

LUCIANA DE OLIVEIRA REIS LEITE

**TERMODINÂMICA DE PARTIÇÃO DO CORANTE NATURAL CARMIM DE
COCHONILHA EM DIFERENTES SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

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

T

L533t
2010

Leite, Luciana de Oliveira Reis, 1985-

Termodinâmica de partição do corante natural carmim de
cochonilha em diferentes sistemas aquosos bifásicos /
Luciana de Oliveira Reis Leite. – Viçosa, MG, 2010.
xv, 51f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 45-51.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Carmim - Análise. 3.
Carmim - Purificação. 4. Química ambiental. 5. Separação
(Tecnologia). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 543.55

LUCIANA DE OLIVEIRA REIS LEITE

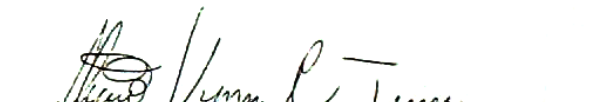
TERMODINÂMICA DE PARTIÇÃO DO CORANTE NATURAL CARMIM DE
COCHONILHA EM DIFERENTES SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

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: 19 de julho de 2010.



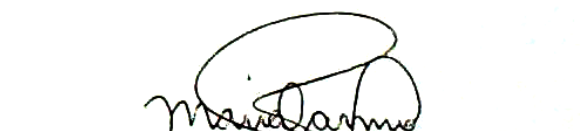
Prof. Jairo Tronto



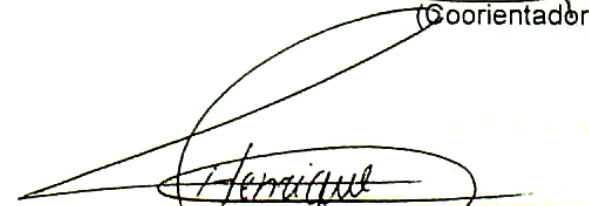
Prof. Alvaro Vianna N. de Carvalho Teixeira
(Coorientador)



Profª Ana Clarissa dos S. Pires



Profª Maria do Carmo Espanhol da Silva
(Coorientadora)



Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Orientador)

Aos meus queridos pais,

Dedico este trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu fiel companheiro, que me capacitou para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro concedido a este projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

A empresa Chr Hansen pela doação das amostras de carmim.

A meus pais pelo apoio constante, pela paciência de escutar os desabafos e suportar a saudade.

Ao meu irmão, cunhada e sobrinhas pela compreensão na minha ausência.

Ao Professor Luis Henrique pela orientação, conselhos e confiança e também pelo exemplo como professor!

A Professora Carminha pela paciência nos treinamentos e o olhar de incentivo!

Aos colegas do grupo de pesquisa, QUIVECOM. Em especial, a Aparecida e Guilherme Max, pelos conselhos, críticas e sugestões. Este trabalho também é de vocês!

Ao Professor Álvaro Vianna pelos conselhos e conversas descontraídas e permissão para utilização dos equipamentos.

Aos colegas da MICROFLUÍDICA. Em particular, ao Júlio César (Adrenalina) e Guilherme Milagres pelo acompanhamento durante os experimentos.

Ao meu querido primo José Carlos (Carlinhos), pelo apoio e visão de futuro! E a minha “prima-irmã” Beulla, pelo carinho em todos os momentos!

Ao tio Lucas e família pelo acolhimento nesta cidade.

Aos amigos da Igreja Cristã Maranata, pelas constantes orações!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução	1
1.1.1. Corante Natural Carmim de Cochonilha: Origem, Estrutura Química e História	1
1.1.2 Métodos de Extração do Carmim	3
1.1.3 Aplicações e Métodos de identificação, determinação e quantificação de Ácido Carmínico em diversas matrizes	7
1.1.4 Funcionalidade	10
1.1.5 Toxicidade e Reações Adversas	10
1.1.6 Legislação e Restrição de Uso	11
2. Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs)	13
2.1 Processos envolvidos na formação dos SABs	15
2.2 Teoria de Partição de solutos em SABs	16
2.2.1 SABs utilizados para a partição de corante	17
2.2.2 Copolímeros tribloco e sua utilização em SABS	19
3. Objetivos	20
3.1 Objetivos Específicos	20
4. Materiais	21
4.1 Reagentes	21

4.2 Experimentos de Partição -----	21
4.3 Determinação do coeficiente de partição (K_c) -----	22
4.4 Medidas Calorimétricas -----	22
5. Resultados-----	25
5.1 Diagrama de Fase-----	25
5.2 Influência do Eletrólito formador do SAB na partição do carmim -----	28
5.2.1 Efeito do Ânion-----	29
5.2.2 Efeito do Cátion-----	32
5.3 Efeito do aumento da hidrofobicidade das macromoléculas sobre a partição do corante natural carmim -----	34
5.4 Parâmetros Termodinâmicos da partição do carmim-----	39
6. Conclusões -----	44
7. Referências Bibliográficas-----	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\Delta_{tr}G$ - Variação da energia livre de Gibbs de transferência

$\Delta_{tr}H$ - Variação da entalpia de transferência

$\Delta_{tr}S$ - Variação da entropia de transferência

AC - Ácido carmínico

AC-AI - Laca

AcetNa - Acetato de sódio

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Cas-MB - Sonda molecular de ácido carmínico

CitNa - Citrato de sódio

CitNH₄ - Citrato de amônio

CLA - Comprimento da linha de amarração

ELL - Extração líquido-líquido

ESI-MS - Espectrometria de massas eletrospray

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FI - Fase inferior

FS - Fase superior

F68 - Copolímero tribloco (EO)₈₀(PO)₃₀(EO)₈₀ massa molar média 8400 g.mol⁻¹

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IDA - Ingestão diária aceitável

K_c - Coeficiente de partição do carmim

K_s - Coeficiente de partição de um soluto

LA - Linha de amarração

LB - Linha binodal

L35 - Copolímero tribloco (EO)₁₁(PO)₁₆(EO)₁₁ massa molar média 1900 g mol⁻¹

L64 - Copolímero tribloco (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃ massa molar média 2900 g mol⁻¹

MBs - Molecular beacons

Na₂CO₃ - Carbonato de sódio

PC - Ponto crítico

PEO - Poli (óxido de etileno)

SABs - Sistemas Aquosos Bifásicos

TartNa - Tartarato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural do Ácido Carmínico -----	2
Figura 2 - Fórmula Estrutural do Corante natural Carmim -----	2
Figura 3 - Esquema das etapas do processo de extração do carmim a partir do inseto -----	4
Figura 4 - Fluxograma do processo de produção de carmim de cochonilha utilizado no estudo de fatores significativos proposto por Carvalho -----	5
Figura 5 - Fluxograma do processo estabelecido para a extração do corante de cochonilha proposto por Carvalho -----	6
Figura 6 - Diagrama de fase em coordenadas retangulares -----	13
Figura 7 - Estrutura química do copolímero PEO-PPO-PEO -----	19
Figura 8 - Termograma de Potência em função do tempo referente a transferência do carmim no SAB formado por copolímero F68 e sal tartarato de sódio -----	23
Figura 9 - Diagrama de fase para o SAB formado por F68/Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ /H ₂ O, a 25 °C -----	27
Figura 10 - Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de sais de sódio com copolímero tribloco L35, a 25 °C -----	29
Figura 11 - Valores de variação da Energia Livre de transferência ($\Delta_{tr}G$) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de diferentes sais de sódio com copolímero tribloco L35, a 25°C -----	31
Figura 12 - Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco L35 com sais de citrato de Sódio e amônio, a 25°C -----	32

Figura 13 - Pseudopolication formado por interações eletrostáticas entre o cátion e o segmento EO do polímero formador do SAB -----33

Figura 14 – Valores de variação da Energia Livre de transferência ($\Delta_{tr}G$) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco com sais de citrato de sódio e amônio, a 25°C -----33

Figura 15 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas -----35

Figura 16 – Valores de $\Delta_{tr}G$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas -----36

Figura 17 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas -----37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites máximos permitidos de uso do carmim em alimentos -----12

Tabela 2 - Valores de CLA calculados para SABs formados por diferentes polímeros e o sal tartarato de sódio -----25

Tabela 3 - Valores de CLA calculados para SABs formados por diferentes polímeros e o sal citrato de sódio -----26

Tabela 4 - Valores de CLA calculados para SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (carbonato e Acetato) e amônio (citrato)-----26

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos de transferência do corante carmim em SABs formados por diferentes macromoléculas e o sal tartarato de sódio-----41

RESUMO

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, M. S., Univesidade federal de Viçosa, julho de 2010. **Termodinâmica de partição do corante natural carmim de cochonilha em diferentes sistemas aquosos bifásicos.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadores: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira e Maria do Carmo Hespanhol da Silva.

Atualmente, corantes e pigmentos são largamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. Devido a diversos corantes sintéticos terem sido considerados carcinogênicos, a demanda por corantes naturais tem crescido. Dentro deste contexto, o pigmento vermelho extraído do corpo seco das fêmeas do inseto *Dactylopius Coccus* Costa (Cochonilha) tem recebido grande atenção. O componente majoritário presente no pigmento extraído é o ácido carmínico que representa aproximadamente 20 % da massa do corpo do inseto. O ácido carmínico é considerado um corante funcional, pois pode ser usado não somente como corante alimentício, mas também pode proteger os alimentos contra deterioração por oxidação. A extração do ácido carmínico é geralmente estabelecida pela complexação de alumínio e cálcio em solução aquosa e o complexo formado é conhecido como carmim. A presença de impurezas neste processo influencia diretamente a qualidade do corante. Para solucionar este problema alguns trabalhos têm procurado desenvolver metodologias de purificação do corante carmim que satisfaçam as expectativas e necessidades das indústrias e dos consumidores. Uma alternativa poderosa e ecologicamente correta para purificação de solutos que tem surgido nos últimos anos é a extração aquosa utilizando sistemas aquosos bifásicos (SABs). Estes são obtidos quando dois polímeros hidrossolúveis ou polímero e sal são dissolvidos em água até uma concentração crítica em que duas fases imiscíveis são formadas. Recentemente, Mageste e colaboradores introduziram os SABs como alternativa para a purificação do corante carmim. Os autores avaliaram o comportamento de partição do carmim em diferentes SABs formados pela mistura de soluções de polímero/copolímero e sal. Esta pesquisa revelou que as moléculas de carmim concentram-se na fase rica em polímero/copolímero de cada sistema. Este resultado tem sido atribuído às

interações intermoleculares entre as moléculas de carmim e as moléculas de polímero/copolímero. A proposta do trabalho é elevar a partição do carmim em SABs para aumentar a eficiência de extração deste soluto. Para isso, o coeficiente de partição do carmim (K_c) foi avaliado para diversos SABs e os parâmetros termodinâmicos de transferência do corante foram obtidos ($\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$ and $\Delta_{tr}G$).

.

.

ABSTRACT

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, M. S., Univesidade federal de Viçosa, julho de 2010. **Thermodynamic partition of carmine natural dye in several Aqueous Two Phase Systems**. Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-Advisers: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Maria do Carmo Hespanhol da Silva

Nowadays, dyes and pigments are largely utilized in the industries foods, cosmetics and drugs. Because several synthetic colorants have been considered carcinogenic and toxic to health, the demand for natural dyes has increased. Within this context, the natural red pigment extracted of dried bodies of female insect *Dactylopius Coccus* Costa (cochineal) has received large attention. The major component of the pigment extracted from cochineal is carminic acid which represents approximately 20% of insect body mass. It is considered functional because not only to may be used as a food colorant but also it to protect food against the deterioration by oxidations.

The extraction of carminic acid is commonly performed by use of complexation with aluminum and calcium in aqueous solution and the complex formed is known as carmine. The presence of impurities in this process directly influences the quality of the dye. For solve this problem, some works have searched to develop powerful methodologies for purification of carmine dye to satisfy the expectations and needs of industry and consumers.

A powerful and correct ecologically alternative for the purification of solutes that has emerged in the last years is aqueous two-phase extraction. Aqueous two-phase systems (ATPS) are obtained when two water-soluble polymers or a polymer and a salt are dissolved in water beyond a critical concentration at which two immiscible phases are formed.

In a recent work, Mageste et al. introduced ATPS as alternative for purification of carmine dye. These authors evaluated the partitioning behavior of carmine in different ATPS formed by mixture of aqueous solution of a polymer (or copolymer) and a salt. It was revealed that Carmine molecules concentrate in the polymer/copolymer-rich phase of such systems. This result has been

attributed to enthalpic molecular interactions between carmine molecules and polymer/copolymer molecules.

This work has the purpose of improve the knowledge of carmine partitioning behavior in aqueous two-phase systems to increase the efficiency of ATPS in the separation of this solute. For this, partition coefficient of carmine (K) was evaluated for several ATPS and thermodynamic parameters of transference of dye ($\Delta_{tr}H$, $\Delta_{tr}S$ and $\Delta_{tr}G$) have been obtained.

1. Introdução

A demanda por corantes naturais cresce a cada dia, pois a população tem evitado o consumo de produtos (principalmente alimentos) que são coloridos artificialmente. Os corantes sintéticos podem desencadear processos alérgicos e desenvolver tumores, desta forma, a indústria tem utilizado corantes naturais em detrimento aos sintéticos. Nesta substituição, o corante natural carmim de cochonilha tem encontrado espaço devido a sua estabilidade. O seu consumo já chegou a movimentar 75 milhões de dólares ao ano.¹

Existem diversas técnicas de extração e de purificação deste corante. Neste contexto, os sistemas aquosos bifásicos (SABs) se mostraram eficientes já que o carmim particiona preferencialmente para a fase superior destes.¹ A água é o componente principal, o que demonstra a potencialidade da utilização dos sistemas aquosos bifásicos em detrimento às extrações líquido-líquido (ELL) convencionais que em sua maioria fazem uso de solventes orgânicos tóxicos seguindo os princípios da química verde.

1.1 Corante natural carmim de Cochonilha: origem, estrutura química e história

O carmim de cochonilha ou simplesmente carmim é um corante vermelho obtido das fêmeas dessecadas do inseto *Dactylopius coccus* Costa conhecido popularmente como cochonilha.

Este inseto pertence à família *Dactylopiidae*, que está amplamente distribuída e cujos membros vivem em associação. O *Dactylopius coccus* Costa vive como parasita sobre cactus dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, especialmente *Nopalea cochenillifera* de habitat fundamentalmente na América do Sul e América Central.²

As fêmeas adultas possuem em seu interior um líquido avermelhado com um teor aproximado de 20% em ácido carmínico (Figura1).

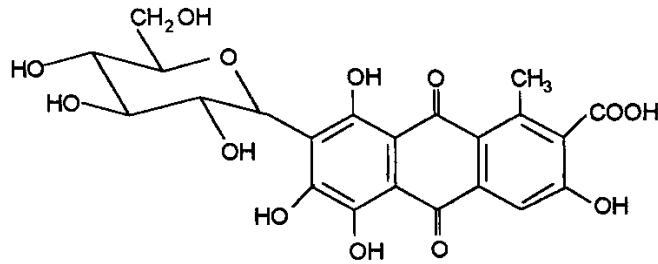


Figura 1 – Fórmula estrutural do Ácido Carmínico

O ácido carmínico é um composto orgânico derivado da antraquinona, especificamente uma hidroxiantraquinona ligada a uma unidade de glicose, cuja estereoquímica foi recentemente definida. Sua nomenclatura oficial é ácido 7-β-D-glicopiranosil-9,10-diidro-3,5,6,8-tetrahidroxil-1-metil-9,10-dioxo-2-antracencarboxílico ($C_{22}H_{20}O_{13}$, $PM = 492,39 \text{ g.mol}^{-1}$). A extração do ácido carmínico é feita a partir das fêmeas secas do inseto e a complexação deste com os íons alumínio e cálcio forma o pigmento natural Carmim conhecido como laca (Figura 2), de grande importância comercial.²

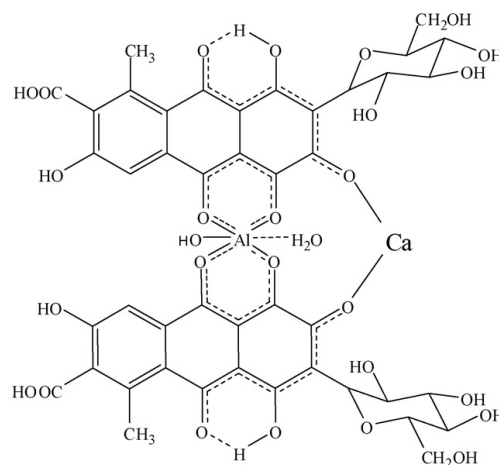


Figura 2 – Fórmula Estrutural do Corante natural Carmim.

Dapson propôs uma revisão para esclarecer a terminologia que aparecem nos catálogos dos produtores sem uma descrição nítida: produtos a base de cochonilha (base products), extrato de cochonilha (cochineal extract) e ácido carmim estável (acid-stable carmine). Existe diferença entre o material cru oriundo dos corpos secos das fêmeas do inseto, entre o ingrediente ativo de cor vermelha que aparece em produtos comerciais de marcas científicas e

entre o complexo metálico coordenado dos íons alumínio e/ou cálcio com ácido carmínico com outros compostos vitais para usos específicos de um determinado produto geralmente produzido diretamente a partir da cochonilha que é vendido como pigmento insolúvel precipitado com cálcio ou outros íons metálicos.⁴ Sendo estes os termos que devem ser utilizado respectivamente: cochonilha, ácido carmínico e carmim.

O corante vermelho fino foi descoberto em civilizações ricas em recursos naturais, por exploradores espanhóis que invadiram a América Central e do Sul durante o século XV e XVI. A Espanha manteve monopólio durante 300 anos, e exportou uma média de 50 a 160 toneladas anualmente sendo somente ouro e prata mais importantes. A cochonilha comercial moderna era originária de plantações no Peru, Chile, Bolívia, e ilhas Canárias. Pequenas quantidades eram oriundas do sul da Espanha, Algéria e Austrália. Em destaque estava o México como maior centro produtor até o aparecimento das anilinas em 1860. E, ironicamente o fator que causou essa perda, foi o responsável pela sua crescente demanda mundial. Os corantes sintéticos foram causadores de doenças e a partir da década de 80 a sua utilização em alimentos, drogas e cosméticos foi banida nos Estados Unidos, Japão e Europa. Desde então, os derivados da cochonilha se tornaram os corantes vermelhos mais populares para essa proposta de substituição.³

1.1.2 Métodos de Extração do Carmim

Existe uma séria exigência de diversos países sobre a qualidade dos insetos e dos extratos. São as fontes de variação na qualidade do inseto, de ácido carmínico e da laca respectivamente:³

- Diferenças no clima, umidade, temporada, tipo de solo, origem geográfica e variação das técnicas de matar e secar os insetos;
- Técnicas de extração, purificação e derivatização;
- Técnicas de solubilização.

São vários os métodos de extração propostos a partir do inseto.^{3,6-8} Todas essas tecnologias normalmente iniciam com um pré-tratamento da matéria-prima para a retirada da cera presente no inseto até a extração usando diferentes solventes e utilizam sulfato de alumínio e potássio para a reação de formação do carmin.²

Carvalho descreveu diversos métodos. São eles: Alcabés, Alemão, Carré, Madame Cenette, Chinês, Inglês, Francês, Muspratt, Napier, Prado, Rios e Thorpe. Estes se diferem pelo uso diversos tipos solventes como: água a ebulição, hidróxido de sódio e solução de sal (citrato de sódio, carbonato de cálcio, carbonato de potássio).²

De um modo geral, o processo de obtenção do corante a partir do inseto é feito em etapas (Figura 3):

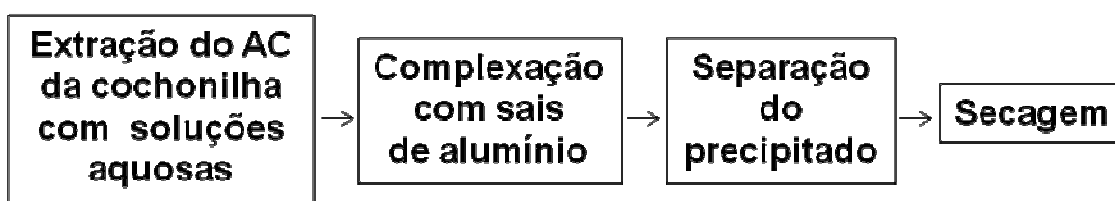


Figura 3 - Esquema das etapas do processo de extração do carmin a partir do inseto proposto por Carvalho.² (Adaptado)

O pigmento comercializado no Brasil tem aspectos diferentes do que o resultante desses métodos de extração citados anteriormente. Hoje se mantêm sigilo sobre segredos industriais das alterações tecnológicas feitas no processo de produção do carmin. A empresa CHr. Hansen oferece uma faixa completa do corante carmin nas formas líquida, sólida hidrossolúvel, laca e cápsula que são bastante estáveis à variação de luz e temperatura.⁴

Carvalho também propôs dois métodos de extração do carmin e otimizou o processo de produção. O fluxograma da metodologia (Figura 4) que foi utilizada para estudo de cinco fatores significativos em dois níveis (+) ou (-): pH de extração 2 (-) ou 12 (+), pH de precipitação 6 (-) e 8 (+), massa de sulfato de alumínio e potássio 0,25g (-) e 0,5g(+), massa de carbonato de

cálcio 0,1g(-) e 0,5g(+), e forma de adição dos sais (sulfato de alumínio e potássio antes (-) e juntos (+)).²

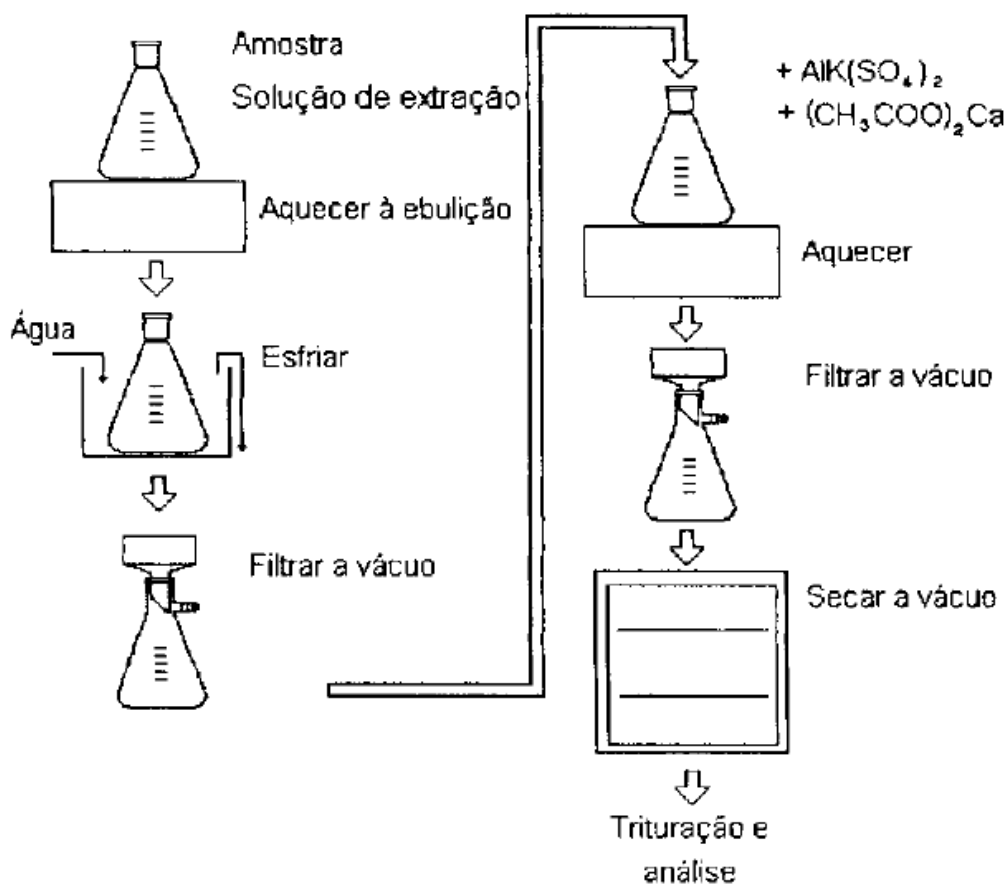


Figura 4 - Fluxograma do processo de produção de carmin de cochonilha utilizado no estudo de fatores significativos proposto por Carvalho.²

A tecnologia final proposta teve um baixo rendimento de extração (~67%), sendo um fator limitante deste processo. Para aumentar a eficiência dessa tecnologia, foi proposto reciclar o resíduo desta extração. O tempo de extração estabelecido foi de 25 minutos com a proporção de solvente (NaOH 0,4%) igual a 80 mL/g de amostra e pH = 13. O extrato foi resfriado, teve o pH corrigido para 4 com adição de HCl e filtrado. O resíduo foi reciclado e o filtrado teve o pH ajustado para 6. Adicionaram-se os sais a esse extrato. A concentração de sulfato de alumínio e potássio $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ e a concentração de acetato de cálcio utilizadas foram de 0,72 g/g e 0,08 g/g de ácido carmínico respectivamente, o que sugere a participação de outra fonte de cátion na formação do complexo. Essa mistura foi aquecida até a ebulição por

30 minutos, resfriada e o material precipitado foi separado por filtração. O corante obtido foi seco em estufa a vácuo em temperatura inferior a 60°C, triturado e envasado. O fluxograma (Figura 5) deste método estabelecido demonstra todas essas etapas citadas anteriormente.³

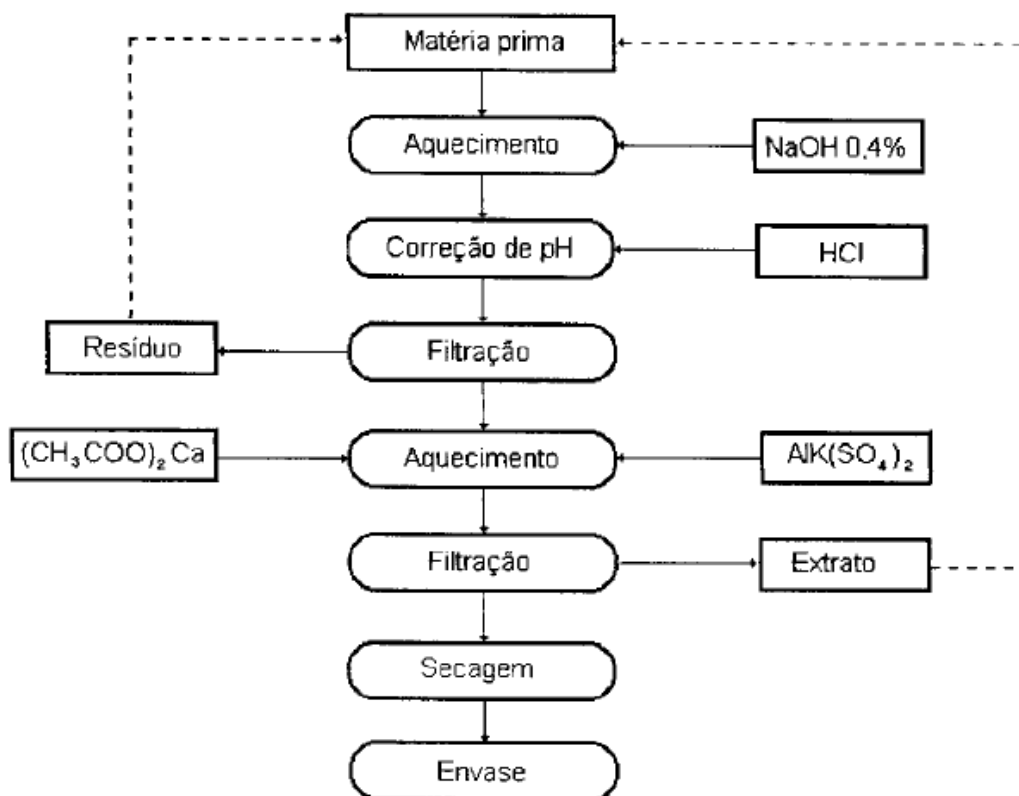


Figura 5 - Fluxograma do processo estabelecido para a extração do corante de cochonilha proposto por Carvalho².

González e colaboradores desenvolveram outro método de extração e determinação de pigmentos a partir do corpo das fêmeas do inseto cochonilhas *Dactylopius Coccus* Costa. O procedimento foi baseado na extração por solvente de pigmentos em amostras de insetos usando metanol:água (65:35, em volume) como extrator. Foi usado um planejamento fatorial de dois níveis para otimizar os parâmetros de extração. São eles: temperatura, tempo, concentração de metanol na mistura extratora, e o número de extrações. O fator mais significativo foi o número de extrações. A determinação e separação dos pigmentos foram estabelecidas por cromatografia líquida de alta

eficiência/UV-vis. Foi demonstrado que o ácido carmínico é o principal composto no extrato das cochonilhas.⁵ Visando aumentar o valor comercial do pigmento extraído das cochonilhas investigou-se a qualidade da cor do extrato e caracterização da origem geográfica usando análise estatística multivariada.⁶ Outro método rápido desenvolvido para a determinação de adulteração de cor em cochonilhas foi estabelecido por espectrofotometria. Os comprimentos de onda selecionados foram 420 e 500 nm para a determinação e quantificação simultânea de grupos de pigmentos vermelhos e amarelos em extrato das cochonilhas. A determinação do coeficiente médio de absorção foi dada pela razão entre (C_{420}/C_{500}) que resultou em equações que servem para calcular a concentração dos dois grupos de pigmentos e que são considerados constantes e utilizados como parâmetro de controle de qualidade. O método proposto foi comparado à cromatografia líquida e não apresentou diferenças significantes.⁷

1.1.3 Aplicações e métodos de identificação, determinação e quantificação de ácido carmínico em diversas matrizes

Este corante na antiguidade era aplicado como pigmento em telas, têxteis e mapas. A análise da composição destes artefatos é de grande importância, já que serve como fonte de informação para técnicas de trabalho de reconstrução, restauração e conservação. São diversos os trabalhos⁸⁻¹⁴ que investigam o tipo de pigmento, inclusive carmim, utilizado nestes objetos. Usualmente são empregados para identificação de têxteis históricos e arqueológicos baseados na comparação com material de referência conhecido. Dependendo da composição qualitativa e quantitativa dos principais corantes e é extremamente vantajoso para a elucidação das suas origens.⁸

Favaro e colaboradores investigaram os espectros de emissão dos corantes vermelhos, como ácido carmínico (AC) e laca (AC-AI) em solução ou superfície pintada. O estudo foi focado no uso do ácido carmínico em pinturas e a possível mudança de cor e envelhecimento com o tempo. A laca é muito estável e não é fotodegradada como o ácido carmínico.⁹ Observou-se que o espectro do ácido carmínico diluído em água muda em função do pH. Foram

detectadas quatro etapas de dissociação que correspondem a valores de pK's que foram determinados a partir de titulações espectrofotométricas e de fluorescência.

Maier e colaboradores utilizaram a dessorção/ionização a laser matriz-assistida e espectrometria de massas eletrospray (ESI-MS). A aplicação de ambas as técnicas é feita para análise de ácido carmínico suspenso em óleo de linhaça aplicado em pintura de telas, demonstrando a habilidade das mesmas para identificar corante orgânico em mistura usada nessas pinturas.¹⁰ As antraquinonas e corantes naturais vermelhos usados por pintores antigos foram identificadas também por espectrometria de massas eletrospray acoplada a eletroforese capilar.¹¹ Outro método utilizou esta última técnica com detecção UV para identificar cinco corantes naturais numa coleção de mapas e desenhos da Royal Chancellery Archives em Granada, Espanha. A validação foi feita usando HPLC como método de referência.¹²

Os corantes orgânicos usados em pinturas artísticas do museu Diocesano de Arte sacra de Bilbao, na Espanha, também foram analisados por cromatografia eletrocínética usando como surfactante SDS. A grande vantagem é o tempo da análise que é de dez minutos contra trinta minutos, reportado na literatura quando a análise é feita por HPLC.¹³

Surowlec otimizou uma análise seletiva por HPLC para a principal classe de corantes naturais (antraquinonas, flavonóides e seus produtos de degradação) usados antigamente para tingimento de têxteis.⁸ Atualmente o carmim é aplicado em fármacos e cosméticos e também em alimentos devido a sua estabilidade. Os principais alimentos em que é empregado são: balas, biscoitos, geléias, sorvetes, bebidas lácteas, sucos, carnes, salsichas e salames defumados. Cada vez mais são desenvolvidas técnicas para a purificação,^{1,2,5-7} ou detecção de adulteração deste corante em diferentes matrizes.¹⁴⁻¹⁷

Huang e colaboradores determinaram oito corantes em bebidas lácteas. Os corantes são adicionados para aumentar a atração, aparência e, além disso, a detecção e a medida de corante neste tipo de bebida são

relativamente importantes por razões de saúde. Dentre eles, o ácido carmínico também foi analisado. Foi ressaltado que as extrações em fase líquida ou fase sólida são dois pré-tratamentos usados para uma variedade de amostras, porém consomem muito tempo e aumentam a concentração dos corantes já que estes são solúveis em água.¹⁴

Gonzáles e colaboradores desenvolveram também um método automático para determinação de cinco corantes naturais (inclusive o carmim) e também para sintéticos em alimentos liofilizados baseado no processo de lixiviação e extração em fase sólida. A liofilização da amostra acoplada com o procedimento de separação fornece uma amostra limpa sem a complexidade das matrizes estudadas. O limite de detecção alcançado para todos os corantes (0, 003-75 µg/g) que está dentro dos padrões estabelecidos pela União Européia.¹⁵

Um simples método foi desenvolvido para discriminação entre os corantes naturais e sintéticos presentes em alimentos para reduzir o uso de técnicas analíticas caras como cromatografia líquida com detecção por diodos. Foi proposto um sistema em fluxo rápido em que as amostras de corantes sintéticos e naturais em meio de ácido acético passam através de uma coluna de lã/algodão, no qual os corantes sintéticos são retidos e diluídos em amônia. E os aditivos de diversas cores (amarelo, vermelho e verde-azul-marrom) podem ser monitorados nos respectivos comprimentos de ondas (400, 530 e 610 nm) com o espectrofotômetro convencional. A discriminação completa entre corantes sintéticos e naturais pode ser obtida pela concentração molar.¹⁶

Investigou-se a separação de corantes sintéticos e também de alguns corantes naturais (inclusive o carmim) em sistema micelar para comprovação da composição de produtos farmacêuticos. A análise pode ser estendida para produtos alimentícios visando a identificar falsificação.¹⁷

1.1.4 Funcionalidade

Do ponto de vista tecnológico o corante natural carmim é considerado um corante funcional, pois apresenta propriedades antioxidantes. Constatou-se que este corante é capaz de preservar os constituintes dos alimentos contra a oxidação lipídica.¹⁸

Algumas propriedades funcionais têm sido atribuídas ao ácido carmínico (principal constituinte do carmim) como atividades antitumorais, antivirais e antimicrobianas.¹⁸⁻²¹ Porém a legislação brasileira (ANVISA) não permite alegação de funcionalidade a aditivos ou a ingredientes e sim ao alimento como um todo.

Acredita-se que a eficácia que esse composto tem de inibir o crescimento das células tumorais é devido não só a habilidade em associar e intercalar com o DNA, mas também por processos de oxidação-redução com geração de espécies oxigenadas reativas que modificam e degradam ácidos nucleicos e proteínas no interior das mesmas.^{19,20}

1.1.5 Toxicidade e Reações Adversas

Embora seja um corante natural, o carmim não está isento de ser tóxico ou provocar reações adversas à saúde humana. Não se pode associar o termo natural a inócuo. No entanto, o carmim foi avaliado quanto às atividades mutagênicas e carcinogênicas, demonstrando ausência destes efeitos.²²

O carmim é amplamente utilizado em alimentos e bebidas e a ingestão diária aceitável (IDA) está estabelecida em 0-5mg/Kg de peso corporal pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO).²

A combinação de corantes naturais (dentre eles, o carmim) com os sintéticos em fármacos podem provocar reações pseudo-alérgicas, em especial a pessoas que também são alérgicas a aspirina e outros agentes antiinflamatórios, ou que sofrem de urticária ou asma.¹⁷

Por causa de reações alérgicas graves, incluindo anafilaxia, a Food and Drug Administration (FDA) vai exigir a partir de 2011 a declaração do nome na

embalagem de alimentos e cosméticos que contém esse aditivo a fim de que os consumidores alérgicos possam evitar o uso ou consumo dos mesmos.²³

Podem ser desencadeadas asma, alergias respiratórias, rinites, urticária e diarreia em trabalhadores expostos diretamente ao pó do carmim em na indústria de aditivos para alimentos.^{12, 22}

1.1.6 Legislação e restrição de uso

A resolução nº 44 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)²⁴ estabelece condições gerais para a elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos (e bebidas). De maneira geral corante é definido como uma substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração do alimento (e bebidas). O corante natural carmim, também denominado ácido carmínico ou cochonilha foi classificado como corante orgânico natural identificado pela sigla INS 120.

Outras resoluções²⁵⁻³⁰ (nº 382, 384, 385, 387, 388, 389) e a Portaria nº 1004³¹ s da ANVISA aprovam o uso de aditivos alimentares (inclusive INS 120), estabelecendo suas funções seus limites máximos para categorias específicas de alimentos resumidos na Tabela 1.

Na Portaria nº 376 da ANVISA estabeleceu-se o conceito do termo *quantum satis* que se refere à quantidade mínima necessária para obter o efeito tecnológico necessário.³²

Tabela 1 – Limites máximos permitidos de uso do carmim em alimentos

Alimentos	Limite máximo (g/100g)	Nº Resolução/ Portaria ANVISA
Gelados Comestíveis	0,015	384
Molhos Emulsionados	0,05	382
Ketchup, Vinagres e Maionese	Não permitido	382
Mostarda	0,03	382
Cereais ou Produtos de ou a base de cereais	<i>quantum satis</i>	385
Balas, Caramelos, Pastilhas , Confeitos,	0,030	387
Coberturas e Xaropes para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas confeitos, bombons, e similares banhos de confeitaria, prontos para o consumo (não contendo cacau)	0,050	387
Recheios para produtos de panificação e biscoitos, produtos de confeitaria, sobremesas, gelados comestíveis, balas confeitos, bombons, e similares banhos de confeitaria, prontos para o consumo	0,030	387
Sobremesas de Gelatina prontas para o consumo	0,015	388
Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas prontas para o consumo	0,01	389
Chocolate e cacau	Não permitido	387
Carnes Frescas e congeladas	Não permitido	1004
Produtos cárneos industrializados	0,01	1004

2. Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs)

A descoberta dos SABs aconteceu no século XIX, mais precisamente em 1896, quando Beijerinck misturou soluções aquosas de ágar e gelatina e espontaneamente houve a separação das fases.³³

Os SABs podem ser formados através da mistura de dois polímeros quimicamente distintos, duas soluções aquosas de sal, ou uma solução aquosa de polímero/copolímero e outra solução aquosa de sal. A escolha dos SABs é uma alternativa promissora, pois são comercialmente acessíveis, ambientalmente seguros (pela não utilização de solventes orgânicos comum em processos de extração e a não geração de resíduos potencialmente tóxicos), de baixo custo e de fácil utilização em escala industrial.³⁴

A composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio é geralmente representada em um diagrama de fase de coordenadas retangulares:

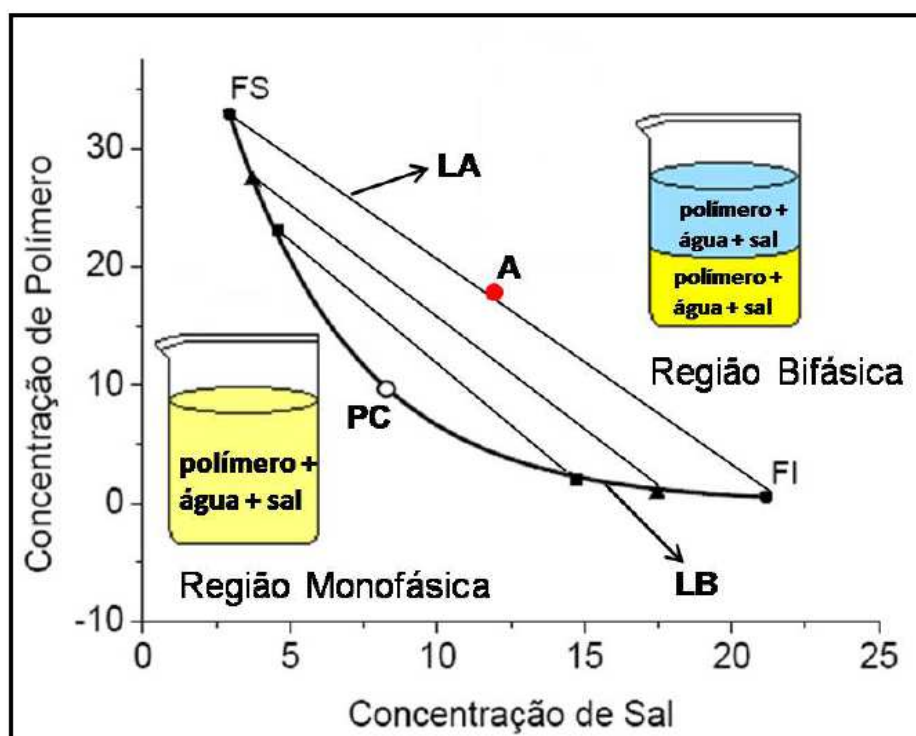


Figura 6 - Diagrama de fase em coordenadas retangulares.³⁵

Esta representação gráfica (Figura 6) é de grande importância para estudos de partição, pois é utilizada como ferramenta inicial para o desenvolvimento o processo de extração.³⁴ Os dados estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema. O eixo das abscissas representa a concentração de sal e o eixo das ordenadas a concentração de polímero, ambas em porcentagem mássica % (m/m). O diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo ou heterogêneo.

A Linha Binodal (LB) separa essas duas regiões. Na região abaixo dessa linha, o sistema é monofásico já na região acima o sistema é bifásico³⁵. Apresentam-se também as linhas de amarração (LA). Essas linhas fornecem a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio (FS e FI) para uma determinada composição global (A) do sistema. O comprimento da Linha de Amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico que é utilizado para medir as propriedades intensivas entre as fases. É calculado em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase (Equação 1).

$$CLA = \sqrt{(C_p^{FS} - C_p^{FI})^2 + (C_s^{FS} - C_s^{FI})^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que C_p^{FS} e C_p^{FI} , é a concentração de polímero em cada fase (superior e inferior), e C_s^{FS} e C_s^{FI} é a concentração de sal presente em cada fase (superior e inferior) respectivamente.

Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases, maior é a eficiência na extração e/ou partição de soluto de interesse no SAB.^{34,35}

No Ponto crítico (PC), é um limite em que o CLA tende a zero. Nele poderiam existir duas fases distintas, mas com propriedades termodinâmicas intensivas iguais.³⁵

2.1 Processos envolvidos na formação dos SABs

Da silva propôs um modelo qualitativo em nível molecular de formação dos SABs sempre diferenciando os fatores entrópicos dos entálpicos através do acompanhamento das mudanças de propriedades termodinâmicas do sistema (entalpia de solução, entalpia de diluição, raio hidrodinâmico e tensão superficial) até ocorrer a separação de fases.³⁶

Segundo este modelo, à medida que se acrescenta solução aquosa de sal (sulfato de lítio), em uma solução polimérica (PEO) a entropia do sistema aumenta devido à liberação de moléculas de água que estavam solvatando a macromolécula (unidades EO) e os íons para que ocorra a interação entre os cátions e a macromolécula contribuindo para a homogeneidade do sistema. Então, ao redor de toda a macromolécula existe uma densidade de carga positiva, denominada pseudo-policátion. Este por sua vez, atrai eletrostaticamente os ânions. Essa interação ocorreu até o momento em que os sítios se encontraram energeticamente saturados. Caso essa interação continuasse a ocorrer apareceriam forças de repulsão de curto alcance (aproximação de cargas de mesmo sinal ou mudanças na conformação da macromolécula) desestabilizando o sistema. Então, a adição de mais solução aquosa de sal, obriga os íons a se concentrarem distantes da macromolécula, fazendo com que as moléculas de água retornem a solvatar a cadeia polimérica. Não existindo a possibilidade de ocorrer o ganho entrópico explicado anteriormente, estabelece-se uma situação de instabilidade termodinâmica, pois o sistema não consegue manter-se homogêneo e ao mesmo tempo diminuir a energia livre de Gibbs ocorrendo então à separação de fases. Nesse novo estado, o polímero é concentrado na fase superior e o sal na fase inferior aumentando assim as interações polímero-polímero e sal-sal. Ocorre a liberação das moléculas de água que estavam hidratando a macromolécula e o sal para regiões na solução livres dessa influência, acarretando mais uma vez um aumento de entropia.³⁶

Explica também que, no caso de formação de SABs constituídos por PEO e sulfato de sódio, o mecanismo é o mesmo. Embora exista também uma

contribuição entálpica, já que a entalpia de transferência desse processo continua negativa depois da separação das fases sugerindo que esses íons (Na^+ e SO_4^{2-}) interagem mais entre si, na presença de PEO do que em água devido a uma maior concentração local dos mesmos.³⁶

2.2 Teoria de Partição de solutos em sistemas aquosos bifásicos (SABs)

O coeficiente de partição de um soluto (K_s) é dado pela razão da concentração do soluto, na fase superior e na fase inferior do SAB³⁵ conforme a Equação 2:

$$K_s = \frac{[\text{solute}]^{\text{FS}}}{[\text{solute}]^{\text{FI}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Haynes e colaboradores desenvolveram uma série de equações derivadas da teoria de Flory-Huggins. E estas são usadas para identificar a força motriz que rege a partição de solutos nos SABs, ou seja, o transporte de matéria entre as fases do sistema. Neste modelo são reconhecidas duas forças motrizes (contribuições) que podem levar um soluto a se particionar em um SAB: uma contribuição entálpica e uma entrópica.³⁷

A contribuição entrópica é dada pela equação 3, sendo que M_s é a massa molar do soluto particionado, ρ é o número de sítios por unidade de volume e n^{FS} e n^{FI} é o número total de moléculas na fase superior e inferior, que quando dividido pelo volume V^{FS} e V^{FI} informa a densidade numérica da fase respectivamente.

$$\ln K_s = \frac{M_s}{\rho} \left(\frac{n^{\text{FS}}}{V^{\text{FS}}} - \frac{n^{\text{FI}}}{V^{\text{FI}}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

E evidenciando que na ausência de efeitos entálpicos, as moléculas têm a tendência de se concentrarem na fase que contém a maior densidade numérica.

A contribuição entálpica é dada pela equação 4 sendo que Φ^{FS} e Φ^{FI} é a fração volumétrica de cada componente do SAB_(i,j) na fase superior e inferior respectivamente, W_{is} é energia potencial absorvida ou liberada quando um par soluto-água, ou soluto-polímero, ou soluto-cátion, ou soluto-ânion é formado. E W_{ij} é o valor da energia do par potencial formado pelos componentes (i,j) do SAB na ausência de soluto.

$$\ln K_S = - \frac{M_S}{RT} \left[\sum_{i=1}^3 (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) W_{is} - \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) W_{ij} \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

O 1º termo representa a diferença em todas as interações entre o carmim e cada componente do sistema presente nas fases superior e inferior.

O 2º termo representa a auto-energia das fases. Então, quando uma molécula de soluto é transferida da FI para a FS, forma-se uma cavidade na fase que ela deixou e forma-se uma cavidade na fase que ela entrará. Esse termo leva em consideração essas interações intermoleculares rompidas e formadas entre os componentes do SAB. Pesquisas do nosso grupo (QUIVECOM) já demonstraram que esse termo não contribui muito para a partição, pois se fez o estudo com moléculas do mesmo tamanho e o Kc se mostrou muito diferente.³⁸

2.2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos utilizados para partição de corantes

Observações sobre a partição de pigmentos em sistemas aquosos bifásicos possuem uma longa história, mas a aplicação para esse fim tem sido infrequente. Em 1954, Albertsson noticiou a partição de cloroplastos em sistema aquoso bifásico constituído de polietileno glicol e solução aquosa de sal (PEO-SAL) na eluição de material ligado a partir da hidroxiapatita. Já em 1970, o trabalho de Hustedt et al sobre extração de proteínas demonstraram uma forte tendência do material intracelular pigmentado se concentrar na fase superior do SABs. A maioria dos pigmentos naturais demonstra uma tendência de se concentrar na fase superior, rica em PEO, nos SABs. Isto foi confirmado em seu trabalho recente de recuperação de corantes têxteis e corantes

complexados com metais. E surpreendentemente este fato não tem sido explorado para separação, recuperação e análises de pigmentos. Outra questão a ser considerada é o impacto ambiental causado pela descarga de efluentes contendo esses corantes.³⁹

Atualmente, a utilização de SABs para a extração/purificação de diversos solutos como proteínas, bio-nanopartículas, ácidos nucleicos, íons metálicos¹⁶ e corantes são uma excelente alternativa por serem de baixo custo e estarem dentro dos princípios da química verde devido a não utilização de solventes tóxicos e não há geração de descartes perigosos ao meio ambiente e a saúde humana.²

Mageste e colaboradores recentemente estudaram a partição do corante carmim em SABs constituídos pelo polímero PEO 1500 e sais de sulfato (lítio e sódio). O K_c do carmim foi investigado em função do pH do sistema, massa molar do polímero, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração e natureza do eletrólito.² Neste trabalho, para explicar os fenômenos de partição do carmim nos SABs investigados, adotou-se o modelo teórico proposto por Haynes e colaboradores, descrito na seção anterior.

A densidade numérica da fase inferior é maior, pois nesta fase existe um maior teor de água. Portanto, levando em consideração a contribuição entrópica proposta pelo modelo de Haynes e colaboradores apresentado anteriormente, as moléculas de carmim deveriam ter a tendência de se concentrarem nesta fase.³⁷ Porém Mageste e colaboradores comprovaram experimentalmente o contrário. As moléculas de carmim têm a tendência de se alojarem na fase superior dos SABs ($K_c > 1$). O que só poderia ser explicado pela contribuição entálpica do modelo demonstrando que as moléculas de carmim interagem mais fortemente com a macromolécula do polímero. Evidentemente, foi comprovado que os SABs são uma alternativa promissora para o processo de purificação deste corante em substituição aos processos convencionais.²

2.2.2 Copolímeros tribloco e sua utilização em SABs

Os copolímeros tribloco são constituídos de três blocos de polímeros designados PEO-PPO-PEO. Em sua estrutura química (Figura 7) existem dois segmentos hidrofílicos de óxido de etileno (PEO), e um segmento hidrofóbico e óxido de propileno (PPO). Sendo que m e n representam o grau de polimerização das unidades EO e PO respectivamente

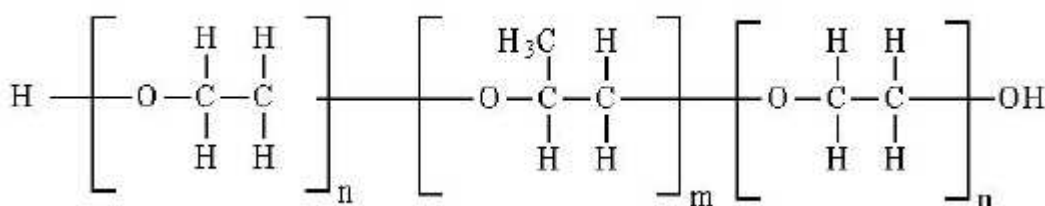


Figura 7 – Estrutura química do copolímero PEO-PPO-PEO.³⁵

A nomenclatura dos copolímeros é feita por letras maiúsculas e números os quais se referem ao estado de agregação e a fração em massa de bloco de segmentos EO respectivamente. Por exemplo, os copolímeros utilizados neste trabalho foram L35, L64 e F68. A letra L significa que o copolímero é líquido, já a letra F indica que o copolímero é formado por flocos em ambos os casos, a temperatura e pressão ambientes. O copolímero L35 possui massa molar 1950 g mol^{-1} , de estrutura química definida como $(\text{PEO})_{11}(\text{PPO})_{16}(\text{PEO})_{11}$, composição de 50% m/m de PEO/PPO. Já o copolímero L64 possui massa molar de 2900 g mol^{-1} , de estrutura química definida como $(\text{PEO})_{13}(\text{PPO})_{30}(\text{PEO})_{13}$ e composição de 40% m/m de PEO e 60% m/m de PPO. E o copolímero F68 possui massa molar 8400 g mol^{-1} , de estrutura química $(\text{PEO})_{80}(\text{PPO})_{30}(\text{PEO})_{80}$ e composição de 80% m/m de PEO e 30% de PPO em sua estrutura.³⁵ A hidrofobicidade dos copolímeros aumenta a medida que temos um aumento da quantidade de blocos PPO e uma diminuição dos blocos PEO, então a ordem crescente de hidrofobicidade é $\text{F68} < \text{L35} < \text{L64}$.

A utilização de copolímeros pra a construção de SABs é estratégica, pois possibilita a termo separação a temperaturas inferiores a 100° , não destruindo as biomoléculas presentes. Além disso possuem baixo custo, pouco tempo para a separação de fases e baixos pontos de névoa.⁴⁰

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal elucidar os fatores que influenciam a partição do carmim de cochonilha em diferentes SABs e determinar os parâmetros termodinâmicos para compreensão da natureza da força motriz que rege essa transferência.

3.1. Objetivos específicos

- Investigar a influência do aumento da hidrofobicidade sobre o coeficiente de partição do corante carmim (K) em SABs formados por polímero PEO 1500 ou copolímeros L35, L64 e F68 e sal tartarato ou citrato de sódio;
- Compreender o efeito da natureza do ânion ou do cátion no comportamento da partição do carmim em SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (carbonato, citrato, tartarato, acetato) e citrato de amônio.
- Determinar os parâmetros termodinâmicos do processo de partição dos SABs investigados (ΔG , ΔH , ΔS) através das técnicas de Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-visível e Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC);

4. Materiais e Metodologia

4.1 Reagentes

Polímero poli(óxido de etileno) (PEO), com massa molar média de 1500 g mol^{-1} obtido da SYNTH[®] (São Paulo, Brasil) e copolímeros tribloco L35, L64 e F68 da ALDRICH[®] (USA), com massa molar média de 1900, 2900 e 8400 g mol^{-1} e composição nominal $(\text{EO})_{11}(\text{PO})_{16}(\text{EO})_{11}$, $(\text{EO})_{13}(\text{PO})_{30}(\text{EO})_{13}$ e $(\text{EO})_{80}(\text{PO})_{30}(\text{EO})_{80}$, respectivamente.

E os eletrólitos: carbonato de sódio, Na_2CO_3 , tartarato de sódio dihidratado, $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e hidróxido de sódio, NaOH , fabricados pela VETEC[®] (Brasil), acetato de sódio, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, citrato de amônio, $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e citrato de sódio dihidratado $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram adquiridos da MERCK[®] (USA).

O corante Carmim foi doado pela Chr. Hansen Ind. Com. Ltd. (Brasil).

Todos os reagentes foram usados como recebidos, sem nenhuma etapa de purificação. Foi usada água destilada em todos os experimentos.

4.2 Experimentos de Partição

Os SABs foram preparados pela mistura de soluções estoque de sal e polímero (ou copolímero) para obter a composição global do sistema de acordo com os diagramas de fases descritos na literatura.⁴¹⁻⁴⁴

Para cada diagrama de fase foram estudadas cinco diferentes composições. Soluções aquosas de copolímero (ou PEO) e sal foram pesadas em tubos de centrífuga, com capacidade para 50 mL. O peso total do sistema foi de 30g. Os SABs preparados foram colocados em banho termostático (Microquímica, MQBTC 99-20, Brasil), a $25,0^\circ\text{C}$ por um mínimo de 24 h para que o equilíbrio termodinâmico fosse alcançado com incerteza de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Alcançado o equilíbrio termodinâmico, as fases superior e inferior foram coletadas e separadas por seringas e pesadas em tubos de ensaio (2,5 g) de ambas as fases misturadas com $0,963 \mu\text{mol}$ do corante carmim e $30 \mu\text{L}$ de solução de NaOH ($0,1275 \text{ mol L}^{-1}$). Fez-se necessária essa adição de hidróxido para que partes das moléculas de carmim se concentrassem na fase

inferior, já que em estudo prévio de Mageste e colaboradores verificou-se que todas as moléculas deste corante se concentraram na fase superior dos SABs.²

Esses sistemas foram misturados em vortex (Certomat MV) e novamente colocados em banho termostático por no mínimo 24 h para que o equilíbrio termodinâmico fosse novamente alcançado. Cada experimento foi feito em duplicata.

4.3 Determinação do coeficiente de Partição (K_C)

O coeficiente de partição das moléculas de carmim entre as fases foi calculada pela razão (equação 5) :

$$K_C = \frac{[\text{carmim}]^{FS}}{[\text{carmim}]^{FI}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Na qual, os termos $[\text{carmim}]^{FS}$ e $[\text{carmim}]^{FI}$ são as absorbâncias do corante particionado nas fases superior e inferior, respectivamente.

Após a diluição adequada, em cada fase foi medida a absorção do carmim a 534 nm. As fases diluídas de cada SAB sem o corante foram utilizadas como branco e preparadas em paralelo. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu UV-2550). O desvio padrão relativo para os valores do K_C foram menores do que 10%.

4.4 Medidas Calorimétricas

As medidas de entalpia de transferência foram feitas pela metodologia de microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Todos os experimentos foram realizados no microcalorímetro CSC-4200 (Calorimeter Science Corp.) controlado pelo programa ITCRun. Todos os procedimentos calorimétricos foram calibrados quimicamente e eletricamente pelo calor de protonação do (Tris(Hidroximetil)Aminomethano) e pelo efeito joule, conforme recomendado⁴⁶.

O equipamento tem duas células calorimétricas (amostra e referência) com volume de 1,75 mL. O experimento consiste de cinco injeções consecutivas de alíquotas (50 μ L) de carmim dissolvido na fase inferior dentro

da célula da amostra que inicialmente continha 0,90 mL de ambas as fases. O titulante foi adicionado com auxílio de uma seringa Hamilton com capacidade máxima de 250 µL. O intervalo foi de 60 minutos entre as injeções. A mistura titulada foi agitada a 350 rpm usando um agitador de hélice. As medidas foram estabelecidas à temperatura constante de $25,000 \pm 0,001^\circ \text{C}$. A Figura (9) mostra um termograma típico, sendo cada pico correspondente a uma injeção.

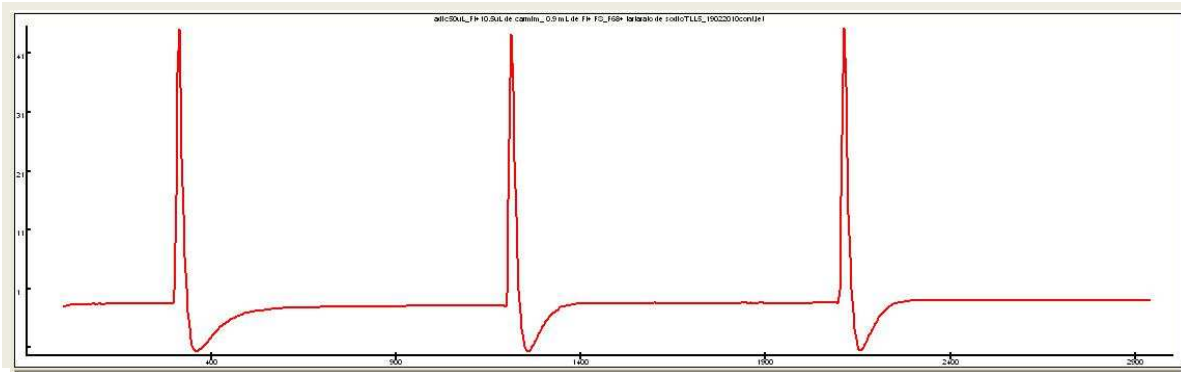


Figura 8 – Termograma de Potência em função do tempo referente a transferência do carmin no SAB formado por copolímero F68 e sal tartarato de sódio.

Os valores para variação de entalpia foram calculados pela integração da área abaixo dos picos em função do tempo e da mudança de potência conforme a equação 6:

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} P(t) \cdot dt \quad (\text{Eq. 6})$$

O valor do número de mols do carmin transferidos para a fase superior após cada adição (n_{TFS}) foi obtido pela equação 7:

$$n_{\text{TFS}} = \frac{K_c}{K_c + 1} \cdot i \cdot n_{\text{add}} \quad (\text{Eq. 7})$$

na qual o K_c é o coeficiente de partição, i é o número de injeções e n_{add} é o número de mols adicionados em cada injeção.

A variação da entalpia de transferência foi determinada pela variação da entalpia dividido pelo n_{TFS} de acordo com a equação 8:

$$\Delta_{tr}H = \frac{\Delta H}{n_{TFS}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Todos os desvios padrões de entalpia de transferência calculados foram menores que 1,0%

5. Resultados e Discussão

5.1 Diagramas de fase

Todos os diagramas de fase dos SABs utilizados neste trabalho foram retirados na literatura.⁴¹⁻⁴⁴ A partir das composições das fases dos SABs, em equilíbrio termodinâmico, foi calculado o parâmetro termodinâmico comprimento da linha de amarração (CLA). O aumento deste parâmetro é sempre relacionado ao aumento da eficiência no processo de extração não só do carmim, como também para outros solutos.^{2,34,35} O CLA para cada SAB foi calculado a partir da equação 1.

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores calculados dos comprimentos de linha de amarração (CLA) de diferentes SABs formados pelo polímero (PEO 1500) ou copolímeros (L35, L64, F68) e os sais tartarato de sódio ou citrato de sódio respectivamente. A Tabela 4 mostra os valores de CLA calculados para outros SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (carbonato e citrato) e citrato de amônio. Todos esses SABs foram utilizados neste trabalho.

Tabela 2 - Valores de CLA calculados para SABs formados por diferentes polímeros e o sal tartarato de sódio

	CLA % (m/m)			
	PEO 1500	L35	L64	F68
1 ^o	28,73	40,80	29,28	18,21
2 ^o	34,95	48,17	37,34	24,37
3 ^o	41,74	52,77	41,28	30,06
4 ^o	48,51	58,43	47,2	33,01
5 ^o	50,21	69,28	52,34	37,7

Tabela 3 - Valores de CLA calculados para SABs formados por diferentes polímeros e o sal citrato de sódio

	CLA % (m/m)			
	PEO 1500	L35	L64	F68
1º	22,49	34,78	36,58	21,91
2º	36,76	42,16	42,56	26,87
3º	39,87	48,18	45,58	32,00
4º	47,32	53,71	52,96	34,97
5º	56,04	59,48	57,83	38,50

Tabela 4 - Valores de CLA calculados para SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (carbonato e Acetato) e amônio (citrato)

	CLA % (m/m)		
	Acetato de sódio	Carbonato de Sódio	Citrato de Amônio
1º	26,51	34,47	42,11
2º	41,82	39,61	49,99
3º	53,77	48,72	57,11
4º	67,09	54,96	61,94
5º	74,03	61,30	67,13

Na figura 9 é mostrado um exemplo típico de diagrama de fase utilizado neste trabalho. O sistema possui duas fases isotrópicas, sendo a superior

enriquecida em macromolécula e a inferior concentrada em sal. Esse diagrama foi construído com análises das fases superiores e inferiores de cada sistema contendo composições globais pertencentes a diferentes linhas de amarração.

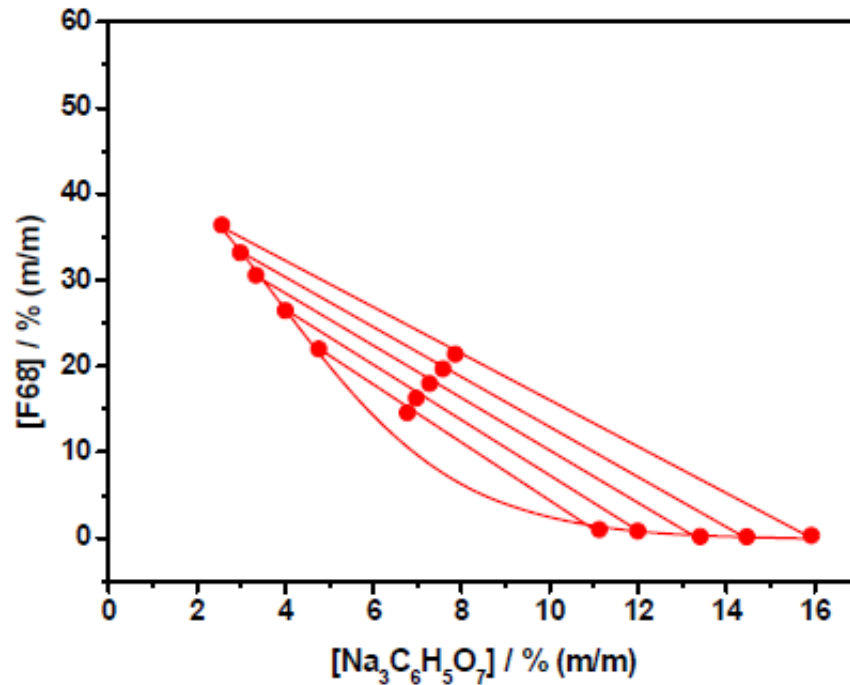


Figura 9 – Diagrama de fase para o SAB formado por F68/Na₃C₆H₅O₇/H₂O, a 25 °C.⁴⁰

5.2 Influência da natureza do eletrólito formador do SABs na partição do corante natural carmim

A partição do carmim foi investigada em diferentes SABs. Mageste e colaboradores já comprovaram que existe uma forte influência da natureza do eletrólito formador do SAB sobre os valores do coeficiente de partição do carmim (K_c).² Além disso, demonstraram que as moléculas do carmim têm a tendência de se transferir preferencialmente para a fase superior dos sistemas, indicado pelos valores do coeficiente de partição sempre maiores do que 1 ($K_c > 1$).

Neste trabalho, investigamos a influência da natureza do eletrólito, verificando separadamente o efeito do cátion ou do ânion do sal formador do SAB, sobre os valores do coeficiente de partição do carmim. Em todos os sistemas aquosos bifásicos os valores do coeficiente de partição aumentam com o incremento do valor do CLA. Este resultado era esperado porque se sabe que um aumento no valor do CLA causa um aumento na diferença das propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases, e é justamente essa maior diferença entre as interações intermoleculares que causa o incremento no processo de extração do carmim.

5.2.1 Efeito do Ânion

Para estudarmos o efeito da natureza do ânion sobre o processo de partição do corante natural carmim, o soluto foi particionado em SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (acetato, carbonato, citrato e tartarato). Os resultados são mostrados na figura 10:

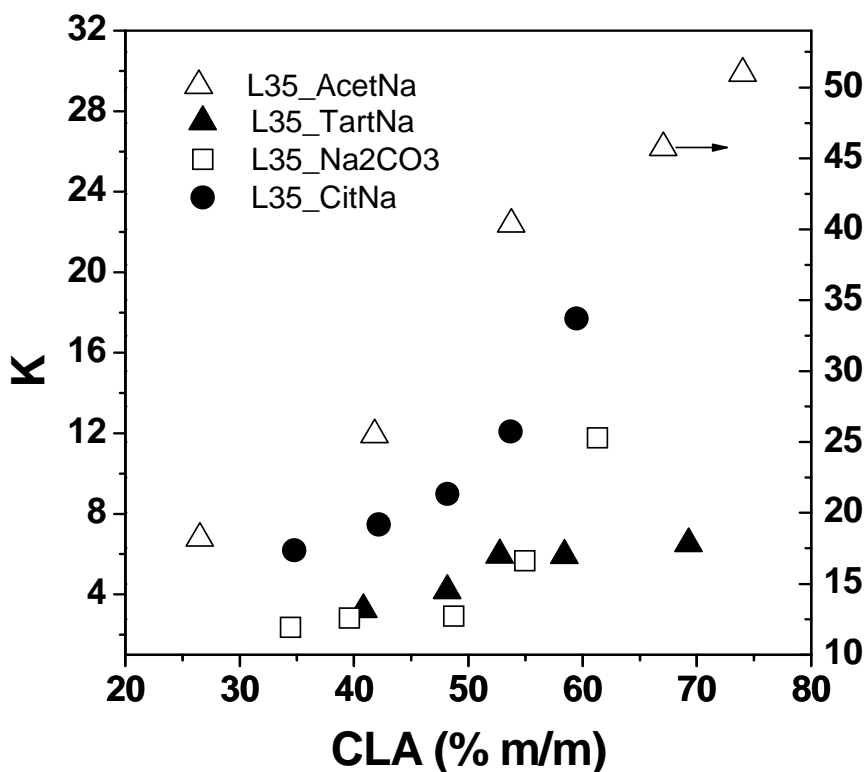


Figura 10 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de sais de sódio com copolímero tribloco L35, a 25 °C.

Há um efeito bem pronunciado da estrutura química dos íons negativos formadores dos SABs. Foi observada a seguinte ordem crescente nos valores dos coeficientes de partição: K_c (Na_2CO_3) < K_c (TartNa) < K_c (CitNa) < K_c (AcetNa). Existem duas explicações para esse fenômeno, a primeira considera a interação eletrólito-carmim e a segunda a interação eletrólito-polímero. A interação eletrólito-carmim seria de natureza eletrostática e por ligação de hidrogênio. Analisando dessa forma, faz-se necessário considerarmos a estrutura dos ânions utilizados na construção dos SABs neste trabalho. O ânion

que possui maior carga e o maior número de oxigênios seria o citrato, possibilitando um maior número de interações eletrostáticas e de ligações de hidrogênio. Então o carmim interagiria mais fortemente com esse ânion, e o maior valor de K_c seria observado. Porém isso não ocorreu. O maior valor de K_c observado foi para o ânion acetato. Esse fenômeno só pode ser explicado então pela interação eletrólito-polímero. O ânion interage com o polímero, gerando uma alta densidade de carga negativa ao redor dessa macromolécula, formando um pseudopoliânion que impede a interação do carmim com a macromolécula. Esse efeito mostrou que as interações intermoleculares ânion-polímero são decisivas no comportamento de partição deste corante.

Um parâmetro termodinâmico muito útil para relacionar a influência do ânion sobre a partição do carmim é a energia Livre de Gibbs de transferência $\Delta_{tr}G$. Essa variável termodinâmica expressa a mudança da energia livre de Gibbs do sistema, causada pelo processo de transferência de 1 mol de carmim da fase inferior para a fase superior e é calculada pela equação clássica da termodinâmica (Equação 7):

$$\Delta_{tr}G = -RT \ln K \quad (\text{Eq. 7})$$

A Figura 11 mostra a relação entre as variáveis $\Delta_{tr}G$ e CLA para os quatro SABs estudados. Independente do sal usado, a transferência do carmim causa uma diminuição da energia livre de Gibbs com o aumento do CLA. A dependência do $\Delta_{tr}G$ com o CLA são aproximadamente funções lineares. Os valores energéticos ficaram compreendidos entre -2,0 e - 10,0 kJ mol⁻¹. Os valores de energia proveniente das interações foram pequenos, indicando que ocorreram apenas processos físicos de interação e não reações químicas. Pois os valores de energia correspondentes a uma reação química, ficam compreendidos entre 100 e 400 kJ mol⁻¹. O processo de transferência do carmim mais espontâneo estudado foi o SAB constituído por L35 e acetato de sódio.

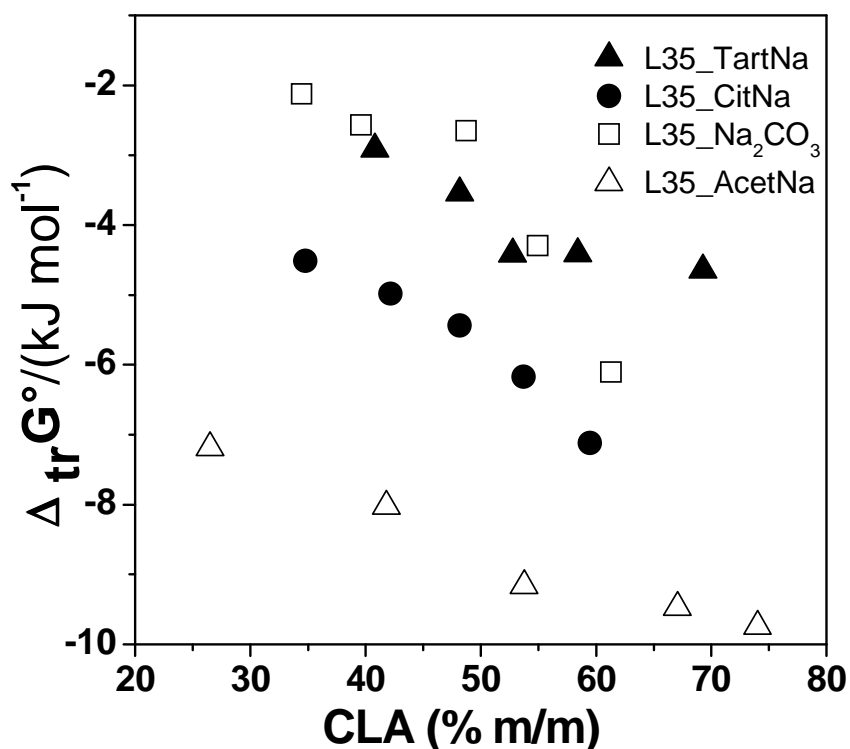


Figura 11 – Valores de $\Delta_{tr}G$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de diferentes sais de sódio com copolímero tribloco L35, a 25°C.

Todos os valores de $\Delta_{tr}G$ dos SABs estudados foram negativos, indicando que a transferência do carmim da fase inferior para a superior é um processo espontâneo. Esta liberação de energia livre de Gibbs está associada às diferentes interações entálpicas associadas à formação e rompimento de diferentes pares potenciais que ocorrem durante a transferência do corante, bem como mudanças configuracionais relacionadas com as diferenças dos números de possibilidades de arranjar as moléculas de Carmim na fase superior e na fase inferior, isto é, a variação da entropia configuracional conforme a equação 8:

$$\Delta_{tr}G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq. 8})$$

5.2.2 Efeito do Cátion

A Figura 12 mostra a relação entre o coeficiente de partição em função do CLA para SABs formados pelo mesmo copolímero tribloco L35 e sais de citrato de sódio e amônio.

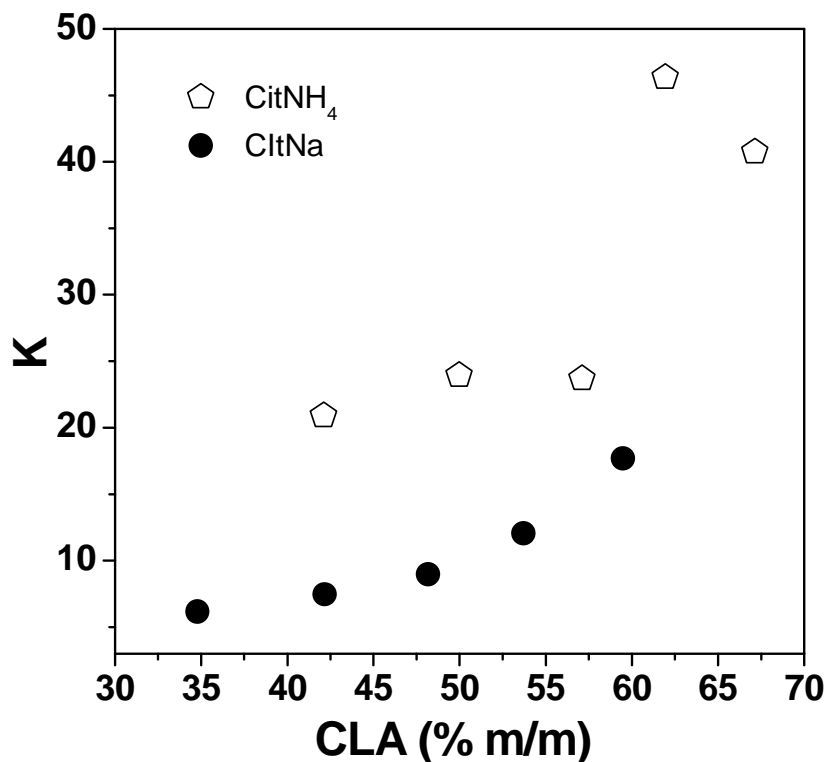


Figura 12 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco L35 com sais de citrato de Sódio e amônio, a 25°C .

Os maiores valores de coeficiente de partição foram para os SABs formados pelo cátion amônio. Esse forte efeito dos cátions amônio pode ser explicado considerando que estes íons interagem mais fortemente com os segmentos EO da macromolécula do copolímero L35 do que os cátions Na^+ , gerando assim uma alta densidade de carga positiva formando um pseudopolicátion (Figura 13). Desta forma, os maiores valores de K_c observados são atribuídos a existência de fortes interações eletrostáticas entre as moléculas de carmim e o pseudopolicátion formado pela interações NH_4^+ - EO.

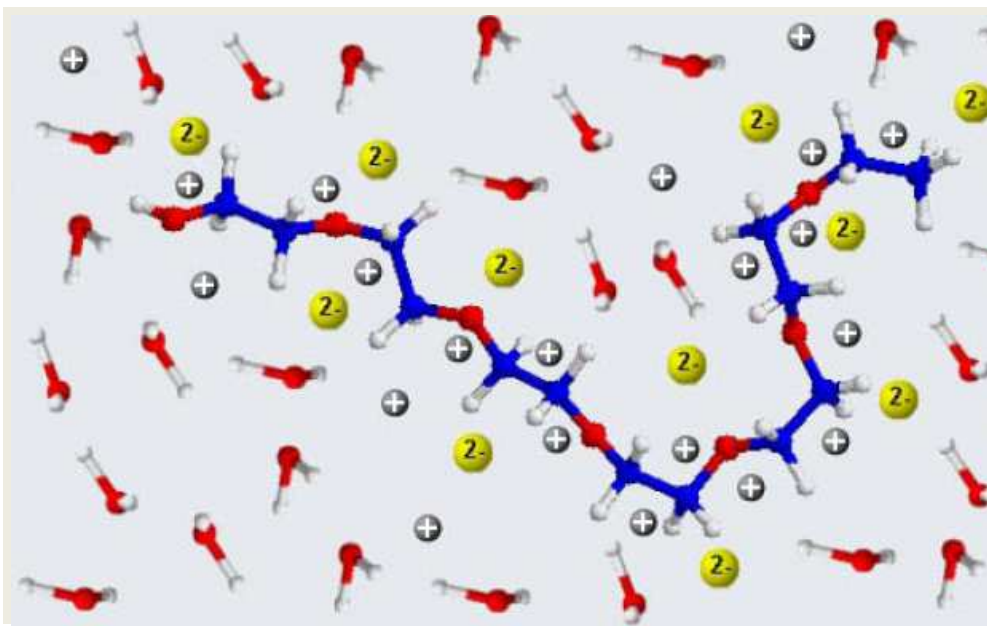


Figura 13 - Pseudopolicación formado por interações eletrostáticas entre o cátion e o segmento EO do polímero formador do SAB.³⁵

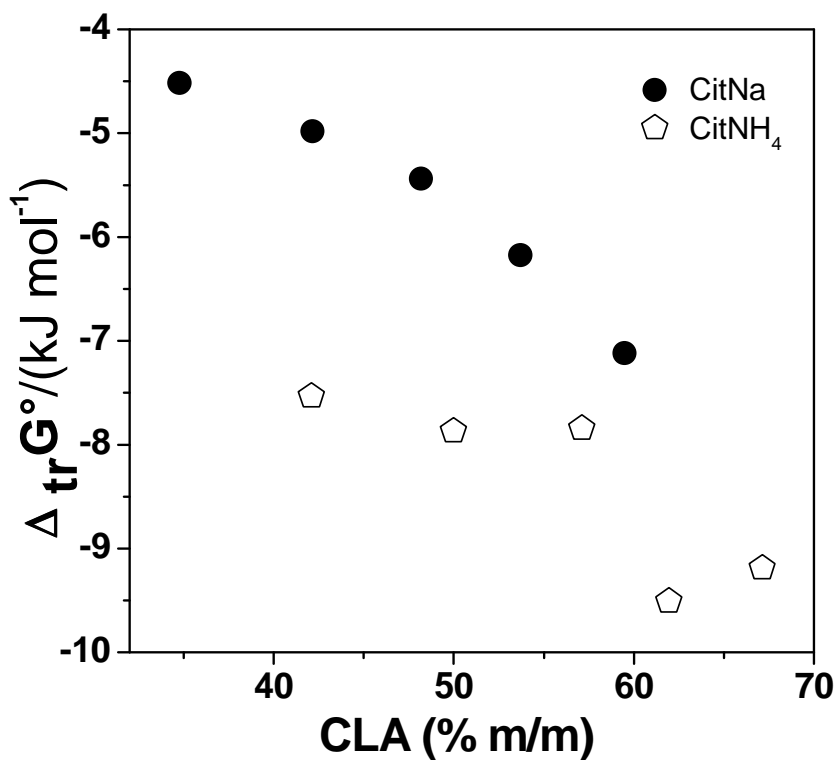


Figura 14 – Valores de $\Delta_{tr}G$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco com sais de citrato de sódio e amônio, a 25°C.

Avaliou-se também a relação entre $\Delta_{tr}G$ e a CLA dos SABs formados pelo copolímero L35 e sais de citrato de sódio e amônio como mostra a Figura 14.

Resultado similar ao mostrado anteriormente, os valores de $\Delta_{tr}G$ diminuem com o aumento do CLA e são todos negativos, estando os valores compreendidos entre $-4,0$ e $-9,0$ kJ mol^{-1} . Estes valores de variação da energia livre de Gibbs estão na mesma magnitude observada para os efeitos dos diferentes ânions.

5.3 Efeito do aumento da Hidrofobicidade das macromoléculas sobre a partição do corante natural carmim

A figura 15 mostra o coeficiente de partição em função do CLA para SABs formados pelo mesmo sal citrato de Sódio e PEO 1500 ou diferentes copolímeros.

No trabalho anterior, de Mageste e colaboradores², quanto maior era a massa molar do polímero, maior era K_c e quanto maior a hidrofobicidade menor era o K_c . Analisando pelo aumento da massa molar das macromoléculas, a ordem crescente de tamanho é: PEO 1500 < L35 < L64 < F68. E levando em consideração a hidrofobicidade a ordem crescente é: PEO 1500 < F68 < L35 < L64. O maior K_c foi para o SAB formado por PEO 1500 e o F68 que são as macromoléculas mais hidrofílicas. Já o L64 e o L35 mais hidrofóbicas, menores valores de K_c . Comprovando que o aumento da hidrofobicidade das fases superiores levou a uma diminuição do coeficiente de partição.

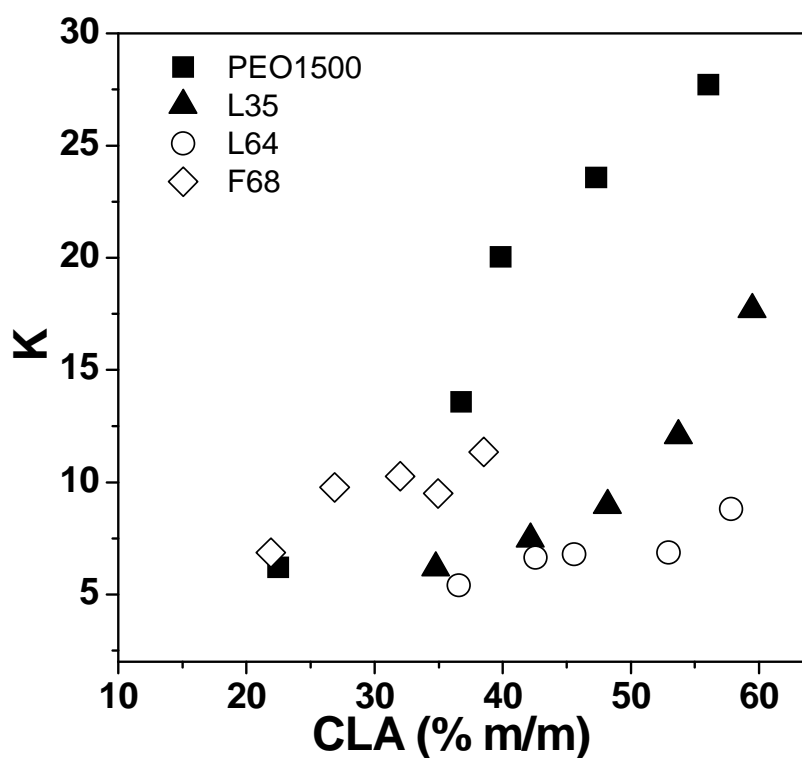


Figura 15 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas.

Para comprovarmos esse efeito da hidrofobicidade, na Figura 16, mostramos a relação entre o $\Delta_{tr}G$ e o CLA. Independente da macromolécula usada na construção do SAB, o $\Delta_{tr}G^0$ se torna cada vez mais negativo com o aumento do CLA. O incremento da hidrofobicidade, provoca um aumento do $\Delta_{tr}G^0$ na seguinte ordem: PEO 1500 < F68 < L35 < L64.

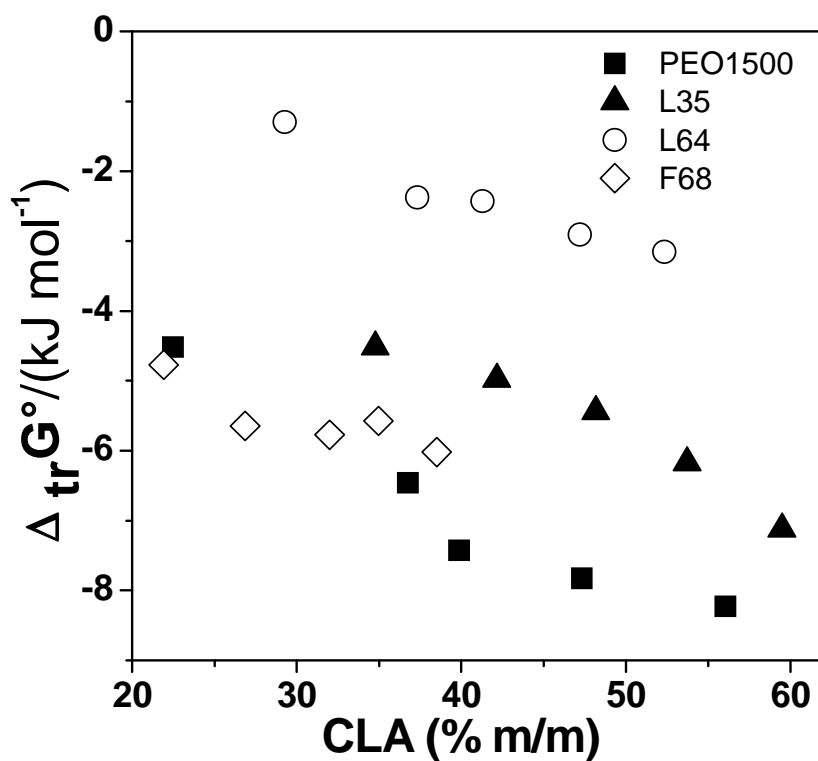


Figura 16 – Valores de $\Delta_{tr}G^\circ$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas.

Na figura 17 mudamos apenas o eletrólito formador do SAB de citrato para tartarato de sódio. A ordem do PEO 1500 com F68 foi invertida, e este passa a ter o maior Kc. Mostrando então que o balanço hidrofílico/hidrofóbico é também influenciado pela natureza do eletrólito.

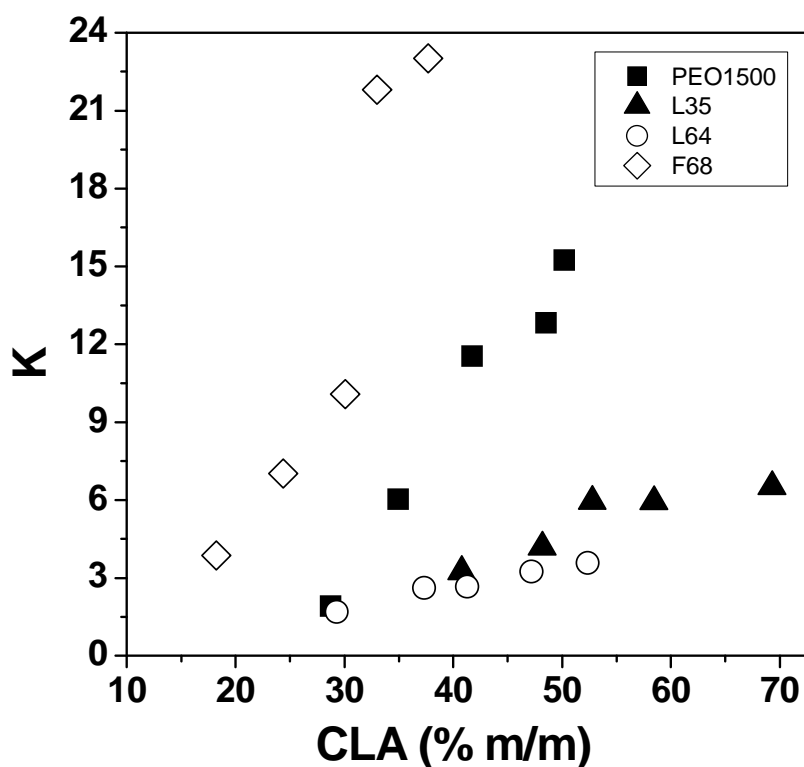


Figura 17 – Coeficiente de Partição (K_c) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas.

Na figura 18, o resultado similar ao anterior (Figura 16). Mais uma vez fica claro que a transferência é espontânea, e que o aumento da hidrofobicidade, aumenta o $\Delta_{tr}G$. Indicando o caráter hidrofílico das moléculas de carmim. Como é conhecido que os copolímeros se auto-associam na forma de micelas, e que esse fenômeno é favorecido pelo aumento da hidrofobicidade. Fica comprovado que as moléculas de carmim não têm a tendência de se solubilizar no interior hidrofóbico das micelas.

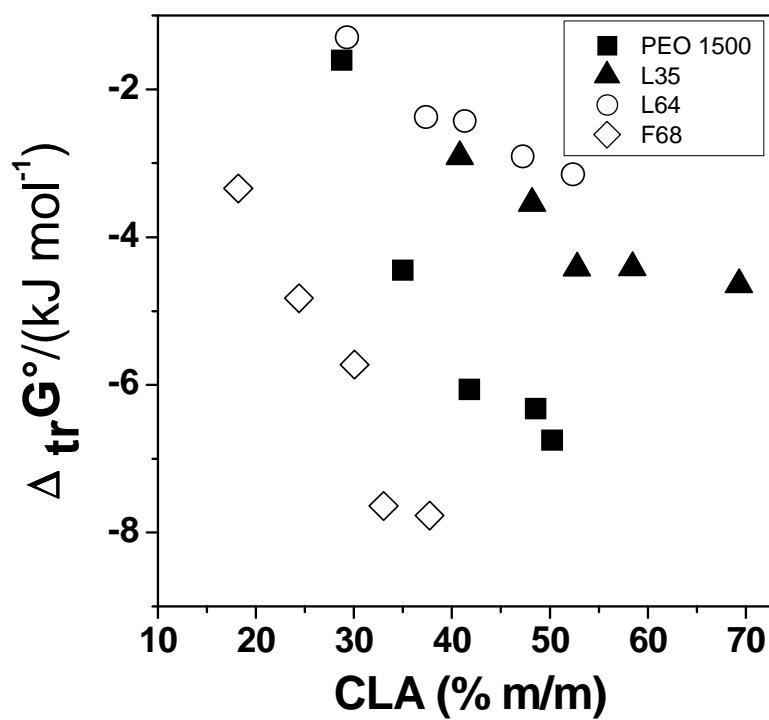


Figura 18 – Valores de $\Delta_{tr}G^\circ$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas.

5.4 Parâmetros Termodinâmicos de transferência do carmim

Todas as propriedades de transferência obtidas a partir de SABs formados por macromoléculas e sais dependem das interações eletrostáticas de longo alcance que ocorrem entre os íons e também das interações iônicas e não-iônicas de curto alcance que ocorrem entre as macromoléculas sem carga e os diferentes íons presentes nos SABs. Então, para obter uma descrição teórica dos resultados termodinâmicos associados à transferência do carmim, optou-se por um modelo simples, derivado da teoria de Flory-Huggins, que produz expressões semi-quantitativas para o coeficiente de partição.³⁷ Essas equações seguem uma simples interpretação qualitativa indicando que existem apenas duas contribuições que regem a partição do soluto uma entálpica e outra entrópica.

Segundo o modelo de Haynes e colaboradores, a contribuição entrópica que dirige a partição foi descrita pela equação 3.³⁷

De acordo com esse modelo, considerando que a fase que possui maior densidade numérica é a fase inferior por possuir maior teor de moléculas de água, as moléculas de carmim teriam a tendência de se transferir preferencialmente para a fase inferior,³⁷ em desacordo com os resultados experimentais obtidos.

Então essa partição só poderia estar sendo regida pela contribuição entálpica que foi descrita pela equação 4.

Baseado na equação 4, a contribuição entálpica tem dois termos. O primeiro termo é a contribuição energética da interação direta entre o carmim e todos os componentes de cada fase. A fase superior é rica em macromoléculas o que comprova que existe uma forte interação do carmim com a macromolécula (PEO1500, L35, L64 ou F68) favorecendo a sua transferência para a fase superior. O segundo termo considera a energia envolvida no processo de formação e destruição de cavidades, que ocorre nas fases superiores e inferiores, respectivamente, durante o processo de transferência

do carmim. A transferência do carmim da fase inferior para a superior implica a quebra das interações entre todos os componentes presentes na fase superior para que ocorra a formação de uma cavidade capaz de alojar a molécula do corante. Ao deixar a fase inferior, a molécula do corante deixa para trás uma cavidade na qual os componentes da fase inferior podem realizar novas interações intermoleculares. Essas energias são dependentes do volume do soluto. Foi comprovado por estudos anteriores do grupo que esse segundo termo não contribui muito para a partição.³⁸

Determinaram-se experimentalmente os parâmetros termodinâmicos para todos os SABs investigados. A variação da energia livre de Gibbs de transferência foi determinada pela equação 7.

Os valores para entalpia de transferência foram calculados pelos dados obtidos a partir do microcalorímetro de titulação isotérmica, enquanto a entropia de transferência do carmim foi determinada indiretamente a partir dos dados de $\Delta_{tr}G$ e $\Delta_{tr}H$ obtidos experimentalmente através do rearranjo da equação 8.

Na qual T é a temperatura em Kelvin(K), para todos os SABs a entropia foi calculada a temperatura de 298 K.

Na Tabela 5 são apresentados todos os parâmetros termodinâmicos determinados para os SABs investigados formados por diferentes macromoléculas e o sal tartarato de sódio para valores próximos de CLA.

Observamos na tabela 5 que os valores de $\Delta_{tr}G$ são negativos para todos os CLAs dos SABs, indicando que o processo de transferência do carmim é espontâneo.

Entretanto para compreendermos os valores de $\Delta_{tr}G$ devemos considerar as contribuições entálpicas e entrópicas relacionadas pela equação clássica da termodinâmica. Para a entalpia de transferência, realizamos os experimentos de calorimetria, calculamos o $\Delta_{tr}G$ a partir dos valores do coeficiente de partição e com essa equação calculamos o $\Delta_{tr}S$.

Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos de transferência do corante carmim em SABs formados por diferentes macromoléculas e o sal tartarato de sódio

POLÍMERO	CLA	$\Delta_{tr}G/ \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}H/ \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_{tr}S/ \text{kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$
PEO 1500	41,74	-6,1	13,5	0,06
L35	40,8	-2,9	-108,9	-0,36
L64	41,28	-2,4	-64,5	-0,21
F68	37,7	-7,7	-36,4	-0,09

Para o SAB PEO 1500 Tartarato de Sódio, CLA 41,74. A variação do $\Delta_{tr}G$ de transferência foi -6,1, indicando que o processo é espontâneo. O $\Delta_{tr}H$ 13,5, endotérmico, indicando que as moléculas de carmim tiveram que absorver energia. E a única causa é o aumento da entropia, os valores baixos estão relacionados apenas com a entropia configuracional. Esse sistema foi o único que apresentou valor positivo de $\Delta_{tr}H$ e $\Delta_{tr}S$, mesmo apresentando valor negativo de $\Delta_{tr}G$, o que indicou que esse processo também era espontâneo como os outros. O que determina o valor positivo (processo endotérmico) ou negativo (processo exotérmico) do $\Delta_{tr}H$ é a magnitude das interações rompidas e formadas durante o processo de transferência das moléculas de carmim conforme a equação 9.

$$\Delta_{tr}H = \Delta_{C-sal}H + \Delta_{C-H_2O}H + \Delta_{sal-H_2O}H + \Delta_{P-H_2O}H + \Delta_{P-sal}H + \Delta_{C-p}H \quad (\text{Eq. 9})$$

O termo $\Delta_{C-sal}H$ é a variação da entalpia referente ao rompimento da interação carmim-sal ($\Delta_{C-sal}H > 0$).

O termo $\Delta_{C-água}H$ é a variação da entalpia referente ao rompimento da interação carmim-água ($\Delta_{C-água}H > 0$).

O termo $\Delta_{\text{sal-água}}H$ é a variação da entalpia referente à formação da interação sal-água ($\Delta_{\text{sal-água}}H < 0$).

O termo $\Delta_{\text{polímero-água}}H$ é a variação da entalpia referente ao rompimento da interação polímero-água ($\Delta_{\text{p-água}}H > 0$).

O termo $\Delta_{\text{polímero-sal}}H$ é a variação da entalpia referente ao rompimento da interação polímero-sal ($\Delta_{\text{p-sal}}H > 0$).

O termo $\Delta_{\text{carmim-polímero}}H$ é a variação da entalpia referente à formação da interação carmim-polímero ($\Delta_{\text{c-p}}H < 0$).

Quando a magnitude das interações rompidas é maior do que a magnitude das interações formadas o $\Delta_{\text{tr}}H$ é positivo e o processo é endotérmico. E quando a magnitude das interações rompidas é menor do que das interações formadas, o $\Delta_{\text{tr}}H$ é negativo e o processo é exotérmico.

Para o SAB F68 Tartarato de Sódio, CLA 37,7. A variação do $\Delta_{\text{tr}}G$ de transferência foi -6,3 bem próximo ao anterior. Já o $\Delta_{\text{tr}}H$ -36,4, exotérmico, indicando que o carmim para se transferir liberou energia, causando uma redução da entropia.

E para o SAB L35 tartarato de sódio, CLA 40,8. A variação do $\Delta_{\text{tr}}G$ de transferência foi de -2,9, uma espontaneidade menor do que os vistos anteriormente. A variação do $\Delta_{\text{tr}}H$ foi de -108,9, indicando que houve uma maior liberação de energia, exercendo uma redução muito grande de entropia. Clara indicação do efeito hidrofóbico causado pelo L35. E Resultado similar para o L64, CLA 41,28. A variação do $\Delta_{\text{tr}}G$ de transferência foi de -2,4, a variação do $\Delta_{\text{tr}}H$ foi de -64,5 e a variação do $\Delta_{\text{tr}}S$ foi de -0,21.

Quanto maior a hidrofobicidade mais negativa é o $\Delta_{\text{tr}}H$ e maior é a redução da entropia do sistema. Este comportamento das propriedades termodinâmicas de transferência é devido à menor interação das moléculas água com as macromoléculas mais hidrofóbicas, sendo assim necessária menor energia para dessolvatar a cadeia polimérica durante o processo de interação polímero-corante. Esta menor interação H₂O-macromolécula causa também uma transferência de moléculas de água da fase superior para a

inferior, promovendo assim a diminuição da entropia do sistema durante a transferência das moléculas do corante.

6. Conclusões

Os sistemas aquosos bifásicos são uma alternativa atraente para a purificação do carmin. A presente investigação revelou que as moléculas de carmin particionam preferencialmente para a fase superior, rica em macromolécula, de cada sistema.

A interação entálpica entre as macromoléculas e o corante, ocorrem entre o carmin e a unidade EO e é muito dependente da natureza do eletrólito formador do SAB. A dependência do sal é atribuída à intermediação do cátion ou ânion na interação carmin-macromolécula, formando um pseudo-polication ou pseudo-poliânion respectivamente. A alta densidade de carga positiva favorece a interação. Quando existe alta densidade de carga negativa ocorre o contrário. Os ânions interagem mais com a macromolécula impedindo a interação do carmin. A ordem crescente de interação dos ânions com a macromolécula é: acetato < citrato < tartarato < carbonato.

O processo de transferência do carmin para a fase superior dos SABs é espontâneo. Com o aumento da hidrofobicidade a transferência é entalpicamente determinada, enquanto no sistema PEO 1500 a partição foi entropicamente dirigida.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Mageste, A. B.; De Lemos, L. R.; Da Silva, M. C. H.; Ferreira, G. M. D.; 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** 1216 (2009) 7623-7629.
- [2] Carvalho, P. R. N. **Extração de ácido carmínico e análise por cromatografia líquida de alta eficiência**. 1996. F. Tese (Doutorado em Química)-Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- [3] Dapson, R. W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. **Biotechnic and Histochemistry** 82 (2007) 173-187.
- [4] CHR Hansen. Disponível em: <<http://www.chr-hansen.com>>. Acesso em: 23 jun. 2010
- [5] González, M.; Méndez, J.; Carneiro, A.; Lobo, G. M.; Afonso, A. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. **J. Agric. Food Chem.** 50 (2002) 6968- 6974.
- [6] González, M.; Méndez, J.; Carneiro, A.; Lobo, G. M.; Afonso, A. Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis. **J. Agric. Food Chem.** 52 (2004) 1331- 1337.
- [7] González, M.; Lobo, G. M.; Méndez, J.; Carneiro, A. Detection of colour adulteration in cochineals by spectrophotometric determination of yellow and red pigments groups. **Food Control** 16 (2005) 105- 112.
- [8] Surowlec, I.; Szostek B.; Trojanowicz, M. HPLC-MS of anthraquinoids, and their degradation products in analysis of natural dyes in archeological objects. **J. Sep. Sci.** 30 (2007) 2070-2079.
- [9] Favaro, G.; Miliani C.; Romani A.; Vagnini M. .Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake in solution and painted layers. **J. Chemical Society, Perkin Transactions 2** (2002), 192-197.

- [10] Maier, M. S.; Parera, Sara, D.; Seldes, A. M. Matrix-assisted laser desorption and electrospray ionization mass spectrometry of carminic acid isolated from cochineal. **Int. J. Mass Spectrom.** 232 (2004) 225-229.
- [11] Puchalska, M.; Orlinska, M.; Ackacha M. A.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M. Identification of antraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. **J. Mass Spectrom.** 38 (2003) 1252-1258.
- [12] Lopez-Montes, A.; Garcia, R. B.; Espejo, T.; Huertas-Perez J. F.; Navalon, A.; Vilchez. Simultaneous identification of natural dyes in the collection of drawings and maps from the Royal chancellery Archives in Granada (Spain) by CE. **Electrophoresis** 28 (2007), 1243-1251.
- [13] Maguregui, M. I.; Alonso, R. M.; Barandiaran, M.; Jimenez, R. M.; García,N. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of several natural red dyestuff and lake pigments used in art work. **J. Chromatogr. A** 1154 (2007) 429- 436.
- [14] Huang, H.; Shih, Y; Chen, Y.; Determination eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A** 959 (2002) 317- 325.
- [15] González, M.; Gallelo, M.; Valcárel, M. Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in liophilized foods using na automatic solid-phase extraction system. **J. Agric. Food Chem.** 51 (2003) 2121- 2129.
- [16] González, M.; Gallelo, M.; Valcárel, M. Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods. **Anal. Chim. Acta** 454 (2002) 237- 247.
- [17] Jaworska, M.; Szulinska, Z.; Wilk, M. Anuszevska. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system Application to pharmaceutical analysis. **J. Chromatogr. A** 1081(2005) 42- 47.

[18] González, E. A.; García, E. M.; Nazareno, M. A. Free Radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. **Food Chem.** 119 (2010) 358-362.

[19] Lev-Goldman, V.; Mester, B.; Ben-Aroya, N.; Hanoch, T.; Rupp, B. Stanoeva, T.; Gescheidt, G.; Seger, R.; Koch, Y.; Weiner, L.; Fridkin, M. Conjugates of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with carminic acid: Synthesis, generation of reactive oxygen species (ROS) and biological evaluation. **Bioorg. Med. Chem.** 16 (2008) 6789-6798.

[20] Comanici, R.; Gabel, B.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D.; Cornaggia, C.; Pommeret, S.; Russu, C.; Kryschi, C. Femtosecond spectroscopy study of carminic acid-DNA interactions. **Chem. Phys.** 325 (2006) 509-518.

[21] Wua J.; Huang C.; Cheng G.; Zhang F.; He P.; Fang Y. Electrochemically active-inactive switching molecular beacon for direct detection of DNA in homogenous solution. **Electrochem. Commun.** 11 (2009) 177-180.

[22] Lucas, C. D.; Halagam, J. B. The role of natural color additives in food allergy. In: *Advances in food and nutrition research*, v. 46, p.196-216, 2001.

[23] Food and Drug Administration. <<http://www.fda.gov/>> Acesso em: 25. Jun. 2010

[24] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO CNNPA Nº 44, de 01 de Fevereiro de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/44_77.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[25] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 382, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECE SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 13 – MOLHOS E CONDIMENTOS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/382_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[26] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 384, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA

O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 3 – GELADOS COMESTÍVEIS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/384_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[27] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 385, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 6 – CEREAIS E PRODUTOS DE OU A BASE DE CEREAIS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/385_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[28] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 387, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 5: BALAS, CONFEITOS, BOMBONS, CHOCOLATES E SIMILARES. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/387_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[29] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 388, de 05 de Agosto de 1999. "REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 19 – SOBREMESAS" Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/388_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[30] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 389, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 16: BEBIDAS – SUBCATEGORIA 16.2.2 – BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/389_99.htm> Acesso em: 22. jun. 2010

[31] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PORTARIA Nº 1004, de 11 de Dezembro de 1998. Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos" Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1004_98.htm> Acesso em: 22 jun. 2010

[32] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PORTARIA nº 376, de 26 de Abril de 1999. INCLUSÃO DOS ADITIVOS INS 461 METILCELULOSE E INS 464 HIDROXIPROPIL METILCELULOSE NA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA NAS FUNÇÕES ESPESSANTE E ESTABILIZANTE. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/376_99.htm> Acesso em: 22, jun. 2010

[33] Rodrigues, G. D. **Um método verde e sensível para determinação de fenóis em amostras de água utilizando sistemas aquosos bifásicos**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

[34] Da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J. ; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para a extração de íons. **Química Nova** 29 (2006) 1332- 1339.

[35] Brito, G. M. **Termodinâmica de partição do ânion $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

[36] Da silva, L. H. M. **Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas aquosos bifásicos contendo poli(óxido de etileno)**. 2001. 118f. Tese (Doutorado em Química)-Unicamp, Campinas, SP, 2001.

[37] Johansson, H. O.; Karlström G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. A. Driving forces phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. B** 711 (1998) 3-17.

- [38] da Silva, L. H. M.; da Silva, M .C. H.;Aquino, R. A. N.; Francisco, K.R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Entalpic 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** 110 (2006) 23540-23546.
- [39] Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Boaz, K. R.; Rogers, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **J. Chromatogr. B** 711 (1998) 237- 244.
- [40] Teixeira, L. S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e as em diferentes temperaturas.** 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- [41] Lemos, L. R. ; Santos, I. J. B. ; Rodrigues, G. D. ; Ferreira, G. M. D. ; da Silva, L. H. M. ; da SILVA, M.D.H. ; de Carvalho, R. M. M. Phase Compositions of Aqueous Two phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng. Data** 55 (2010)1193-1199.
- [42] Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da SILVA, M.D.H.; da Silva, L. H. M.; Patricio, P.R.; Coimbra, J. S.; Minim, L. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. **J. Chem. Eng. Data** 54 (2009) 2891-2894.
- [43] Martins, J. P. ; da Silva, M.D.H. ; da Silva, L. H. M. ; Senra, T. D. A. ; Ferreira, G. M. D. ; Coimbra J. S. R. ; Minim, L. A. . Liquid Liquid Phase Equilibrium of Triblock Copolymer F68, Poly(ethylene oxide) b poly (propylene oxide) b poly(ethylene oxide), with Sulfate Salts. **J. Chem. Eng. Data** 55 (2010) 1618-1622.
- [44] Alves, J. G. L. F.; Brenneissen, J.; Ninni, L.; Meirelles, A. J. A.; Maurer, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. **J. Chem. Eng. Data** 53 (2008) 1587-1594.

[45] Junior, J. M. **Efeito Hidrofóbico de Macromoléculas sobre a partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos**. 2006. 50f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

[46] Da Silva, L. H. M.; Da Silva, M. C. H.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S.R. PEO– $[M(CN)_5NO]^{x-}$ (M = Fe, Mn, or Cr) Interaction as a Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: Strong Effect of the Central Atom. **J. Phys. Chem. B** 112 (2008) 11670-11678.