavior of phenothiazine dyes in different ATPSs and the relationship between its structure and the K values, partition studies of three structurally similar dyes were carried out. Figure 5 shows K values of dyes MB, AZB, AZA and TA versus TLL for the ATPS comprising PEO 1500, MgSO₄, and H₂O at 298.15 K.

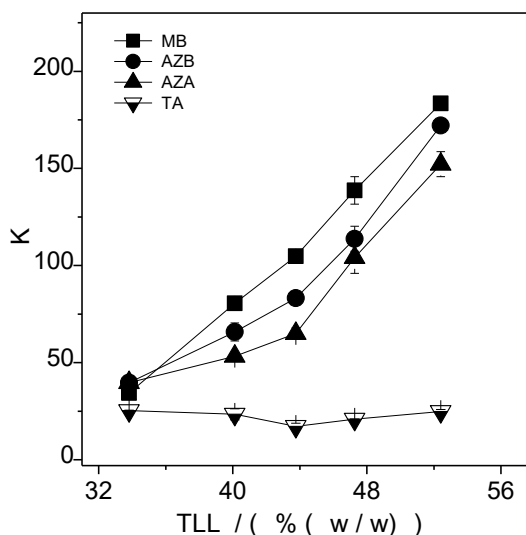


Figure 5. Partition coefficient of phenothiazine dyes versus TLL in PEO 1500 + MgSO₄ + H₂O, at 298.15 K.

All K were higher than one showing that all phenothiazine compounds concentrated in the ATPS top phases, with values following the order: MB > AZB > AZA > TA, showing that dye molecules with more methyl substituent have a large tendency to transfer from the bottom to the top phase of the ATPS. K values increase almost exponentially as TLL values increase for all dyes studied, except for TA.

Da Silva and coworkers³¹ studied the MB, AZA and AZB partition behavior in n-octanol/water biphasic system, demonstrating that all the compounds had the same partitioning behavior between aqueous and organic phases. i.e., independent of its chemical structure, it was observed negative values of distribution coefficient, $D_{\text{oct/water}}$ in acidic solution and positive values after pH 7.0. Showing higher dye transfer from aqueous solution to octanol phase at basic pH with $D_{\text{oct/water}}$ maximum values equal to 10. As the phenothiazine dyes partitioning coefficients measured in all ATPS investigated in our studies is large than that obtained in octanol/water systems, which is a biphasic systems with a higher (in relation to ATPS) hydrophobic/hydrophilic difference between both phases, we can conclude that hydrophobic interaction is not the only motriz power drives the dye distribution in ATPS.

All positive charged solute concentrated in ATPS bottom phases³², and in best of our knowledge this work is the first investigation showing cationic specie (phenothiazine ring) which spontaneously transfer from the bottom to the top ATPS phase. For a better understanding of the molecular interaction driving the dyes partitioning in PEO 1500 + MgSO₄ + H₂O ATPS, standard Gibbs free energy change of transfer, $\Delta_{\text{tr}}G^0$, was calculated by using the classical relationship ($\Delta_{\text{tr}}G^0 = -RT \ln K$).

The $\Delta_{tr}G^0$ values express the free energy change of the system when one mole of phenothiazine dyes is transferred from the bottom phase to the top phase. The $\Delta_{tr}G^0$ for all dyes as a function of TLL for the ATPS comprising PEO 1500, $MgSO_4$, and H_2O , at 298.15 K, are presented in Figure 6.

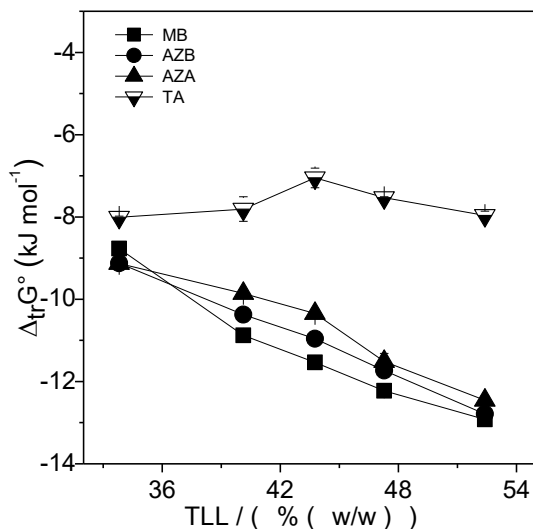


Figure 6. Phenothiazine dyes $\Delta_{tr}G^0$ as function of the TLL for PEO 1500 + $MgSO_4$ + H_2O ATPS, at 298.15 K.

Except to TA molecules which $\Delta_{tr}G^0$ values were almost constant and around to 8.0 kJ mol^{-1} , for all others dyes the $\Delta_{tr}G^0$ decreased almost linearly with the increase in TLL ranging from $(-8.7 \text{ to } -12.9 \text{ kJ mol}^{-1})$ for MB, $(-9.1 \text{ to } -12.7 \text{ kJ mol}^{-1})$ for AZB, $(-9.1 \text{ to } -12.4 \text{ kJ mol}^{-1})$ for AZA. The negative values of $\Delta_{tr}G^0$ indicate a preferential interaction of the dye molecules with ATPS top phases components.

The partition behavior of the phenothiazine dyes also was evaluated in the system formed by PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O , as presented in Figure 7.

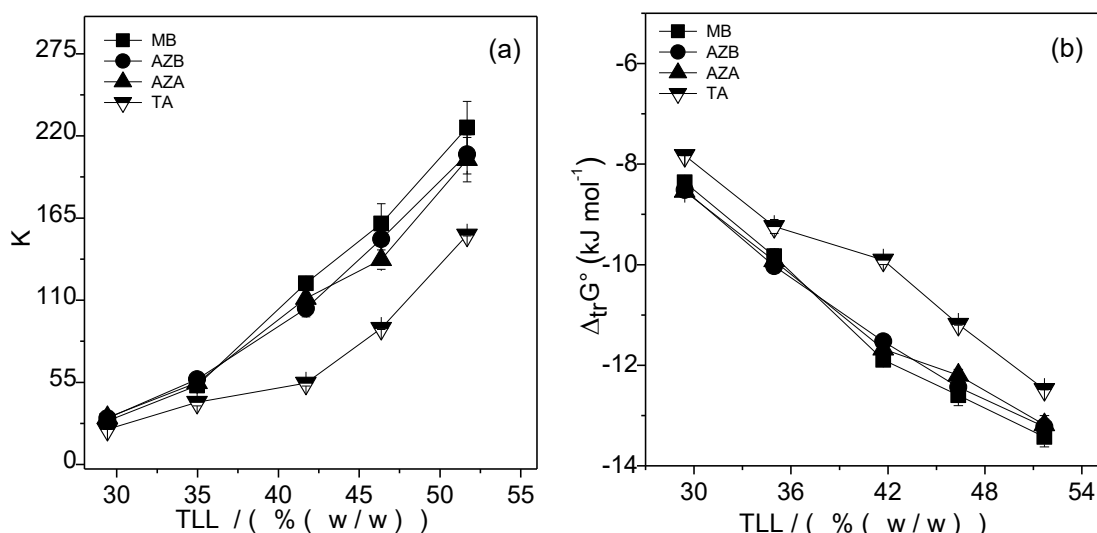


Figure 7. K (a) and $\Delta_{tr}G^\circ$ (b) values for phenothiazine dyes versus TLL in PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS, at 298.15 K.

The four dyes concentrated in ATPS top phase as is showed by negative $\Delta_{tr}G^\circ$ values that decreased almost linearly with the increase in TLL (Figure 6b). As observed in PEO 1500 + MgSO₄ + H₂O ATPS, the partition coefficients of MB, AZB and AZA increase as TLL enhance (Figure 6a). On the other hand for TA in the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS K values were not constant as showed for in PEO 1500 + MgSO₄ + H₂O ATPS, increasing as TLL became enlarged. In the lithium ATPS, methyl substitution on the amino group of dyes has lower effect on dyes K values, when compared this effect in magnesium ATPS.

To better understand the driven forces governing the phenothiazine dyes partition process, it is necessary evaluating the factors that contribute to $\Delta_{tr}G^\circ$, i.e. $\Delta_{tr}H^\circ$ and $\Delta_{tr}S^\circ$.

The contribution of the enthalpic molecular interaction to dyes transfer in ATPS was measured using ITC. The ITC is a very sensitive technique that can detect very low energy fluxes ($\approx 0.2 \mu W$), associated with different thermodynamic processes which occur with very small system enthalpic changes including energy dilution of solutes³³. As water is generally the majority component in different ATPS⁷ is very important to understand specific interaction between dyes and water molecules.

The excess partial molar enthalpy H_{dye}^E , can provide a starting point for understanding the solute-solute and solute-solvent interactions. These excess enthalpies express the interaction asymmetry present in a real solution when compared with symmetrical interactions ($E_{A-A} = E_{B-B} = E_{A-B}$) occurring in a hypothetical ideal solution. In order to compare the self-interaction of different dyes (MB, AZB and AZA) as well as

their interaction with the water, the H_{dye}^E versus dye concentration ($[\text{dye}]$) plots are shown in Figure 8.

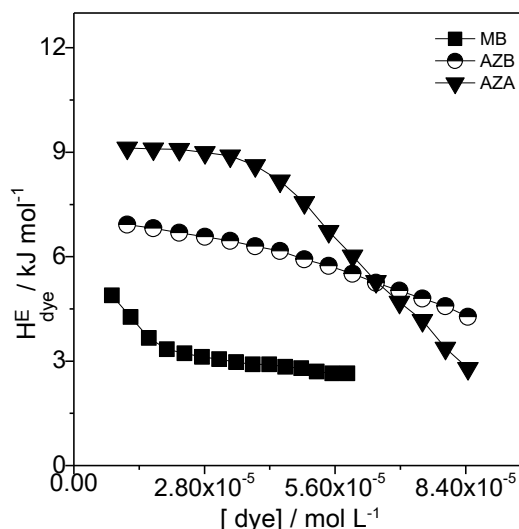


Figure 8. Phenothiazine H_{dye}^E as a function of the $[\text{dye}]$ measured in H_2O at 298.15 K.

Generally the slope ($\partial H_{\text{dye}}^E / \partial [\text{dye}]$) of the $H_{\text{dye}}^E \times [\text{dye}]$ curves express the contribution of dye-dye interaction in solution for the system enthalpy. In the $[\text{dye}]$ range where $\partial H_{\text{dye}}^E / \partial [\text{dye}]$ is higher, dye-dye interaction is strength enough to lead to the formation of dye dimers, as was confirmed by fluorescence measurement (data not showed).

In order to determine the dyes–solvent interactions, the excess enthalpy of dyes for the infinite dilution condition ($H_{\text{dye}}^{E,\infty}$) were calculated by extrapolating the $H_{\text{dye}}^E \times [\text{dye}]$ curves to the zero dye concentration through of exponential expression. The $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ values of dyes in water were: $7.28 \pm 0.37 \text{ kJ mol}^{-1}$ for MB, $7.14 \pm 0.19 \text{ kJ mol}^{-1}$ for AZB, and $9.19 \pm 0.65 \text{ kJ mol}^{-1}$ for AZA. The difference in methyl group number on the phenothiazine fused rings does not change significantly the values of $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ suggesting that water solvation occur mainly around the dyes planar rings. The process of dye-water mixing at infinite dilution condition can be understood on the basis of the water cavity formation and dye-water interactions³³. The $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ was endothermic showing that the energetic cost of water/water interactions break (cavity formation) is higher than the energy released during the dye solvation process.

To describe the energy of interactions between dyes molecules and ATPS phase components, the H_{dye}^E versus dye concentration data for phenothiazine dyes compounds

were obtained in ATPS top and bottom phases. Figure 9 shows the titration curves of a MB or AZB or AZA dyes concentrates solution into pure solvent, using as solvent the top or bottom ATPS phases. The excess partial molar enthalpy H_{dye}^E for each injection is plotted against the [dyes] in top (a, c, e) and bottom (b, d, f) phases for five TLL of PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS at 298.15 K.

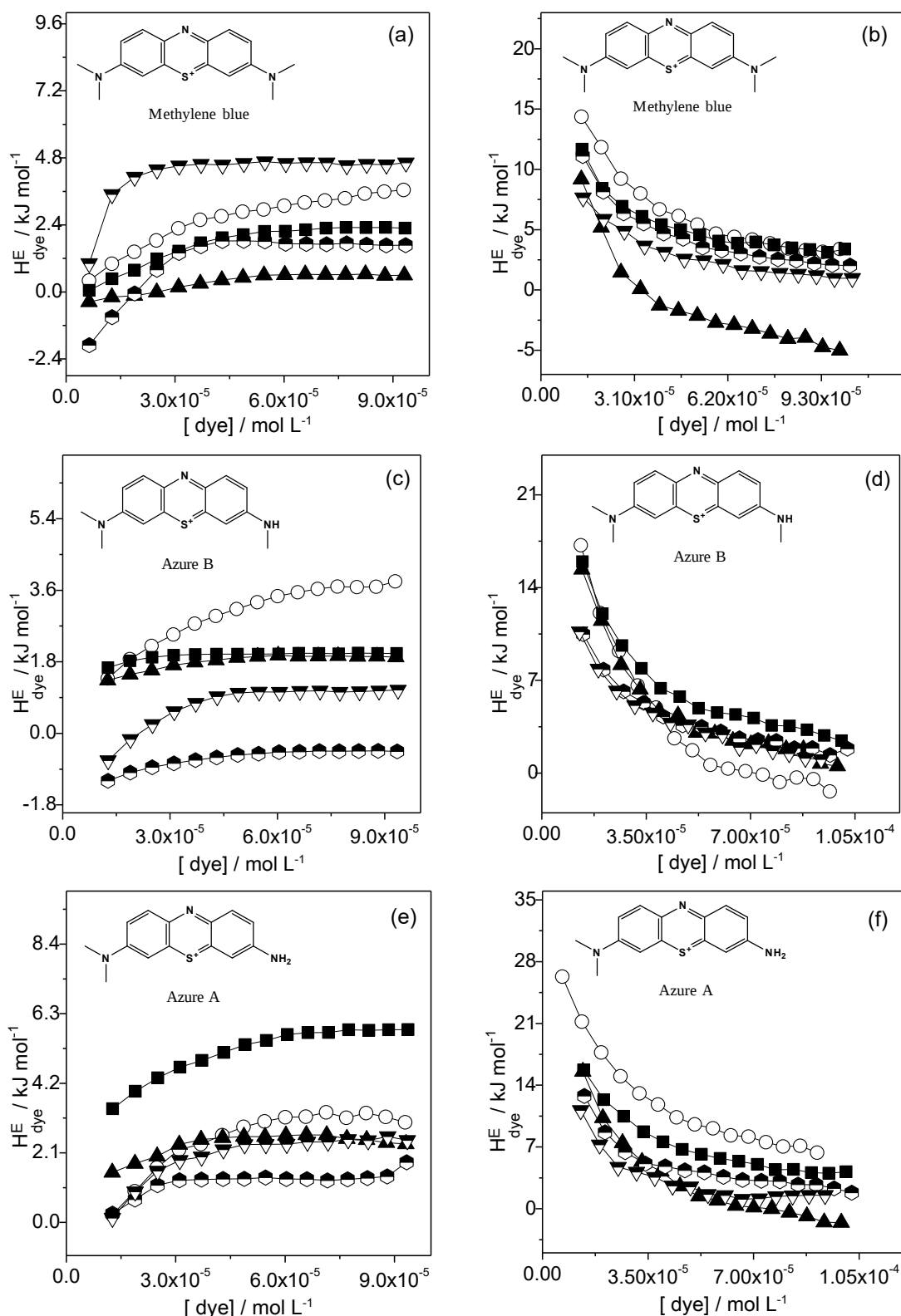


Figure 9. H_{dye}^E values of dyes MB (a, b), AZB (c, d) and AZA (e, f) as function of $[\text{dye}]$, in top (a, c, e) and bottom (b, d, f) phases for PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS: ($\circ$) 1th TLL, ($\blacktriangle$) 2th TLL, ($\blacksquare$) 3th TLL, ($\blacklozenge$) 4th TLL, (∇) 5th TLL.

For all TLL values with increase of dyes concentration H_{dye}^E become more positive in top phases (Figure 8a, 8c and 8e), while in bottom phases the enhancement of dye content make H_{dye}^E values less positive, (Figure 8b, 8d and 8f). These result

shows that the dye-dye interaction is enthalpically unfavorable ($\partial H_{\text{dye}}^E / \partial [\text{dye}] > 0$) in the ATPS enriched polymer and favorable ($\partial H_{\text{dye}}^E / \partial [\text{dye}] < 0$) in the ATPS salt rich phases.

To determine the energy of interactions between dye and the ATPS components, the values of $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ were obtained by extrapolation of $H_{\text{dye}}^{E,\infty} \times [\text{dye}]$ curves to zero dye concentration. The $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ values of dyes MB, AZA and AZB in top and bottom phases for five TLL of the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS are shown in Table 1 together with dye-PEO ($E_{\text{d-EO}}$) and dye-salt ($E_{\text{d-salt}}$) interaction energies calculated by these equation $E_{\text{d-EO}} = H_{\text{dye}}^{E,\infty}(\text{TP}) - H_{\text{dye}}^{E,\infty}(\text{water})$ and $E_{\text{d-salt}} = H_{\text{dye}}^{E,\infty}(\text{BP}) - H_{\text{dye}}^{E,\infty}(\text{water})$.

Table 1. $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ values of MB, AZA and AZB in top (TP) and bottom (BP) phases, and $E_{\text{d-EO}}$ and $E_{\text{d-salt}}$, for five TLL of the PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS at 298,15 K.

PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O - MB				
TLL % (w/w)	$H_{\text{MB}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ TP	$E_{\text{MB-EO}} / \text{kJ mol}^{-1}$	$H_{\text{MB}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ BP	$E_{\text{MB-salt}} / \text{kJ mol}^{-1}$
29.43	-0.30 ± 0.01	-7.58 ± 0.38	22.84 ± 0.62	15.56 ± 0.99
34.97	-0.50 ± 1.38	-7.78 ± 1.75	25.34 ± 1.21	18.06 ± 1.58
41.71	-0.74 ± 0.44	-8.02 ± 0.82	27.60 ± 0.89	20.32 ± 1.26
46.36	-3.33 ± 1.50	-10.61 ± 1.88	34.01 ± 5.68	26.73 ± 6.05
51.67	-1.39 ± 1.39	-8.67 ± 1.76	40.42 ± 2.52	33.14 ± 2.89
PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O - AZB				
TLL % (w/w)	$H_{\text{AZB}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ TP	$E_{\text{AZB-EO}} / \text{kJ mol}^{-1}$	$H_{\text{AZB}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ BP	$E_{\text{AZB-salt}} / \text{kJ mol}^{-1}$
29.43	0.14 ± 0.11	-7.00 ± 0.30	28.88 ± 1.07	21.74 ± 1.26
34.97	0.84 ± 0.07	-6.30 ± 0.26	28.60 ± 1.73	21.46 ± 1.92
41.71	0.44 ± 0.62	-6.70 ± 0.81	28.55 ± 0.38	21.41 ± 0.57
46.36	-1.74 ± 0.04	-8.88 ± 0.23	27.19 ± 1.85	20.05 ± 2.04
51.67	-3.06 ± 0.34	-10.20 ± 0.53	28.07 ± 1.50	20.93 ± 1.69
PEO 1500 + Li ₂ SO ₄ + H ₂ O - AZA				
TLL % (w/w)	$H_{\text{AZA}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ TP	$E_{\text{AZA-EO}} / \text{kJ mol}^{-1}$	$H_{\text{AZA}}^{E,\infty} / \text{kJ mol}^{-1}$ BP	$E_{\text{AZA-salt}} / \text{kJ mol}^{-1}$
29.43	-1.77 ± 0.39	-10.96 ± 1.04	31.01 ± 0.75	21.82 ± 1.40
34.97	-0.04 ± 0.36	-9.23 ± 1.01	30.48 ± 1.45	21.29 ± 2.10
41.71	-3.32 ± 0.91	-12.51 ± 1.56	32.38 ± 1.34	23.19 ± 1.99
46.36	-3.10 ± 0.29	-12.29 ± 0.94	36.82 ± 1.50	27.63 ± 2.15
51.67	-8.61 ± 0.96	-17.8 ± 1.61	42.63 ± 3.08	33.44 ± 3.73

The $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ values of phenothiazine dyes in top phase were in general negative in all TLL, with exception for the AZB that presented positive values, but in low magnitude, for the first three TLL. The dyes $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ in top phase can be understood mainly as the net energy of the following process: broken of water-water, polymer-polymer and polymer-water interactions for cavity formation, and subsequent solvation

of the dye molecule by polymer and water. These negative $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ values indicate that more energy is released in the dyes solvation processes than that absorbed in the cavity formation. However in bottom phase the dyes $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ were endothermic for all TLL, showing that the energy cost of disruption of salt-salt, water-water, and water-salt interactions, is much higher as compared to the energy released at dyes-salt and dyes-water interactions.

In order to directly determine the dye-PEO ($E_{\text{d-EO}}$) and dye-salt ($E_{\text{d-salt}}$) interaction energy, the dye $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ in water was discounted of dye $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ in top and bottom phase of ATPS respectively, as determined by Equation 7 and 8:

$$E_{\text{d-EO}} = H_{\text{dye-TP}}^{E,\infty} - H_{\text{dye-H}_2\text{O}}^{E,\infty} \quad (7)$$

$$E_{\text{d-salt}} = H_{\text{dye-BP}}^{E,\infty} - H_{\text{dye-H}_2\text{O}}^{E,\infty} \quad (8)$$

Where $H_{\text{dye-TP}}^{E,\infty}$ and $H_{\text{dye-BP}}^{E,\infty}$ is the excess partial molar enthalpy of dyes at infinite dilution condition in top and bottom phases, respectively measured in PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS, and $H_{\text{dye-H}_2\text{O}}^{E,\infty}$ is the same parameter for solutes dissolved in pure water.

As showing in Table 1, the value of $E_{\text{d-EO}}$ are negative for all dyes indicating an enthalpically favorable specific dye-EO interaction. In general, with increase of TLL, the $E_{\text{d-EO}}$ values were almost constant. However $E_{\text{d-salt}}$ values are positive and increased with the TLL enhancement, with exception of AZB in which values varied little demonstrating that the dye-salt interaction is repulsive. This enthalpically unfavorable interaction is probably due to electrostatic repulsion between salt cation and dye condensed ring cation and/or caused by dye hydrophobic nature which make it less soluble in an enriched salt phase. The $E_{\text{d-EO}}$ and $E_{\text{d-salt}}$ values point out that dye concentration in the ATPS top phase occur due to an attractive interaction between dye and PEO and a repulsive interaction between dye and electrolytes. Interestingly, dye chemical structure difference weak effect on the dye-EO and dye-salt enthalpic interaction energy values showing that this interaction is mainly promoted by the dye condensed ring.

Using $H_{\text{dye}}^{E,\infty}$ measured in both ATPS phases it is possible to calculate the solute standard enthalpy change of transfer, $\Delta_{\text{tr}}H^o$ by applying the following

equation $\Delta_{tr}H^o = H_{dye-TP}^{E,\infty} - H_{dye-BP}^{E,\infty}$. The $\Delta_{tr}H^o$ parameter expressed the enthalpy change of the system when one mole of dye at infinitely dilute condition is transferred from the bottom phase to the top phase of ATPS. At this thermodynamic conditions (infinity dilution), we can assume that solute partitioning will not alter the compositions of the equilibrium phases, that way, the enthalpy change is related only with interaction changes occurring during transfer process of solute. Figure 10 shows $\Delta_{tr}H^o$ as a function of TLL for PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS, at 298.15 K.

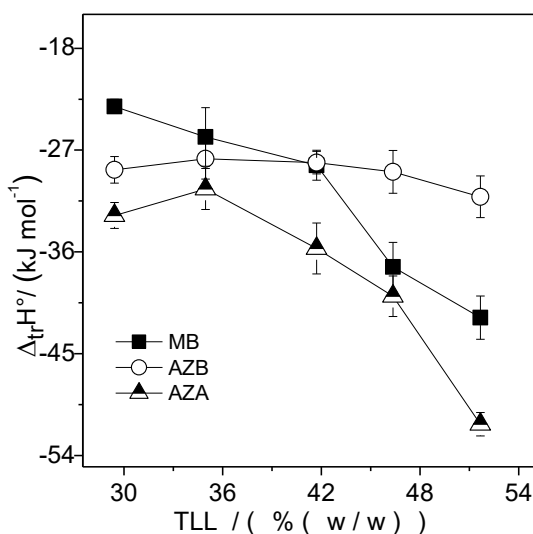


Figure 10. $\Delta_{tr}H^o$ of phenothiazine dyes versus TLL for PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O ATPS, at 298.15 K.

For all TLL values dye transference processes is exothermic and as the TLL increases, the $\Delta_{tr}H^o$ becoming more negative ranging from -23.14 ± 0.63 to -51.24 ± 1.04 kJ mol⁻¹, showing that more concentrated ATPS phases is (salt in bottom phase and polymer in top phase) more repulsive interaction in salt enriched phase and higher intense attractive forces in polymer rich phase occur.

To the best of our knowledge, these results are the first enthalpic measurement of the phenothiazine dyes transfer process in an ATPS. However the partition behavior of varied solutes in different ATPS systems has been studied using this parameter thermodynamic,^{11,34,35}. Mageste and coworkers¹¹, has used microcalorimetry to determine $\Delta_{tr}H^o$ of the natural dye norbixin in different ATPS formed by mixture of aqueous solution of a PEO or copolymer L35 and a sodium tartrate or succinate salt, and reported values of that parameter ranging from -2.71 ± 0.30 to -9.10 ± 0.50 kJ mol⁻¹. Norbixin $\Delta_{tr}H^o$ values were less negative than that measured to phenothiazine dyes, showing that the presence of aromatic ring increases the dye PEO and dye- salt interaction.

By using the classical thermodynamic equation, $\Delta_{tr}G^0 = \Delta_{tr}H^0 - T\Delta_{tr}S^0$, it is possible to calculate $\Delta_{tr}S^0$. The term $\Delta_{tr}S^0$ relates to an increase or decrease in the number of different possibilities for distributing the components present in the system, which occurs due to the transfer of dye molecules from the bottom phase to the top phase. The $\Delta_{tr}S^0$ values for MB, AZB, and AZA as a function of TLL for PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS, at 298.15 K, are presented in Figure 11.

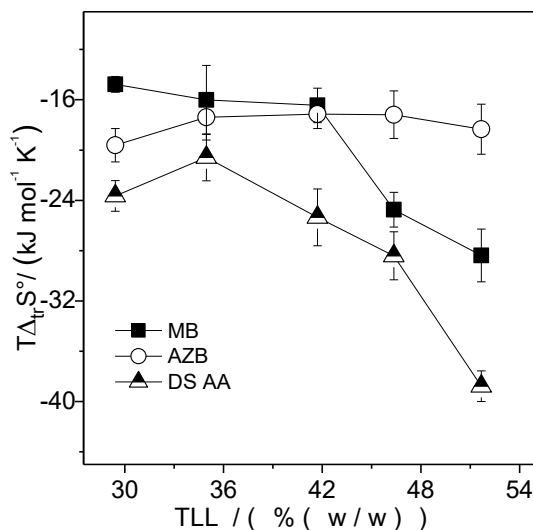


Figure 11. Phenothiazine dyes $\Delta_{tr}S^0$ versus TLL for PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O ATPS, at 298.15 K.

The phenothiazine dyes transfer from the bottom phase to the top phase occurs with $\Delta_{tr}S^0 < 0$ for all TLL values, showing that the processes of transference of these dyes were directed by enthalpic contributions. This decrease in the entropies of the systems could be attributed to a low number of molecular configurations present in the ATPS top phase when compared to the number of possible molecular distribution in ATPS bottom phase, mainly caused by a small number of water molecules located in the polymer enriched phase³⁶. $\Delta_{tr}S^0$ become more negative as TLL increase because water concentration difference between bottom and top phase increase as the TLL values enhance¹⁹. Despite of decrease system entropy occur for a lot solute transfer processes in different ATPS^{11,34,17}, this $\Delta_{tr}S^0$ decrease is not of the only trend. Alcântara and coworkers¹⁸ reported studies of α -lactalbumin and β -lactoglobulin partition in ATPS containing PEO and sodium polyacrylate. The thermodynamic analysis this work indicated that the partitioning of α -la was accompanied by endothermic heat and was entropically driven, while β -lg partitioning was accompanied by exothermic heat and was enthalpically driven at low polymer concentrations and entropically driven at high polymer concentrations.

3.3 Cation effect on phenothiazine dyes partition behavior

As generally occur to other solutes partitioning in ATPS^{7,12,11}, the phenothiazine dyes K value and its dependence on the TLL could be affected by the nature of the ATPS electrolyte. Cation effect are strong on the partitioning behavior of different solutes between ATPS phases and follow the order $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{+2}$ ^{7,12}. The cation effect is explained by some authors due the existence of PEO chain absorbed by ATPS cation forming a pseudopolycation which interact attractively (mainly eletrostatically) with anion species³⁷. The pseudopolycation presence in top ATPS phase should make arise repulsive forces against the phenothiazine dye (cation condensed ring) concentration on that phase. Probably the preferential transference of phenothiazine dyes from the bottom phase to the top phase should be attribute to specific interactions (dipole-dipole, charge transfer and hydrophobic) between dye and PEO chain which in magnitude overcoming the dye-pseudopolycation electrostatic repulsive interaction.

Figure 12 shows the K values of MB (12.a) and AZB (12.b) and AZA (12.c) and TA (12.d) plotted against TLL for the ATPS comprising PEO 1500 + H₂O and different sulfate salts (MgSO₄, Na₂SO₄ and Li₂SO₄) at 298.15 K.

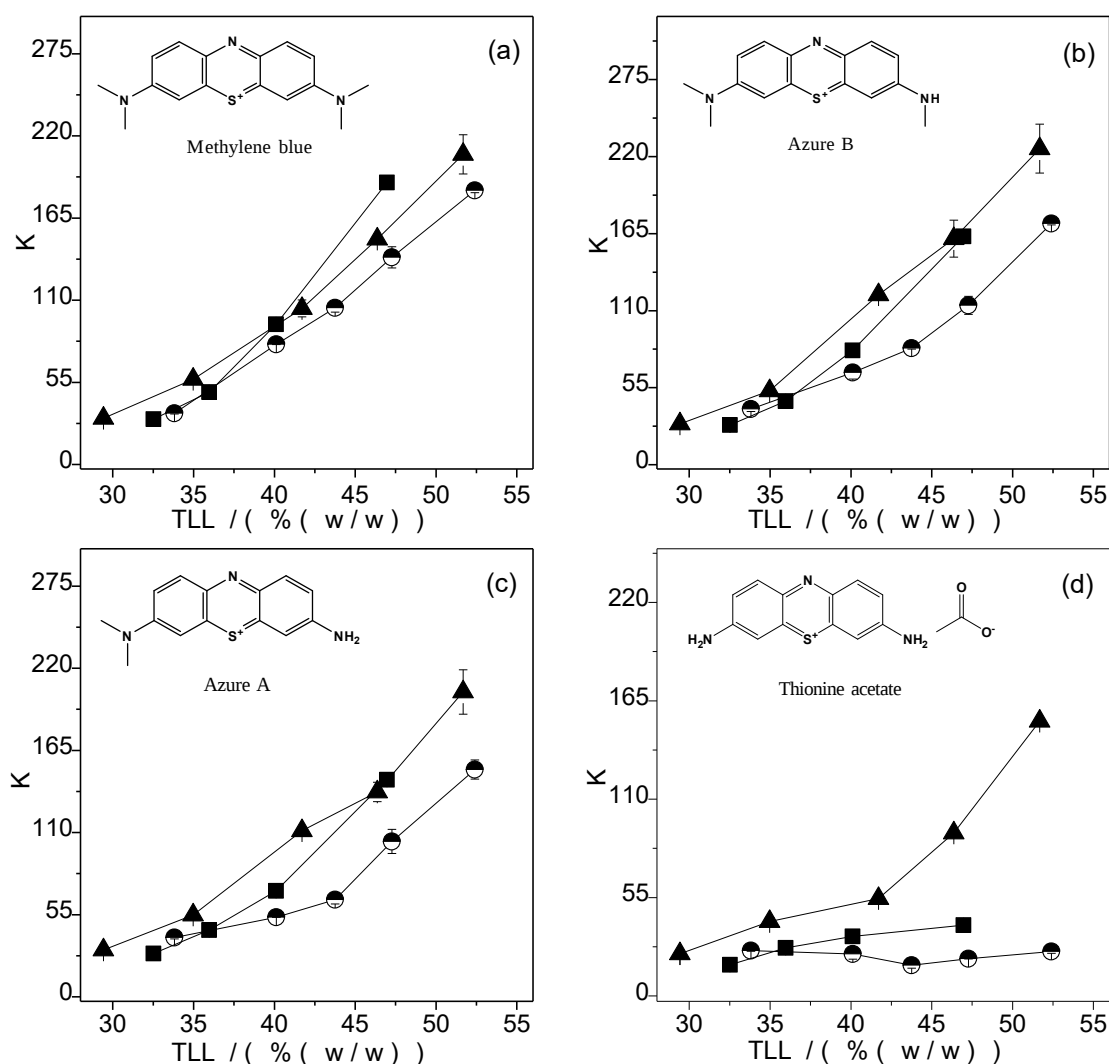


Figure 12. Cation effect on K values for the MB, AZB, AZA and TA partition in the PEO 1500 + MgSO_4 + H_2O (●), H_2O PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O (■), and PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O (▲) ATPSs, at 298.15 K.

The phenothiazine dyes K values were few affected by change in the cation nature suggesting that dye- pseudopolycation repulsive electrostatic interaction has small contribution on the molecular interactions driving these dyes partitioning. Despite of this small cation effect it is interestingly to observe that the less is the number of methylene group in the dye chemical structure, the smaller is the cation effect on the dyes partitioning behavior. This cation effect dependence on the phenothiazine chemical structure could be caused by the electronic induced effect attributed to the $(-\text{CH}_3)$ group³⁸. According to this model $(-\text{CH}_3)$ group should increase the electron flux trough the phenol condensed ring decreasing the net positive charge around the sulfur atom. The positive charge on the dyes molecules and the intensive of the dye-pseudopolycation electrostatic repulsion should follow the order: $\text{MB} < \text{AZA} < \text{AZB} < \text{TA}$, which is exactly the same order observed in the cation effect on the K values

dependence on the dye chemical structure. This cation effect on the dye K values can be evaluated in terms of thermodynamic parameters, as presented in Table 2.

Table 2. Phenothiazine dye transfer thermodynamic parameters obtained for PEO 1500 + MgSO₄ + H₂O (TLL: 40.12 % w/w), PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O (TLL: 40.10 % w/w), PEO 1500 + Li₂SO₄ + H₂O (TLL: 41.71 % w/w), ATPS at 298.15 K.

MB			
	Li ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-11.89 ± 0.04	-11.26 ± 0.04	-10.87 ± 0.09
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-28.34 ± 1.33	-24.48 ± 1.06	-31.50 ± 0.96
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-16.44 ± 1.37	-13,22 ± 1.10	-20,94 ± 2.26
AZB			
	Li ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-11.52 ± 0.13	-10.91 ± 0.09	-10.37 ± 0.17
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-28.11 ± 1.00	-35.09 ± 1.42	-34.39 ± 1.09
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-17.15 ± 1.13	-24,53 ± 1.51	-24,53 ± 1.26
AZA			
	Li ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-11.68 ± 0.01	-10.56 ± 0.08	-9.85 ± 0.00
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-35.70 ± 2.25	-34.62 ± 1.34	-31.31 ± 2.26
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-25.35 ± 2.26	-23,57 ± 1.42	-20,94 ± 2.26
TA			
	Li ⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-9.91 ± 0.09	-8.69 ± 0.21	-7.81 ± 0.30
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-	-	-
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-	-	-

- Experimental measure was not possible due precipitation.

$\Delta_{tr}G^\circ$, $\Delta_{tr}H^\circ$ and $T\Delta_{tr}S^\circ$ values are negative, showing that for all ATPSs dyes transfer process is enthalpically driven. In addition, cation effect is not observable in $\Delta_{tr}G^\circ$ parameter, but it is pronounced in $\Delta_{tr}H^\circ$ and $T\Delta_{tr}S^\circ$. It's clear that cation effect is a enthalpic-entropic compensated process³⁶, i.e, a change $\Delta_{tr}H^\circ$ is neutralized by a modification in $T\Delta_{tr}S^\circ$ that occur in order to keep almost constant $\Delta_{tr}G^\circ$.

3.4 Anion effect on the phenothiazine dyes partition behavior

In order to determine the relative cation/anion contributions to the phenothiazine dyes transfer process in ATPSs, we also have evaluated the anion effect on the thermodynamic parameters associated with the phenothiazine dyes partition process.

The effect of anion on the partition of MB, AZA and AZB in ATPS formed by PEG 1500 and sodium salts are shown in Figure13. TA partitioning experiment in PEO 1500 + Na₂C₄H₄O₆ + H₂O, PEO 1500 + Na₃C₆H₅O₇ + H₂O, and PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O ATPS was not possible due the dye decomposition process.

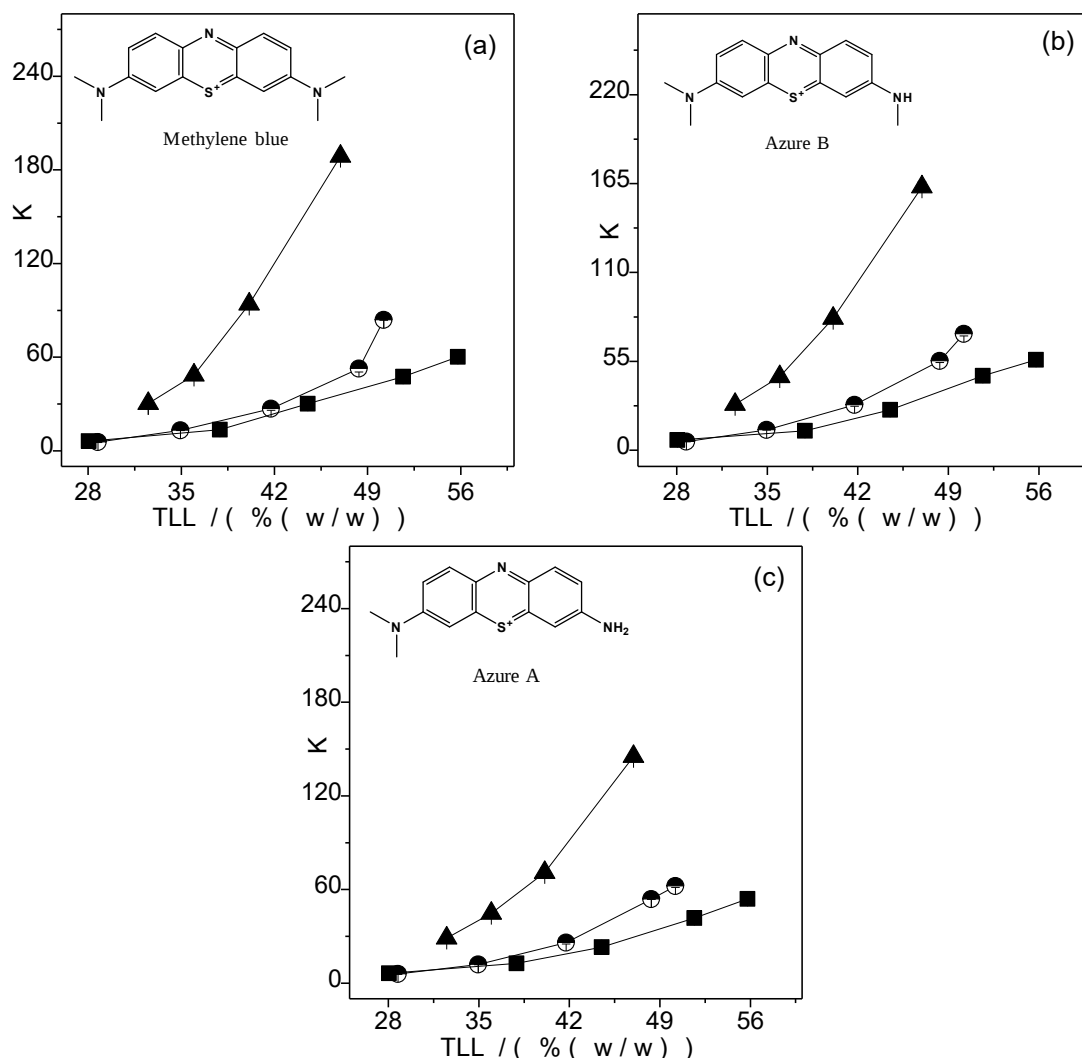


Figure 13. Anion effect on K values for the MB, AZB, and AZA partition in the PEO 1500 + Na₂C₄H₄O₆ + H₂O (●), PEO 1500 + Na₃C₆H₅O₇ + H₂O (■), and PEO 1500 + Na₂SO₄ + H₂O (▲) ATPSs, at 298.15 K.

Contrary to cation effect, the anion nature strongly influences the K values of phenothiazine dyes mainly when change inorganic anion (SO₄²⁻) for organic anion. This anion effect increase with increase in TLL values. For all dyes the increase in the K values follows the order: K (SO₄²⁻) > K (C₄H₄O₆²⁻) > K (C₆H₅O₇³⁻). This strong sulfate effect in phenothiazine dyes partition behavior may be explained by considering that SO₄²⁻ anion has a higher charge density than the tartrate and citrate, causing a more

repulsive dye-salt interaction in bottom phase that favors the transfer of dyes for top phase. These results can be evaluated in terms of $\Delta_{tr}G^\circ$, $\Delta_{tr}H^\circ$ and $T\Delta_{tr}S^\circ$ thermodynamic parameters, according to Table 3.

Table 3. Phenothiazine dye transfer thermodynamical parameters obtained for PEO 1500 + $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ + H_2O (TLL: 41.74 % w/w), PEO 1500 + $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ + H_2O (TLL: 38.00 % w/w), PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O (TLL: 40.10% w/w), ATPS at 298.15 K.

MB			
	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$	SO_4^{-2}
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-8.17 ± 0.11	-6.47 ± 0.01	-11.26 ± 0.04
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-22.99 ± 0.59	-11.40 ± 0.26	-24.48 ± 1.06
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-14.82 ± 0.60	-4.93 ± 0.27	-13,22 ± 1.10
AZB			
	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$	SO_4^{-2}
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-8.26 ± 0.07	-6.29 ± 0.13	-10.91 ± 0.09
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-30.71 ± 1.25	-24.68 ± 1.22	-35.09 ± 1.42
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-22.45 ± 1.32	-18.39 ± 1.35	-24,53 ± 1.26
AZA			
	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$	SO_4^{-2}
$\Delta_{tr}G^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-8.08 ± 0.09	-6.17 ± 0.16	-10.56 ± 0.08
$\Delta_{tr}H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	-33.31 ± 0.87	-24.01 ± 0.49	-34.62 ± 1.34
$T\Delta_{tr}S^\circ$ (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	-25.23 ± 0.96	-17.84 ± 0.65	-23,57 ± 1.42

All transfer thermodynamic parameter were negative following the order: $\text{SO}_4^{-2} < \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2} < \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3}$ indicating that dye-salt repulsion intensity should follow the inverse order, e.i, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3} < \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{-2} < \text{SO}_4^{-2}$.

4 CONCLUSION

Thermodynamic studies about the partitioning of MB, AZA, AZB and TA used as probes, in different ATPS, gave for the first time, experimental insights about the driving force of the cationic dye transfer process in these aqueous biphasic systems. Based on transfer thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^\circ$, $\Delta_{tr}H^\circ$, e $T\Delta_{tr}S^\circ$), was concluded that the phenothiazine dyes transfer process from the bottom to the top ATPS phase is exothermic and occurs with the reduction of the entropy of the system, be therefore, enthalpically driven. Specific attractive dye - PEO interactions and repulsive dye - electrolytes interaction determines the negativity of enthalpy, while $T\Delta_{tr}S^\circ$ negative values were attributed to the dyes transfer from a higher (bottom phase) to the lower (top phase) configurational entropy region. For the first time it was demonstrated that specific interactions (dipole-dipole, charge transfer and hydrophobic) between a dye cationic and PEO chain is able to overcome the repulsive interaction of this cation with pseudopolycation formed in top phase of system. Interestingly, dye chemical structure difference had insignificant effect on the dye-EO and dye-salt enthalpic interaction energy values showing that this interaction is mainly promoted by the dye condensed ring. The present investigation revealed that polymeric molecules that interact favorably with the partitioned species increases the partition of these solutes in ATPS, and that this process is very dependent on the nature of the electrolyte.

REFERENCES

- (1) Duarte, A. W. F.; Lopes, A. M.; Molino, J. V. D.; Pessoa, A.; Sette, L. D. Liquid–liquid Extraction of Lipase Produced by Psychrotrophic Yeast *Leucosporidium Scottii* L117 Using Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, 156, 215–225.
- (2) Chow, Y. H.; Yap, Y. J.; Anuar, M. S.; Tejo, B. A.; Ariff, A.; Show, P. L.; Ng, E. P.; Ling, T. C. Interfacial Partitioning Behaviour of Bovine Serum Albumin in Polymer-Salt Aqueous Two-Phase System. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, 934, 71–78.
- (3) Akama, Y.; Ito, M.; Tanaka, S. Selective Separation of Cadmium from Cobalt, Copper, Iron (III) and Zinc by Water-Based Two-Phase System of Tetrabutylammonium Bromide. *Talanta* **2000**, 53 (3), 645–650.
- (4) Patrício, P. R.; Cunha, R. C.; Rodriguez Vargas, S. J.; Coelho, Y. L.; Mendes da Silva, L. H.; Hespanhol da Silva, M. C. Chromium Speciation Using Aqueous Biphasic Systems: Development and Mechanistic Aspects. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, 158, 144–154.
- (5) Fischer, I.; Morhardt, C.; Heissler, S.; Franzreb, M. Partitioning Behavior of Silica-Coated Nanoparticles in Aqueous Micellar Two-Phase Systems: Evidence for an Adsorption-Driven Mechanism from QCM-D and ATR-FTIR Measurements. *Langmuir* **2012**, 28 (45), 15789–15796.
- (6) Khripin, C. Y.; Fagan, J. A.; Zheng, M. Spontaneous Partition of Carbon Nanotubes in Polymer-Modified Aqueous Phases. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (18), 6822–6825.
- (7) de Alvarenga, J. M.; Fideles, R. A.; da Silva, M. V.; Murari, G. F.; Taylor, J. G.; de Lemos, L. R.; Dias Rodrigues, G.; Mageste, A. B. Partition Study of Textile Dye Remazol Yellow Gold RNL in Aqueous Two-Phase Systems. *Fluid Phase Equilib.* **2015**, 391, 1–8.
- (8) Ferreira, A. M.; Coutinho, J. a P.; Fernandes, A. M.; Freire, M. G. Complete Removal of Textile Dyes from Aqueous Media Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 128, 58–66.
- (9) Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanaka, S. The Study of the Partitioning Mechanism of Methyl Orange in an Aqueous Two-Phase System. *Talanta* **1999**, 48 (5), 1133–1137.

- (10) Tong, A. J.; Dong, J. J.; Li, L. Di. Aqueous Two-Phase Extraction System of Sodium Perfluorooctanoate and Dodecyltriethylammonium Bromide Mixture and Its Application to Porphyrins and Dyes. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 390 (1-3), 125–131.
- (11) Mageste, A. B.; Senra, T. D. A.; da Silva, M. C. H.; Bonomo, R. C. F.; da Silva, L. H. M. Thermodynamics and Optimization of Norbixin Transfer Processes in Aqueous Biphasic Systems Formed by Polymers and Organic Salts. *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 98, 69–77.
- (12) Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; Ferreira, G. M. D.; da Silva, M. D. C. H.; da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A. Aqueous Two-Phase Systems: An Efficient, Environmentally Safe and Economically Viable Method for Purification of Natural Dye Carmine. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (45), 7623–7629.
- (13) Merchuk, J. C.; Andrews, B. a; Asenjo, J. a. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, 711 (1-2), 285–293.
- (14) Shu, Y.; Gao, M.; Wang, X.; Song, R.; Lu, J.; Chen, X. Separation of Curcuminoids Using Ionic Liquid Based Aqueous Two-Phase System Coupled with in Situ Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Talanta* **2016**, 149, 6–12.
- (15) Silva, M. F. F.; Fernandes-Platzgummer, A.; Aires-Barros, M. R.; Azevedo, A. M. Integrated Purification of Monoclonal Antibodies Directly from Cell Culture Medium with Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 132, 330–335.
- (16) Almeida, M. R.; Passos, H.; Pereira, M. M.; Lima, ??lvaro S.; Coutinho, J. A. P.; Freire, M. G. Ionic Liquids as Additives to Enhance the Extraction of Antioxidants in Aqueous Two-Phase Systems. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 128, 1–10.
- (17) da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H.; J??nior, J. A.; Martins, J. P.; Reis Coimbra, J. S. dos; Minim, L. A. Hydrophobic Effect on the Partitioning of [Fe(CN)5(NO)]²⁻ and [Fe(CN)6]³⁻ Anions in Aqueous Two-Phase Systems Formed by Triblock Copolymers and Phosphate Salts. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, 60 (1), 103–112.
- (18) Alcântara, L. A. P.; Amaral, I. V.; Bonomo, R. C. F.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. do C. H.; Minim, V. P. R.; Minim, L. A. Partitioning of α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from Cheese Whey in Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene Glycol) and Sodium Polyacrylate. *Food Bioprod. Process.* **2014**, 92 (4), 409–415.

- (19) Martins, J. P.; Carvalho, C. D. P.; Silva, L. H. M. Da; Coimbra, J. S. D. R.; Silva, M. D. C. H. Da; 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 (1), 238–241.
- (20) Patrício, P. da R.; Mageste, A. B.; de Lemos, L. R.; de Carvalho, R. M. M.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H. Phase Diagram and Thermodynamic Modeling of PEO+organic salts+H₂O and PPO+organic salts+H₂O Aqueous Two-Phase Systems. *Fluid Phase Equilib.* **2011**, 305 (1), 1–8.
- (21) Da Silva, L. H. M.; Loh, W. Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos E Aplicações Para Partição/purificação de Proteínas. *Quim. Nova* **2006**, 29 (6), 1345–1351.
- (22) Leo, a.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem. Rev.* **1971**, 71 (6), 525.
- (23) Homem-de-Mello, P.; Mennucci, B.; Tomasi, J.; Da Silva, a. B. F. The Effects of Solvation in the Theoretical Spectra of Cationic Dyes. *Theor. Chem. Acc.* **2005**, 113, 274–280.
- (24) Tafulo, P. a R.; Queirós, R. B.; González-Aguilar, G. On the “Concentration-Driven” Methylene Blue Dimerization. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, 73 (2), 295–300.
- (25) Florence, N.; Naorem, H. Dimerization of Methylene Blue in Aqueous and Mixed Aqueous Organic Solvent: A Spectroscopic Study. *J. Mol. Liq.* **2014**, 198, 255–258.
- (26) Search, H.; Journals, C.; Contact, A.; Iopscience, M. Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation Association of Dye Molecules and Its Spectroscopic Manifestation. **1979**, 1076.
- (27) RABINOWITCH, E.; Epstein, L. F. Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene blue1. *J. Am. Chem. {...}* **1941**, 69 (5), 69–78.
- (28) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. Methylene Blue in Photodynamic Therapy: From Basic Mechanisms to Clinical Applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, 2 (3), 175–191.
- (29) Santin, L. R. R.; dos Santos, S. C.; Novo, D. L. R.; Bianchini, D.; Gerola, A. P.; Braga, G.; Caetano, W.; Moreira, L. M.; Bastos, E. L.; Romani, A. P.; et al. Study between Solvatochromism and Steady-State and Time-Resolved

Fluorescence Measurements of the Methylene Blue in Binary Mixtures. *Dye. Pigment.* **2015**, *119*, 12–21.

- (30) Jockusch, S.; Turro, N. J.; Tomalia, D. a. Aggregation of Methylene Blue Adsorbed on Starburst Dendrimers. *Macromolecules* **1995**, *28* (22), 7416–7418.
- (31) da Silva, J. S.; Junqueira, H. C.; Ferreira, T. L. Effect of pH and Dye Concentration on the N-Octanol/water Distribution Ratio of Phenothiazine Dyes: A Microelectrode Voltammetry Study. *Electrochim. Acta* **2014**, *144*, 154–160.
- (32) Rogers, R. D.; Bauer, C. B. Partitioning Behavior of Group 1 and 2 Cations in Poly(ethylene Glycol)-Based Aqueous Biphasic Systems. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* **1996**, *680* (1-2), 237–241.
- (33) Kumar, A.; Rai, G. Elucidation of Ionic Interactions in the Protic Ionic Liquid Solutions by Isothermal Titration Calorimetry. *J. Phys. Chem. B* **2014**, asap.
- (34) Da Silva, L. H. M.; Da Silva, M. C. H.; De Aquino, R. A. N.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Enthalpic Interaction as a 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* **2006**, *110* (46), 23540–23546.
- (35) Frenking, G.; Wichmann, K.; Fro, N.; Grobe, J. Nature of the Metal - Ligand Bond in $\text{M}(\text{CO})_5\text{PX}_3$ Complexes (M) Cr, Mo, W; X) H, Me, F, Cl): Synthesis, Molecular Structure, and Quantum-Chemical Calculations. **2008**, *2* (16), 2921–2930.
- (36) Johansson, H.-O. O.; Karlström, G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. a. Driving Forces for Phase Separation and Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *711* (1-2), 3–17.
- (37) da Silva, L. H. M.; Loh, W. 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* **2000**, *104* (43), 10069–10073.
- (38) Tajkhorshid, E.; Suhai, S. Influence of the Methyl Groups on the Structure, Charge Distribution, and Proton Affinity of the Retinal Schiff Base. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 5581–5590.