

ANNE CAROLINE GUIMARÃES VELOSO

**NOVOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS APLICADOS NO PREPARO DE
AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES
SINTÉTICOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

V443n
2018

Veloso, Anne Caroline Guimarães, 1988-

Novos sistemas aquosos bifásicos aplicados no preparo de amostras alimentícias para a determinação de corantes sintéticos / Anne Caroline Guimarães Veloso. – Viçosa, MG, 2018.
xviii, 92 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maria do Carmo Hespanhol.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Sistemas aquosos bifásicos. 2. Corantes em alimentos - Amostragem. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Doutorado em Agroquímica. II. Título.

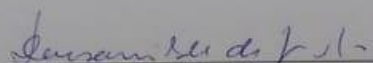
CDD 22. ed. 541.392

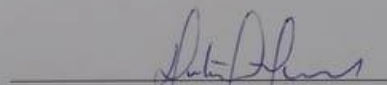
ANNE CAROLINE GUIMARÃES VELOSO

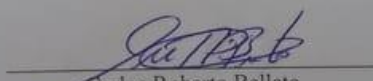
NOVOS SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS APLICADOS NO PREPARO DE
AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS PARA A DETERMINAÇÃO DE CORANTES
SINTÉTICOS

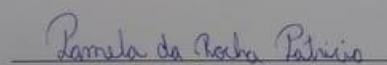
Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

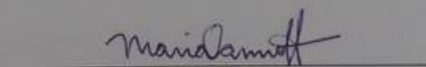
APROVADA: 13 de julho de 2018.


Deusanilde de Jesus Silva


Antônio Augusto Neves


Carlos Roberto Bellato


Pamela da Rocha Patrício


Maria do Carmo Hespanhol
(Orientadora)

À minha Mãe, in memoriam, dedico este trabalho!

*“Vou te contar
Os olhos já não podem ver
Coisas que só o coração pode entender
Fundamental é mesmo o amor
É impossível ser feliz sozinho...”*
Wave, Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir a vida, pelos momentos maravilhosos que colecionei e pelas oportunidades.

Aos meus irmãos Ana, Zau, Zack e meu sobrinho Guiu, que são a melhor definição da palavra amor. O alicerce da minha vida, sem os quais “mesmo que eu conhecesse toda a ciência, e falasse todas as línguas do mundo” eu nada seria. Obrigada pelo amor e carinho nos momentos mais dolorosos desta jornada; pelos abraços de 20 minutos, pela preocupação e por tornar minha vida tão colorida. Amo todos vocês mais que tudo no mundo.

Ao meu namorado Jonas pelo carinho, companheirismo e por gentilmente ceder seu ombro todas as noites para que eu durma bem. Agradeço o cuidado e o amor de todos os dias.

A Juan Carlos, meu melhor amigo desde o primeiro dia de Viçosa. Minha dupla inseparável! Agradeço a amizade sincera, os conselhos e as divertidíssimas histórias de Marliéria.

Aos muitos amigos que fiz em Viçosa, e aos de Montes Claros que estiveram presente mesmo de tão longe, obrigada a todos!

Ao QUIVECOM por todo o suporte e pela contribuição para a minha formação profissional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica pela oportunidade oferecida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de doutorado e auxílio financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) pelo auxílio financeiro.

À Professora Carminha e ao Professor Luis pela orientação, pelos ensinamentos, pelas oportunidades de crescimento e pela grande ajuda ao longo de todos esses anos. Muitíssimo obrigada!

À todos aqueles que por algum descuido meu não estão aqui citados, e que me acompanharam nesta jornada, meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Anne Caroline Guimarães Veloso, filha de Isaú Ferreira Veloso e Maria Eva Guimarães Velsos, nasceu em 04 de julho de 1988 na cidade de Montes Claros em Minas Gerais.

Em fevereiro de 2006 ingressou no curso de Engenharia Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia de Montes Claros. Em 2007, iniciou atividades como analista de laboratório na empresa Vallée, onde permaneceu até setembro de 2010.

Em dezembro de 2011 graduou-se em Bacharelado em Engenharia Química.

Em fevereiro de 2012, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, com defesa de dissertação em fevereiro de 2014.

Em março de 2014, iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, se submentendo a defesa de tese em julho de 2018.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1	1
Revisão de literatura.....	1
1. Introdução.....	1
1.1. Corantes Artificiais.....	1
1.1.1. Efeitos deletérios associados ao consumo de corantes.....	2
1.1.2. Legislação brasileira.....	2
1.1.3. Preparos de amostra e determinação de corantes artificiais em alimentos.....	3
1.2. Sistema aquoso bifásico (SAB).....	10
1.2.1. Sistema aquoso bifásico: termodinâmica de formação.....	13
2. Objetivo geral.....	18
2.1. Objetivos Específicos.....	18
3. Referências.....	19
CAPÍTULO 2	27
ABSTRACT	27
1. Introduction.....	28

2. Materials and Methods.....	29
2.1. Materials.....	29
2.2. Preparation of the aqueous two-phase systems.....	30
2.3. Determination of equilibrium composition.....	31
3. Results and Discussion.....	32
3.1. Equilibrium data of aqueous two-phase systems.....	32
3.2. Effect of the anion nature on the phase separation process.....	37
3.3. Effect of the temperature on ATPS composition.....	38
3.4. Thermodynamic modeling and estimation procedure.....	41
4. Conclusion.....	44
5. References.....	44
CAPÍTULO 3.....	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. Introdução.....	48
2. Materiais e métodos.....	55
2.1 Materiais.....	55
2.2 Equipamentos.....	56
2.3 Preparo do sistema aquoso bifásico e montagem dos tubos de partição.....	56
2.3.1 Influência da concentração do corante na razão de partição (K).....	58
2.3.2. Efeito da composição do SAB na partição dos corantes.....	59
2.3.3. Efeito do pH sobre a razão de partição.....	59
2.3.4. Efeito do ânion formador do SAB sobre a razão de	

partição.....	60
2.4 Determinação da razão de partição (K).....	60
2.5 Determinação da porcentagem de extração dos corantes.....	60
2.6 Determinação de corante nas amostras autênticas.....	61
2.6.1. Método de adição padrão.....	61
2.6.2. Método direto.....	62
2.6.3. Método SAB.....	62
2.7 Análise estatística.....	64
3 Resultados e discussão.....	64
3.1. Efeito da concentração do corante sobre a razão de partição.....	64
3.2. Efeito da composição do SAB sobre a partição dos corantes.....	67
3.3. Efeito do pH sobre a razão de partição.....	72
3.4. Efeito do ânion formador do SAB sobre a razão de partição.....	76
3.5. Porcentagem de extração dos corantes.....	79
3.6. Extração e determinação de corantes em amostras autênticas.....	81
4. Conclusões.....	87
5. Referências.....	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura molecular e pKa dos corantes (A) Azul Brillhante, (B) Amarelo Crepúsculo, (C) Amarelo Tartrazina e (D) Vermelho 40.....	3
Figura 2. Estrutura molecular do L35.....	12
Figura 3. Diagrama de fases retangular de um SAB formado por polímero, eletrólito e água.....	14

CAPÍTULO 2

Fig. 1. Influence of the anion on the phase diagram of the L35 + ammonium electrolyte + H ₂ O at 298.2 K. (○) (NH ₄) ₂ PO ₄ , (■) (NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆ , (Δ) (NH ₄) ₂ NO ₃ and (●) NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	37
Fig.2. Influence of the temperature on the phase diagram of the L35 + ammonium electrolyte + H ₂ O ATPS. (—○—) 298.2 K and (—■—) 313.2 K.....	39

CAPÍTULO 3

Figura 1. Estrutura molecular e pKa dos corantes (A) Azul Brillhante, (B) Amarelo Crepúsculo, (C) Amarelo Tartrazina e (D) Vermelho 40.....	54
Figura 2. Razão de partição (K) em função da concentração dos corantes AB (□), AC (●), AT (⊙) e V40 (▼) no SAB L35 + tartarato de amônio + água a 25,0 °C e CLA 48,11% (m/m), pH 6,0.....	65
Figura 3. Espectros do corante AB na fase superior (....) na fase inferior (___) e em água (___) em faixa de comprimento de onda de 190 a 900 nm e concentrações finais	

do corante variando de 39 a 641 mg kg ⁻¹	66
Figura 4. Variação da K dos corantes AB (□), AC (●), AT (⊙) e V40 (▼) em função do CLA no SAB L35 + tartarato de amônio + água, 25,0 °C, pH 6,0.....	68
Figura 5. Variação da K dos corantes: (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 no SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, em CLA ~ 47 % (m/m) e nos pHs 2,0, 6,0 e 10,0. (♦) nitrato de amônio, (▲) tartarato de amônio e (■) fosfato de amônio dibásico.....	74
Figura 6: Variação dos valores médios da K dos corantes (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 no SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, pH 6,0. (♦) nitrato de amônio, (▲) tartarato de amônio e (■) fosfato de amônio dibásico.....	77
Figura 7: Porcentagem de extração (%E) dos corantes (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 nos SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, pH 6,0. (▲) tartarato de amônio, (■) fosfato de amônio dibásico e (●) nitrato de amônio.....	81
Figura 8: Curva de adição padrão (■) e curva em água (●) do corante V40.....	83

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Specification of chemical samples.....	30
Table 2. Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + NH ₄ NO ₃ (2) + H ₂ O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure p = 0.09 MPa	33
Table 3. Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + (NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆ (2) + H ₂ O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure p = 0.09 MPa.....	34
Table 4. Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + (NH ₄) ₂ HPO ₄ (2) + H ₂ O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure p = 0.09 MPa.....	35
Table 5. Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂ (2) + H ₂ O (3) at the temperature 298.2 K and pressure p = 0.09 MPa.....	35
Table 6. STL values systems at 298.2 and 313.2 K.....	40
Table 7. Estimated original NRTL parameters.....	43
Table 8. Estimated modified NRTL parameters.....	43
Table 9. Root mean square deviations in ternary systems (original NRTL and modified NRTL).....	43

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Dados de equilíbrio líquido-líquido dos SAB utilizados.....	57
------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2. Composição global do SAB formado por L35 + tartarato de amônio + amostra.....	63
Tabela 3. Diferença na concentração de H ₂ O, % (m/m), entre FI e FS do SAB formado por L35 + tartarato de amônio + H ₂ O a 25,0 °C.....	70
Tabela 4. Comparação da K dos corantes nos SAB formados por diferentes ânions em CLA próximo a 47% (m/m).....	78
Tabela 5. Composição dos SAB formados por L35 + eletrólito de amônio + água a 25,0 °C.....	79
Tabela 6. Comparação entre a quantificação dos corantes nas amostras autênticas..	82
Tabela 7. Comparação entre métodos analíticos para a determinação de corantes alimentícios.....	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% – Porcentagem

% (m/m) – Porcentagem massa-massa

$\Delta_{\text{mix}}G$ – Variação da energia livre de Gibbs de mistura

$\Delta_{\text{mix}}H$ – Variação da entalpia de mistura

$\Delta_{\text{mix}}S$ – Variação da entropia de mistura

AB – Azul brilhante

AC – Amarelo crepúsculo

AES-MIP – Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por micro-ondas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AR-40 – Allura red 40

AT – Amarelo tartrazina

ATPS – Aqueous two-phase system

BB – Brilliant blue

CFRE – Concentração da fase rica em eletrólito

CFRM – Concentração da fase rica em macromolécula

CGL – Composição global

CLA – Comprimento da linha de amarração

dp – Desvio padrão

EAM – Espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultra violeta e visível

EO – Óxido de etileno

ER – Erro relativo

ERP – Electrolyte rich phase

FAAS – Espectrômetro de absorção atômica

FI – Fase inferior

FRE – Fase rica em eletrólito

FRM – Fase rica em macromolécula

FS – Fase superior

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IDA – Ingestão diária aceitável

K– Razão de partição
LA– Linha de amarração
LB – Linha binodal
LLE – Liquid-liquid equilibrium
MRP – Macromolecule rich phase
NRTL – Non-random two-liquid
Pc – Ponto crítico
PEG – poli(etileno glicol)
PEO – poli(óxido de etileno)
PO – Óxido de propileno
PPO – poli(propileno glicol)
R – Constante dos gases
SAB – Sistema aquoso bifásico
STL – Slope of the tie line
SY – Sunset yellow
T – Temperatura em Kelvin
TLC – Cromatografia camada delgada
TLL – Tie line length
TY – Tartrazine yellow
V40 – Vermelho 40

RESUMO

VELOSO, Anne Caroline Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Novos sistemas aquosos bifásicos aplicados no preparo de amostras alimentícias para a determinação de corantes sintéticos.** Orientadora: Maria do Carmo Hespanhol. Coorientador: Luis Henrique Mendes da Silva.

A ingestão de corantes alimentícios artificiais, principalmente por crianças, frequentemente provoca o aparecimento de reações alérgicas, problemas respiratórios e hiperatividade. Por isso é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes e seguros para o monitoramento destes corantes em matrizes alimentícias. Neste contexto, é proposto neste trabalho a obtenção de sistema aquoso bifásico (SAB) com novos componentes que sejam mais seguros ambientalmente, mais econômicos, promovam uma mais rápida separação de fases e sejam mais específicos para os analitos em questão. Para tal, novos dados de equilíbrio líquido-líquido foram propostos para sistemas formados por copolímero tribloco L35 + sal de amônio [(NH₄NO₃, NH₄C₂H₃O₂, (NH₄)₂C₄H₄O₆ ou (NH₄)₂HPO₄)] + água em diferentes temperaturas. Os parâmetros energéticos dos dados experimentais dos SAB foram preditos com os modelos NRTL e com o NRTL modificado, obtendo-se correlação satisfatória, com desvios de 2,36 e 2,52 %, respectivamente. Os parâmetros que afetam a região bifásica, tais como, natureza do eletrólito e temperatura, foram avaliados. Para todos os SAB, o aumento da temperatura resultou em um discreto aumento da área bifásica. A região bifásica foi maior no SAB formado por hidrogenofosfato, e menor para o formado por acetato. Avaliou-se o comportamento de partição dos corantes azul brilhante (AB), amarelo crepúsculo (AC), amarelo tartrazina (AT) e vermelho 40 (V40) nos SAB formados por L35 + sal de amônio [(NH₄NO₃, (NH₄)₂C₄H₄O₆ ou (NH₄)₂HPO₄)] + água em diferentes valores de pH e comprimentos de linha de amarração. Os corantes particionaram-se preferencialmente para a fase superior do SAB, sendo o processo entalpicamente dirigido. A partição foi favorecida com o aumento do comprimento de linha de amarração. Já o pH apresentou discreto efeito na partição de todos os analitos. Para todos os corantes, a extração foi superior a 99,0 % no SAB formado por L35 + tartarato de amônio + água. A partir dos dados de extração dos corantes foi proposto um novo método de extração e pré-concentração de corantes presentes em bebidas não alcoólicas, utilizando SAB e determinação por espectrometria de absorção na

região do UV/visível. A amostra, sem nenhum preparo prévio, foi adicionada diretamente ao SAB L35 + tartarato de amônio obtendo-se excelente extração 99,7, 99,7, 99,3 e 99,8 % para os corantes AB, AC, AT e V40, respectivamente. O limite de quantificação igual a 0,135, 0,203, 0,364 e 1,20 mg kg⁻¹ foi obtido para o corante AB, AC, AT e V40, respectivamente. Para todos os corantes, as curvas analíticas apresentaram $R^2 > 0,999$. O método apresentou boa exatidão, variando de 0,11 a 2,71 % e boa precisão 0,3 a 1,6 %. Todas as amostras de bebidas analisadas apresentaram um teor de corantes abaixo do limite máximo preconizado pela legislação brasileira. O método proposto provou ser eficiente para a determinação de corantes em matriz complexa de bebidas não alcoólicas. Além disso, ele apresenta vantagens como baixo custo, rapidez, não utilização de solvente orgânico e menor consumo de amostra, quando comparado aos outros métodos já descritos na literatura.

ABSTRACT

VELOSO, Anne Caroline Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **New aqueous two-phase systems applied in the food sample preparation for the determination of synthetic dyes.** Adviser: Maria do Carmo Hespanhol. Co-Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva.

Ingestion of artificial food dyes, especially by children, often causes the onset of allergic reactions, respiratory problems, and hyperactivity. Therefore, the development of efficient and safe analytical methods for the monitoring of these dyes in food matrices is fundamental. In this context, it is proposed in this work to obtain aqueous two-phase system with new components that are more environmentally safe, more economical, promote a faster phase separation and are more specific for the analytes in question. For this, new liquid-liquid equilibrium data were proposed for systems formed by triblock copolymer L35 + ammonium salt $[(\text{NH}_4\text{NO}_3, \text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2, (\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \text{ or } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)]$ + water at different temperatures. The energetic parameters of the ATPS experimental data were predicted with the NRTL models and with the modified NRTL, obtaining a satisfactory correlation with deviations of 2.36 and 2.52%, respectively. The parameters that affect the biphasic region, such as the nature of the electrolyte and temperature, were evaluated. For all ATPS, the increase in temperature resulted in a slight increase of the biphasic area. The biphasic region was higher in the SAB formed by hydrogen phosphate, and smaller in the ATPS formed by acetate. The behavior of partitioning of brilliant blue (BB), sunset yellow (SY), tartrazine yellow (TY) and allura red 40 (AR-40) dyes in the ATPS formed by L35 + ammonium salt $[(\text{NH}_4\text{NO}_3, (\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \text{ or } (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)]$ + water at different pH values and tie line lengths. The dyes were partitioned preferentially to the upper ATPS phase, the process being enthalpy driven. The partition was favored by increasing the tie line length. The pH showed a slight effect on the partitioning of all the analytes. For all the dyes, the extraction was higher than 99.0 % in ATPS formed by L35 + ammonium tartrate + water. From the excellent extraction data of the dyes, a new method of extraction and preconcentration of dyes present in non-alcoholic beverages was proposed, using ATPS and determination by absorption spectrometry in the UV / Visible region. The sample, without any previous preparation, was added directly to the SAB L35 + ammonium tartrate obtaining excellent extraction 99.7, 99.7, 99.3 and 99.8 % for the

dye BB, SY, TY and AR-40, respectively. The quantification limit of 0.135, 0.203, 0.364 and 1.20 mg kg⁻¹ was obtained for dye AB, AC, AT and V40, respectively. For all dyes, the analytical curves showed $R^2 > 0.999$. The method showed good accuracy, varying from 0.11 to 2.71 % and good precision from 0.3 to 1.6 %. All the analyzed beverage samples had dye content below the maximum limit recommended by the Brazilian legislation. The proposed method proved to be efficient for the determination of dyes in complex matrix of non-alcoholic beverages. In addition, it presents advantages such as low cost, fastness, non-use of organic solvents and lower consumption of samples, when compared to other methods already described in the literature.

Capítulo 1

Revisão de Literatura

1. Introdução

Um dos grandes desafios analíticos da atualidade reside na análise do teor de corantes na complexa matriz de alimentos. Levando em consideração que o consumo de corantes alimentícios está associado à efeitos deletérios à saúde humana [1] e que os métodos de determinação em alimentos são em geral demorados [2], e contam com uma complexa etapa de preparo de amostras [3], é crucial o desenvolvimento de métodos alternativos. Neste trabalho, foi desenvolvido um novo método espectrofotométrico utilizando sistema aquoso bifásico (SAB) para a extração, pré-concentração e determinação dos corantes artificiais azul brilhante (AB), amarelo crepúsculo (AC), amarelo tartrazina (AT) e vermelho 40 (V40) em amostras de bebidas.

1.1 Corantes Artificiais

Corantes artificiais são aditivos utilizados em alimentos com a finalidade de conferir cor, sem necessariamente apresentar qualquer valor nutricional [4]. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), corantes artificiais são aqueles obtidos por síntese orgânica, mediante o emprego de processo tecnológico adequado e que não são encontrados em produtos naturais [5].

Na indústria de alimentos, os corantes artificiais são usados para restaurar a perda da cor que ocorre naturalmente durante o processo de manufatura e estocagem. Assim como destacar a cor natural do alimento, tornando-o mais apetitoso e atrativo, bem como para prover cor a alimentos incolores [6].

O aumento no consumo de corantes artificiais deve-se ao fato de que estes apresentam um menor custo, maior estabilidade durante o processamento do alimento, menor contaminação microbiológica, maior estabilidade à luz, ao oxigênio e às variações de pH, maior uniformidade na cor e maior poder tintorial quando comparados aos corantes naturais [7].

1.1.1. Efeitos deletérios associados ao consumo de corantes

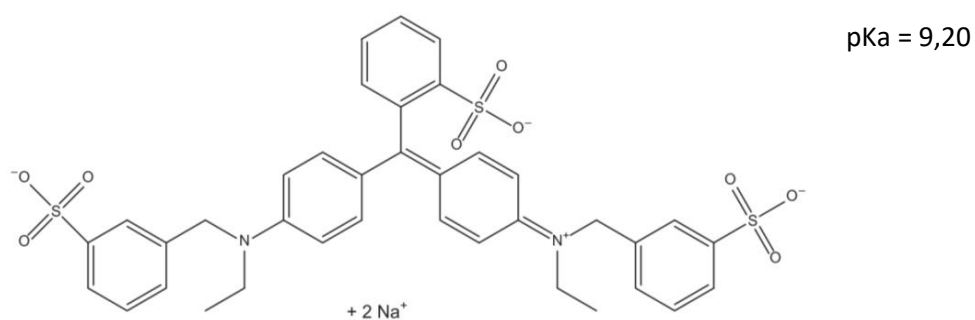
Todavia, o consumo deste tipo de produto está associado ao aparecimento de reações alérgicas e intolerâncias alimentares [8], diarreia, reações asmáticas, dano ao DNA e hepatocelular, insuficiência renal, transtorno de déficit de atenção [7], urticária [9] e efeitos tóxicos [10].

1.1.2. Legislação brasileira

A utilização de corantes artificiais em alimentos na Suécia e na Noruega é proibida devido à nocividade à saúde e ao ambiente [1]. No Brasil, a ANVISA é responsável por legislar acerca dos corantes utilizados e seus teores máximos nos alimentos. Atualmente, um total de onze corantes artificiais são permitidos pela legislação brasileira, a saber: amarelo tartrazina, amarelo crepúsculo, azorrubina, amaranto, ponceau 4R, eritrosina, vermelho 40, azul patente V, azul indigotina, azul brilhante e verde rápido [5].

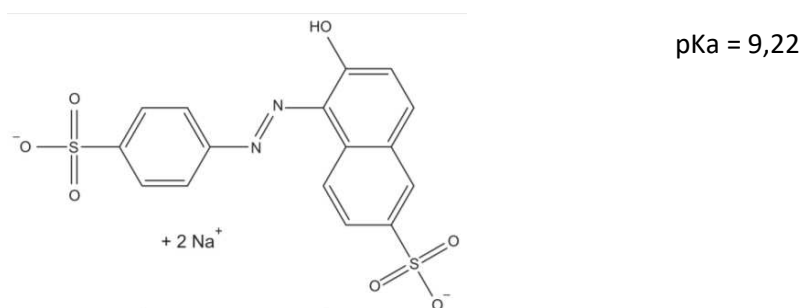
Destacam-se os corantes AC, AT e V40, pertencentes à classe dos azo-compostos, cuja estrutura molecular e valores de pKa são mostrados na Figura 1. Estes corantes desde 2007 fazem parte da lista do “*Southampton six colors*”, lista na qual figuram os corantes associados à hiperatividade em crianças de 3, 8 e 9 anos [11]. Na Europa, por exemplo, o consumo de V40 não é recomendado para crianças [12]. Outro corante que merece atenção é o AB. Esta substância, pertencente à classe dos trifenilmetanos, cuja estrutura molecular e valores de pKa são mostrados na Figura 1, é de consumo proibido na Índia, uma vez que sua ingestão está

associada ao aparecimento de câncer, problemas reprodutivos, desordens neurológicas e reações anafiláticas [13].



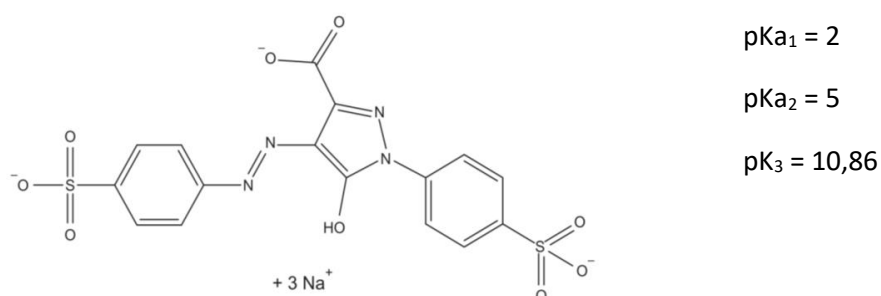
pKa = 9,20

(A)



pKa = 9,22

(B)

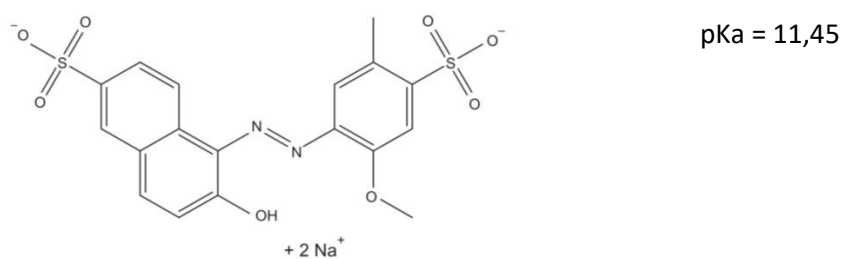


pKa₁ = 2

pKa₂ = 5

pK₃ = 10,86

(C)



pKa = 11,45

(D)

Figura 1. Estrutura molecular e pKa dos corantes (A) Azul Brillhante, (B) Amarelo

Crepúsculo, (C) Amarelo Tartrazina e (D) Vermelho 40 [14].

A ingestão de alimentos contendo corantes é segura segundo a ANVISA, desde que estes estejam dentro do limite máximo preconizado. Em bebidas não alcólicas fermentadas e não fermentadas, por exemplo, é muito comum a utilização dos corantes AB, AC, AT e V40 cujo limite máximo é de 100 mg L^{-1} [15].

A legislação acerca dos corantes, bem como de qualquer outro aditivo alimentar, leva em consideração o controle da ingestão diária aceitável (IDA) [4]. Parâmetro este definido pelos comitês da Organização Mundial de Saúde / Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. O IDA é a quantidade de um aditivo alimentar, que pode ser ingerido diariamente, durante toda a vida, sem causar danos à saúde. Este, é expresso em mg kg^{-1} . O valor de IDA para os corantes AB, AC, AT e V40 é 10, 2,5, 7,5 e $7,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corpóreo, respectivamente [14].

Diante dos possíveis efeitos deletérios, é imprescindível o monitoramento do nível de corantes nos alimentos, principalmente se considerarmos que o consumidor final em muitos casos são as crianças, população esta que geralmente não tem poder de escolha sobre sua própria alimentação, e que é mais propensa a reações alérgicas e problemas alimentares [4].

1.1.3. Preparos de amostra e determinação de corantes artificiais em alimentos

No Brasil, a metodologia recomendada para a determinação de corantes artificiais em alimentos é a descrita pelo Instituto Adolfo Lutz [16]. No caso de bebidas não alcólicas e não fermentadas, o preparo de amostra baseia-se na adsorção do corante em lã natural. Neste procedimento, são misturados em um béquer 50 gramas de amostra, 100 mL de água e 20 cm de lã natural (previamente desengordurada com éter de petróleo, aquecida com solução de hidróxido de amônio 5 % (v/v) durante 1 hora a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lavada com água destilada a quente e

posteriormente seca) e 0,5 mL de ácido clorídrico. A mistura é então aquecida em banho-maria fervente até que o corante fique impregnado na lã. Em seguida, a lã é retirada do béquer e lavada com água corrente. Em outro béquer, são misturados e levados ao banho maria fervente 0,5 mL de hidróxido de amônio, 10 mL de água e a lã lavada. O aquecimento continua até que a solução adquira a coloração da lã. Neste ponto, a lã é retirada e o volume da solução é reduzido à metade por evaporação para análises posteriores [16]. Além deste, diversos métodos são reportados na literatura para a determinação de corantes em alimentos [3,7,9,12,17-23]

De Andrade et al. [2], desenvolveram um método utilizando cromatografia por camada delgada (TLC) para a identificação e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de par iônico para a determinação de AC, AB, AT e amaranto em amostras de refrigerante. Neste trabalho, a etapa de preparo de amostras deu-se por extração em fase sólida, com a utilização de cartuchos Sep-Pack C₁₈ previamente tratados com álcool isopropílico e ácido acético. Soluções desgaseificadas de amostra foram eluídas no cartucho previamente tratado, e os corantes adsorvidos no cartucho foram extraídos com uma solução de álcool isopropílico 18 % (v/v) e posteriormente levadas a evaporador rotatório à vácuo. Após completa evaporação, uma alíquota de água foi acrescida, e a amostra foi reconstituída, transferida para um tubo e filtrada com uma membrana de celulose para análises posteriores. Os limites de quantificação alcançados foram de 0,012, 0,090 e 0,058 mg L⁻¹ para os corantes AB, amaranto e AC, respectivamente. Vale ressaltar que, segundo os autores, o teor de amaranto em duas amostras foi superior ao recomendado pela legislação. E, em seis amostras não foi encontrado o corante AT, estando este discriminado no rótulo do produto. Estes relatos ressaltam a importância de um controle mais rígido do teor de corantes em alimentos, tendo em vista as possibilidades de adulteração dos produtos e de não cumprimento da legislação vigente. O método desenvolvido pelos autores apresenta um limite de quantificação adequado à legislação

brasileira, todavia, a etapa de preparo de amostra é demorada, e a determinação é feita em HPLC, um equipamento caro, e que requer um alto grau de treinamento por parte do operador.

Yin et. al [17], propuseram um novo sensor baseado em polidopamina e nanotubos de carbono para a determinação eletroquímica de AC. O sensor proposto obteve um limite de detecção de $0,107 \text{ mg L}^{-1}$, sendo capaz de detectar o corante em amostras autênticas de gelatinas, sorvetes, chocolates e balas. Neste trabalho, o preparo do sensor foi realizado em diversas etapas, sendo a primeira o tratamento do nanotubo de carbono acrescido de uma mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico em banho de ultrassom durante 6 horas. Nas etapas seguintes, diversos reagentes foram utilizados, como o etanol, hidróxido de amônio, polidopamina e ácido acético.

No trabalho de Dorraji et al. [24], um eletrodo preparado a partir de um novo nanocompósito de óxido de zinco e ácido cisteico foi utilizado para a determinação simultânea de AC e AT por voltametria de pulso diferencial. Neste trabalho, foram conseguidas recuperações superiores a 95% para ambos os corantes em refrigerantes, e limites de detecção de $7,7 \times 10^{-5}$ e $1,8 \times 10^{-9} \text{ mg L}^{-1}$ para os corantes AC e AT, respectivamente [24]. Na fabricação do eletrodo, foram utilizados diversos reagentes, como alumina, ácido cisteico, etanol, óxido de zinco, cloreto de potássio e nitrato de zinco. E dentre as muitas etapas no processo de fabricação, a de eletrodeposição requeria 30 minutos.

No trabalho de Rovina e colaboradores [20], foi desenvolvido um método eletroquímico para a determinação de AC utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno, nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e um nanocompósito de quitosana. Neste método, foi conseguido um limite de detecção de $32,0 \text{ mg L}^{-1}$ [20]. Para a fabricação do eletrodo, foram utilizados diversos reagentes, como o ácido sulfúrico, ácido nítrico, permanganato de potássio, ácido clorídrico, etanol, ácido cloroáurico, nanotubos de carbono,

quitosana e ácido acético. A duração da etapa de fabricação do eletrodo foi superior a 24 horas, contando com uma agitação durante 12 horas a 90 °C. Além disso, as amostras utilizadas neste trabalho necessitaram de ajuste de pH para 2,0 com a utilização de ácido fosfórico. Apesar de todos os métodos eletroquímicos aqui discutidos apresentarem resultados satisfatórios em termos de determinação dos analitos [17,20,24], a etapa de fabricação dos eletrodos é em geral demorada e complexa.

Ai e colaboradores [18], sintetizaram nanopartículas de prata para a detecção e a determinação dos corantes AB, AC, AT e vermelho ácido utilizando espectroscopia Raman e espectroscopia Raman de espalhamento estimulada. Para os corantes AB, AT, AC e vermelho ácido, foram conseguidos limites de detecção de respectivamente 0,0793, 0,0054, 0,0453, 0,0502 mg L⁻¹. Apesar dos baixos limites de detecção alcançados pelo método, a utilização de espectroscopia Raman torna o método oneroso, e pouco aplicável para o controle de qualidade em laboratórios com poucos recursos.

Heidarizadi e Tabakari [12] desenvolveram um método de extração por ponto nuvem com posterior determinação espectrofotométrica para a determinação de AB, AC e V40. Foram obtidos limites de detecção de 0,007, 0,009 e 0,001 mg L⁻¹ para os corantes AB, AC e V40, respectivamente. No preparo de amostra realizado por ponto nuvem, foram misturados em um frasco volumétrico alíquotas contendo o corante mais 6 mL de solução de Triton X-100 a 0,5 mol L⁻¹, 2,5 mL de brometo de cetrimônio 0,01 mol L⁻¹, 6 mL de KCl 1,0 mol L⁻¹ e 5 mL de tampão acetato pH 4. Após agitação, o volume da solução foi ajustado com água até 50 mL e transferido para um segundo recipiente, onde foi acondicionado em banho termostático a 80 °C durante 40 minutos. Após este tempo, o recipiente foi imerso em banho de gelo. Em seguida, as fases foram recolhidas em separado, diluídas de modo apropriado e analisadas em espectrofotômetro. Ainda utilizando extração por ponto nuvem e detecção espectrofotométrica, Heydari et al. [22] propuseram um novo método para a determinação dos

corantes AB e AC, obtendo limites de detecção de, respectivamente, 0,03 e 0,06 mg L⁻¹. No preparo de amostra, foram adicionados em um tubo de centrífuga 8,5 mL de solução tampão acetato pH 6,0 contendo o corante mais 1,5 mL de solução de Triton X-100 40 % (v/v) e 1,5 g de NaCl. Após mistura, o tubo foi mantido em banho termostático a 55 °C durante 15 minutos e, posteriormente, centrifugado durante 5 minutos a 4000 rpm. A fase rica em surfactante foi então recolhida, diluída em água de modo apropriado e analisada em espectrofotômetro. Apesar da determinação espectrofotométrica, uma técnica relativamente simples e barata, representar um ponto positivo nos métodos desenvolvidos por Heidarizadi e Tabakari [12] e Heydari et al. [22], em ambos, a etapa de extração por ponto nuvem é realizada em temperaturas elevadas. Tendo assim um destacado gasto energético para realização dos experimentos.

Martin e colaboradores [23], analisaram amostras de sorvetes, chocolates e chicletes determinando 18 corantes artificiais. Primeiramente, foi feita uma extração em fase sólida seguida da determinação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial. No preparo de amostras, foi utilizado um cartucho da marca Supelco Discovery, modelo SPE DPA-6S, com lã de vidro em seu topo. Ambos foram previamente lavados com metanol e condicionados com 10 mL de ácido acético 0,5 %. Na etapa de extração em fase sólida, 25 mL de solução aquosa da amostra previamente centrifugada, foi misturada a 125 mL de solução metanol – ácido acético 1 % (1:1 v/v) e quantitativamente transferida para o cartucho. A solução foi então eluída, sendo o cartucho em seguida lavado com 10 mL de solução metanol – ácido acético 1 % (1:1 v/v). Posteriormente, a lã de vidro foi removida do cartucho e os corantes artificiais solúveis em água foram eluídos com 5 mL de solução etanol-amônio 1 % (1:1 v/v) e recolhidos em um tubinho. Os extratos foram então secos sob fluxo de nitrogênio a 50 °C. Os resíduos foram então reconstituídos em 400 µL de fase móvel (água contendo 40 mM de acetato de amônio

com 2,5% de acetonitrila a pH 7,8). A solução foi então acondicionada em um tubo e imediatamente centrifugada a 17000 g por 10 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi recolhido em recipiente adequado para posterior análise por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas. Um limite de quantificação entre 0,01 e 0,05 mg L⁻¹ foi obtido para os 18 corantes, incluindo o AB, AC, AT e V40.

No trabalho de Shin e colaboradores [19], foi combinada a filtração por seringa com determinação por cromatografia líquida ultra-rápida com arranjo de diodos na quantificação de 9 corantes sintéticos em 17 amostras de bebidas. Uma recuperação entre 92,7 e 105,9 % e um limite de detecção entre 0,04 e 0,15 mg L⁻¹ foram obtidos para os corantes AT, amaranço, índigo carmin, vermelho ponceau 4R, AC, V40, verde rápido, AB e eritrosina B [19]. Na etapa de preparo de amostras, 50 mL de cada amostra foi previamente desgaseificada durante 10 minutos em banho de ultrassom e em seguida ajustou-se o valor de pH (3,5 4,5 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 ou 7,5) com solução aquosa de hidróxido de amônio 10 % (v/v). As amostras foram então filtradas (filtro PVDF) e acondicionadas em frasco adequado para posterior análise por cromatografia ultra rápida com arranjo de diodos. Tanto no trabalho de Martin e colaboradores [23], quanto no de Shin e colaboradores [19], os limites de quantificação e de detecção são adequados para atender a legislação brasileira, todavia, os métodos fazem uso de solventes orgânicos, além de a determinação ser realizada com equipamentos mais dispendiosos.

É fato que a literatura contempla diversos métodos para a determinação de corantes, todavia, alguns fazem uso de solventes orgânicos como metanol, acetonitrila, outros requerem um grande tempo de análise, principalmente na etapa de preparo de amostra, e outros utilizam equipamentos dispendiosos, nos quais é imprescindível um elevado grau de treinamento por parte do operador. É estratégico então o desenvolvimento de métodos genuinamente verdes,

com equipamentos de detecção mais acessíveis, que sejam uma alternativa aos métodos cromatográficos geralmente utilizados na determinação de corantes [23].

Uma alternativa ambientalmente segura para esta demanda é o desenvolvimento de métodos espectrofotométricos envolvendo o sistema aquoso bifásico (SAB). A grande vantagem destes métodos reside na facilidade e relativo baixo custo da determinação espectrofotométrica, que pode ser utilizada para uma grande variedade de analitos. Bem como da versatilidade, eficiência, rapidez e alta capacidade de separação, extração e pré-concentração dos sistemas aquosos bifásicos. O SAB é formado espontaneamente pela mistura de três componentes, sendo um deles necessariamente a água, e os demais, substâncias em geral atóxicas e não inflamáveis [25]. Os SAB são compostos majoritariamente por água, não utiliza solventes orgânicos para sua formação, apresentam uma rápida separação de fases, baixo custo, são passíveis de reutilização [26], são aplicáveis em micro [27-30] e em larga escala [31-33] sendo uma técnica de fácil operação [34]. Os SAB estão de acordo com princípios da Química Verde, uma vez que fazem uso de fontes renováveis de matéria-prima para sua formação, tendo em vista que seu principal constituinte é a água. Além disso, sua formação pode se dar em temperatura e pressão ambientes, representando uma destacada eficiência energética. Os métodos utilizando SAB contribuem para uma química intrinsecamente segura, uma vez que seus componentes são em geral atóxicos e não inflamáveis, evitando assim o risco de acidentes químicos, explosões e incêndios [35].

1.2. Sistema aquoso bifásico (SAB)

O SAB consiste de duas fases líquidas e imiscíveis que se encontram em equilíbrio termodinâmico. Estas fases são formadas espontaneamente a partir da mistura de soluções aquosas de dois polímeros incompatíveis [36,37], um polímero e um eletrólito [37-44] ou

ainda dois eletrólitos [45-49] em condições específicas de concentração, temperatura e pressão [38]. As duas fases resultantes são compostas majoritariamente por água (65 a 90 %), sendo a fase superior (FS) enriquecida em um componente, e a fase inferior (FI) enriquecida no outro componente [25,50].

Os primeiros trabalhos envolvendo SAB foram propostos por Beijerink [51] em 1896. Este pesquisador observou que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel quando misturadas em determinada temperatura e faixa de concentração formavam uma solução turva. Esta, espontaneamente, separava-se em duas fases líquidas límpidas quando deixada em repouso. A água era o componente majoritário em ambas as fases, sendo a superior enriquecida em gelatina, e a inferior enriquecida em ágar ou amido. A primeira aplicação dos SAB ocorreu em meados da década de 50 [52] com os trabalhos de Per-Åke Albertsson, no qual o pesquisador obteve a purificação de proteínas e células, destacando assim a potencialidade de aplicações do SAB na extração de materiais biológicos. Esta aplicação só foi possível porque os componentes do SAB conferem ao sistema uma característica amena, viabilizando a purificação de materiais biológicos sem incorrer no comprometimento de suas estruturas e perda de suas atividades [50].

Desde então, muito se desenvolveu em termos de aplicação de sistemas aquosos bifásicos. Além das biomoléculas [27,30,53-66], os SAB são aplicados na separação, pré-concentração e determinação de fenóis [67-69], íons metálicos [34,70-77] e corantes [78-81].

No trabalho de Song e colaboradores [78], o corante alaranjado de metila foi extraído utilizando um SAB formado por brometo de tetrabutílamônio, sulfato de amônio e água e determinado espectrofotometricamente. No trabalho de Mageste e colaboradores [79] estudou-se a partição do corante natural carmim em SAB formado por (copolímero L35 ou poli(óxido de etileno), PEO) + (sulfato de lítio, hidróxido de sódio ou sulfato de sódio) + água com determinação espectrofotométrica. No trabalho de Alvarenga e colaboradores [80], o

comportamento de partição do corante têxtil amarelo remazol foi avaliado em SAB formado por polietileno glicol (PEG) + sulfato de magnésio + água com determinação por espectrofotometria. No trabalho de Borges e colaboradores [81], os corantes têxteis azul de metileno, verde malaquita e vermelho reativo 195 foram particionados no SAB formado por PEO + tartarato de sódio + água, com posterior determinação espectrofotométrica. Apesar das diversas aplicações do SAB na extração de corantes, a literatura ainda carece de estudos acerca da determinação de corantes artificiais em alimentos utilizando sistema aquoso bifásico. Determinação esta bastante desafiadora, tendo em vista a alta complexidade da matriz [23].

A grande versatilidade de aplicação dos SAB reside na possibilidade de modular as características finais do sistema, através da mudança dos seus compostos formadores. Um grande avanço neste sentido foi a obtenção de SAB com características hidrofóbicas, com a utilização de copolímeros, em substituição aos polímeros até então utilizados [26,82]. Um exemplo são os SAB formados por copolímero tribloco L35, cuja estrutura é mostrada na Figura 2. O L35 é composto por unidades de PEO (poli(óxido de etileno)) e PPO (poli(óxido de propileno)), também representado por $(\text{PEO})_{11}-(\text{PPO})_{16}-(\text{PEO})_{11}$, com massa molar de 1900 g mol^{-1} [83].

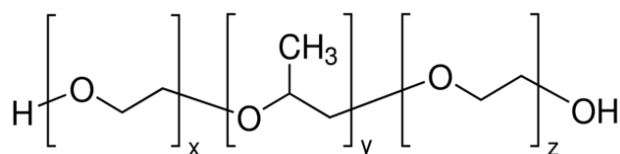


Figura 2. Estrutura molecular do L35.

Uma das grandes vantagens da utilização dos copolímeros é a sua capacidade de formar micelas quando em solução aquosa, em determinadas condições de concentração, temperatura e pressão. Micelas estas que apresentam um interior hidrofóbico e uma coroa hidrofílica,

permitindo a partição de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos [84,85]. Outro ganho é a facilidade de recuperação do copolímero em comparação aos polímeros tradicionais, uma vez que o primeiro apresenta um menor ponto nuvem [26].

Outros compostos formadores estratégicos de SAB são os sais de amônio. Estes apresentam uma maior facilidade de decomposição tornando o SAB menos danoso para a saúde e meio ambiente, assim como mais amigável para serem usados no preparo de amostras. Principalmente, no preparo de amostra seguida da determinação por espectrometria de absorção atômica (FAAS) ou espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas (AES-MIP).

1.2.1. Sistema aquoso bifásico: termodinâmica de formação

As propriedades termodinâmicas do SAB dependerão das interações intermoleculares presentes entre seus componentes formadores em solução aquosa, bem como das variações entrópicas oriundas do processo de mistura. O fenômeno de separação de fases pode ser expresso em termos da variação de energia livre de Gibbs de mistura ($\Delta_{mix}G$) como mostrado na equação 1:

$$\Delta_{mix}G = \Delta_{mix}H - T \Delta_{mix}S \quad (1)$$

onde, $\Delta_{mix}H$ é a variação da entalpia de mistura, $\Delta_{mix}S$ é a variação da entropia de mistura e T é a temperatura em Kelvin. No caso de uma mistura de três componentes, quando os valores de $\Delta_{mix}G < 0$ o sistema permanece homogêneo. Caso contrário, com a finalidade de diminuir a energia livre de Gibbs, o sistema buscará uma nova configuração, separando-se em duas ou mais fases [50].

As duas fases em equilíbrio podem ser expressas em um diagrama de fases retangular, como o mostrado na Figura 3.

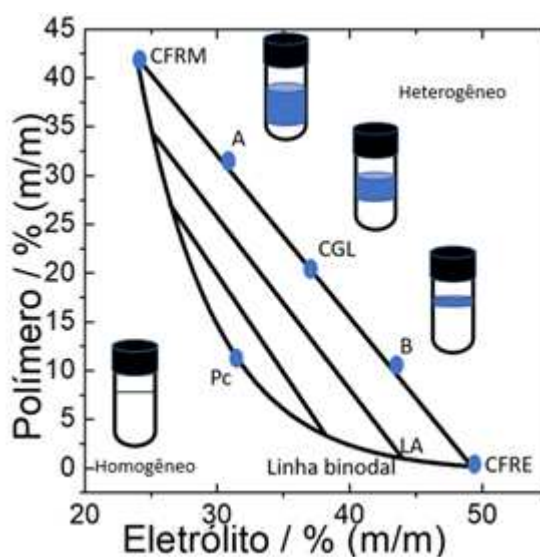


Figura 3. Diagrama de fases retangular de um SAB formado por polímero, eletrólito e água.

Na Figura 3, no eixo X encontra-se a concentração do polímero e no eixo Y a concentração do eletrólito, ambos em % (m/m). O diagrama é delimitado pela linha binodal (LB). Esta demarca as composições no qual o sistema encontra-se homogêneo e heterogêneo. A posição da linha binodal varia em função dos componentes formadores do SAB e da temperatura [26]. Na curva binodal, está representado o ponto crítico (Pc); neste, a concentração e o volume das fases são teoricamente iguais, sendo impossível distingui-las.

Na região acima da LB, onde o sistema encontra-se heterogêneo, são mostradas as composições globais (CGL) que formarão as fases em equilíbrio, a composição da fase rica em macromolécula (CFRM) e a composição da fase rica em eletrólito (CFRE).

As fases em equilíbrio, CFRM e CFRE, são ligadas por retas, denominadas linhas de amarração (LA). Sobre uma mesma linha de amarração, por exemplos nos pontos A e B, as propriedades termodinâmicas intensivas das fases serão as mesmas em ambos, por exemplo,

densidade e concentração. Já as propriedades termodinâmicas extensivas das fases, como volume e massa, variam [25].

Um parâmetro termodinâmico importante a ser investigado nos estudos de partição em SAB é o comprimento de linha de amarração (CLA). Este expressa a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases em equilíbrio e pode ser calculado em função da concentração das fases, como mostrado na equação 2:

$$CLA = \left[(C_M^{FS} - C_M^{FI})^2 + (C_E^{FS} - C_E^{FI})^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

em que, C_M^{FS} e C_M^{FI} são as concentrações da macromolécula na fase superior (FS) e na fase inferior (FI), respectivamente. Enquanto, C_E^{FS} e C_E^{FI} são as concentrações do eletrólito na FS e na FI, respectivamente. Sendo estas concentrações expressas em % (m/m). É importante ressaltar que quanto maior é o CLA maior será a diferença de composição entre as fases [25]. Este fenômeno pode contribuir para melhorar a eficiência de extração do soluto de interesse.

Para o desenvolvimento de um método de separação de qualquer analito é imprescindível conhecer o seu comportamento de partição no SAB. Comportamento este que pode ser influenciado por fatores como temperatura, pH, CLA e componentes formadores do sistema [25,50]. Este estudo pode ser realizado através da razão de partição (K).

O K é um parâmetro termodinâmico que aplica-se a sistemas em equilíbrio termodinâmico no qual o analito é a única espécie química presente em cada uma das fases [25], e pode ser expresso pela equação 3 [86]:

$$K = \frac{C_a^{FS}}{C_a^{FI}} \quad (3)$$

onde C_a^{FS} e C_a^{FI} são a concentração do analito na FS e FI, respectivamente.

Segundo Johansson e colaboradores [87], o comportamento de distribuição de um analito entre as duas fases em equilíbrio do SAB é determinado por forças entálpicas e

entrópicas. O primeiro está associado à formação e ao rompimento de ligações feitas entre o analito e os constituintes das fases. E o segundo está associado ao aumento ou a diminuição das possíveis distribuições do analito nas fases do SAB.

Diversos parâmetros afetam a partição de um analito no SAB. No que tange ao analito, influenciarão a presença de carga elétrica, conformação, composição e hidrofobicidade. Em relação ao SAB o pH, a temperatura, o tipo e a massa molar da macromolécula, o tipo de eletrólito e a concentração dos componentes terão influência no processo de partição [50].

Matematicamente, o processo de partição pode ser avaliado pelo modelo de Johansson e colaboradores, desenvolvido a partir da teoria de Flory-Huggins, mostrado na equação 4 [87]. Neste modelo, considera-se que o processo de partição se dá apenas por contribuição entrópica, sem que haja contribuição entálpica.

$$\ln K_A = \frac{M_A}{\rho} \left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (4)$$

onde K_A é a razão de partição do analito, M_A , a massa molar do analito particionado, ρ é o número de sítios por unidade de volume de todo o sistema bifásico, n^{FS} e n^{FI} o número total de moléculas na fase superior e inferior, respectivamente, e V^{FS} e V^{FI} o volume da fase superior e inferior, respectivamente [87].

Avaliando a tendência de partição, a partir da equação 4, pode-se inferir que na ausência de efeitos entálpicos, a partição do analito entre as duas fases ocorrerá caso haja uma diferença em termos de densidade numérica entre as fases (n/V). A migração do soluto se dará para a fase com maior densidade numérica, tendo em vista que nesta fase o soluto poderá se distribuir espacialmente em um número maior de configurações, aumentando assim a entropia configuracional e diminuindo a energia livre de Gibbs. A água é o maior constituinte tanto da

FS quanto da FI, logo, este componente influenciará diretamente a densidade numérica das fases e, conseqüentemente, o comportamento de partição do analito.

A maior densidade numérica em sistemas do tipo polímero - eletrólito é geralmente verificada na fase rica em eletrólito (FI) [50]. Logo, para estes sistemas, desconsiderando-se qualquer contribuição entálpica, a partição se daria, preferencialmente, para a fase rica em eletrólito (FI).

Além da contribuição entrópica, o processo de partição também apresenta um componente entálpico. Contribuição esta descrita pelo modelo de Johansson e colaboradores, representada na equação 5 [50].

$$\ln K_A = -\frac{M_A}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) w_{iA} - \sum_{i=1(i \neq A)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (5)$$

onde M_A é a massa molar do analito particionado, R a constante dos gases, T a temperatura em Kelvin, Φ_i^{FS} e Φ_i^{FI} as frações volumétricas do componente i, respectivamente, nas fases superior e inferior e w_{ij} a energia de formação do par entre os componentes i e j.

A equação 5 apresenta dois somatórios, o primeiro, leva em consideração a interação do soluto particionado com os componentes formadores do SAB. Quanto mais o soluto interagir com um dos componentes do SAB, menos positiva será a contribuição entálpica, levando então à diminuição da energia livre de Gibbs. Assim, pode-se inferir que o soluto será preferencialmente particionado para a fase mais concentrada no componente que mais interagir com o soluto. Quanto maior a diferença de composição entre as fases, mais intensa será a interação soluto – componente formador [50]. Este fato explica a relação, geralmente observada, de aumento da razão de partição com o aumento do CLA [80,88].

No segundo somatório, são desconsideradas as interações soluto–componentes formadores do SAB. É levado em consideração o conteúdo energético de cada fase, assim

como a energia associada à transferência do soluto entre as fases. Este termo independe da natureza do soluto particionado. Quando o soluto é transferido de uma fase para a outra, ele libera o volume no qual estava alojado dentro da fase, permitindo a interação entre os componentes da fase neste espaço, antes ocupado por ele. Uma vez alojado na fase para a qual se deslocou, o soluto formará uma cavidade, na qual ficará acomodado. E nesta cavidade formada, não haverá interação entre os componentes das fases, uma vez que esta se encontra agora ocupada pelo soluto [50]. O saldo energético deste processo influenciará o comportamento de partição do soluto. A influência da interação dos componentes do SAB no comportamento de partição explica a marcante diferença de comportamento de partição de um mesmo analito em SAB constituídos por combinações de diferentes componentes [69,79].

O comportamento de partição de um analito é a resultante de um balanço entre forças entálpicas e entrópicas presentes no SAB. Logo, é primordial o desenvolvimento de novos sistemas a partir de componentes estratégicos para o particionamento de analitos de interesse. Bem como, entender o comportamento de partição destes analitos, viabilizando o desenvolvimento de métodos eficientes para a sua separação/pré-concentração/determinação em amostras complexas.

2. Objetivo geral

Objetiva-se com este trabalho, o desenvolvimento de novos SAB utilizando materiais estratégicos para ampliar a aplicação desses sistemas no preparo de amostras, como por exemplo, separação/pré-concentração/determinação de corantes sintéticos utilizados em amostras de bebidas.

2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver novos SAB utilizando copolímero tribloco L35 + sais de amônio (acetato de amônio, fosfato de amônio dibásico, nitrato de amônio ou tartarato de amônio) + água em diferentes temperaturas. (Capítulo 2. Artigo já publicado)
- Estudar a influência dos componentes formadores dos novos SAB, CLA e pH na partição dos corantes AB, AC, AT e V40.
- Desenvolver um método espectrofotométrico para a determinação dos corantes AB, AC, AT e V40 presentes em amostras autênticas de preparado sólido para refrescos e repositores hidroeletrólíticos.

3. Referências

- [1] K. Spears, Developments in food colourings: the natural alternatives, *Trends Biotechnol.*, 6 (1988) 283-288.
- [2] F.I. de Andrade, M.I.F. Guedes, I.G.P. Vieira, F.N.P. Mendes, P.A.S. Rodrigues, C.S.C. Maia, M.M.M. Ávila, L.D. Ribeiro, Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC, *Food Chem.*, 157 (2014) 193-198.
- [3] K. Yamjala, M.S.a. Nainar, N.R. Ramiseti, Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review, *Food Chem.*, 192 (2016) 813-824.
- [4] M.L.T. Polônio, F. Peres, Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira, *Cad. Saude Publica*, 25 (2009) 1653-1666.
- [5] Brasil, Resolução n° 44, in: A.N.d.V.S. (ANVISA) (Ed.), *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1977.
- [6] P. Amchova, H. Kotolova, J. Ruda-Kucerova, Health safety issues of synthetic food colorants, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 73 (2015) 914-922.
- [7] K. Rovina, P.P. Prabakaran, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 85 (2016) 47-56.
- [8] A.W. Burks, M. Tang, S. Sicherer, A. Muraro, P.A. Eigenmann, M. Ebisawa, A. Fiocchi, W. Chiang, K. Beyer, R. Wood, J. Hourihane, S.M. Jones, G. Lack, H.A. Sampson, ICON: Food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 129 (2012) 906-920.

- [9] K. Rovina, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Extraction, analytical and advanced methods for detection of allura red AC (E129) in food and beverages products, *Front.Microbiol.*, 7 (2016) 1-13.
- [10] R. Jung, D. Steinle, R. Anliker, A compilation of genotoxicity and carcinogenicity data on aromatic aminosulphonic acids, *Food Chem. Toxicol.*, 30 (1992) 635-660.
- [11] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, *Lancet*, 370 (2007) 1560-1567.
- [12] E. Heidarizadi, R. Tabaraki, Simultaneous spectrophotometric determination of synthetic dyes in food samples after cloud point extraction using multiple response optimizations, *Talanta*, 148 (2016) 237-246.
- [13] A. Mittal, Use of hen feathers as potential adsorbent for the removal of a hazardous dye, Brilliant Blue FCF, from wastewater, *J. Hazard. Mater.*, 128 (2006) 233-239.
- [14] J. König, 2 - Food colour additives of synthetic origin A2 - Scotter, Michael J, in: *Colour Additives for Foods and Beverages*, Woodhead Publishing, Oxford, 2015, pp. 35-60.
- [15] Brasil, Resolução de diretoria colegiada- RDC n°5, de 15 de janeiro de 2007, in: ANVISA (Ed.), *Diário Oficial da União*, Brasília, 2007.
- [16] O. Zenebon, N.S. Pascuet, *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4 ed., Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008.
- [17] Z.Z. Yin, S.W. Cheng, L.B. Xu, H.Y. Liu, K. Huang, L. Li, Y.Y. Zhai, Y.B. Zeng, H.Q. Liu, Y. Shao, Z.L. Zhang, Y.X. Lu, Highly sensitive and selective sensor for sunset yellow based on molecularly imprinted polydopamine-coated multi-walled carbon nanotubes, *Biosens. Bioelectron.*, 100 (2018) 565-570.
- [18] Y.J. Ai, P. Liang, Y.X. Wu, Q.M. Dong, J.B. Li, Y. Bai, B.J. Xu, Z. Yu, D.J. Ni, Rapid qualitative and quantitative determination of food colorants by both Raman spectra and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS), *Food Chem.*, 241 (2018) 427-433.
- [19] J.Y. Shin, M.Y. Jung, Ultra-high-throughput analytical strategy based on UHPLC-DAD in combination with syringe filtration for the quantitation of nine synthetic colorants in beverages: impacts of syringe membrane types and sample pH on recovery, *J. Agric. Food Chem.*, 65 (2017) 9916-9922.
- [20] K. Rovina, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Highly sensitive electrochemical determination of sunset yellow in commercial food products based on CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE, *Food Control*, 82 (2017) 66-73.
- [21] C.F. Tsai, C.H. Kuo, D.Y.C. Shih, Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.*, 23 (2015) 453-462.

- [22] R. Heydari, M. Hosseini, M. Alimoradi, S. Zarabi, A simple method for simultaneous spectrophotometric determination of brilliant blue FCF and sunset yellow FCF in food samples after cloud point extraction, *J. Chem. Soc. Pak.*, 38 (2016) 438-445.
- [23] F. Martin, J.M. Oberson, M. Meschiari, C. Munari, Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices, *Food Chem.*, 197 (2016) 1249-1255.
- [24] P.S. Dorraji, F. Jalali, Electrochemical fabrication of a novel ZnO/cysteic acid nanocomposite modified electrode and its application to simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine, *Food Chem.*, 227 (2017) 73-77.
- [25] M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paglioli, J.S. Coimbra, L.A. Minim, Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons, *Quim. Nova*, 29 (2006) 1332-1339.
- [26] L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, A.F. Mesquita, K.S. do Nascimento, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH, *J. Chem. Eng. Data*, 50 (2005) 1457-1461.
- [27] U. Novak, M. Lakner, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, Experimental studies and modeling of α -amylase aqueous two-phase extraction within a microfluidic device, *Microfluid. Nanofluidics*, (2015) 1-9.
- [28] M.J. Jacinto, R.R.G. Soares, A.M. Azevedo, V. Chu, A. Tover, J.P. Conde, M.R. Aires-Barros, Optimization and miniaturization of aqueous two phase systems for the purification of recombinant human immunodeficiency virus-like particles from a CHO cell supernatant, *Sep. Purif. Technol.*, 154 (2015) 27-35.
- [29] R.R.G. Soares, P. Novo, A.M. Azevedo, P. Fernandes, M.R. Aires-Barros, V. Chu, J.P. Conde, On-chip sample preparation and analyte quantification using a microfluidic aqueous two-phase extraction coupled with an immunoassay, *Lab Chip*, 14 (2014) 4284-4294.
- [30] E. Jue, C.D. Yamanishi, R.Y.T. Chiu, B.M. Wu, D.T. Kamei, Using an aqueous two-phase polymer-salt system to rapidly concentrate viruses for improving the detection limit of the lateral-flow immunoassay, *Biotechnol. Bioeng.*, 111 (2014) 2499-2507.
- [31] P. Vazquez-Villegas, O. Aguilar, M. Rito-Palomares, Continuous enzyme aqueous two-phase extraction using a novel tubular mixer-settler in multi-step counter-current arrangement, *Sep. Purif. Technol.*, 141 (2015) 263-268.
- [32] E. Espitia-Saloma, P. Vázquez-Villegas, O. Aguilar, M. Rito-Palomares, Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products, *Food Bioprod. Process.*, 92 (2014) 101-112.
- [33] M. Iqbal, Y.F. Tao, S.Y. Xie, Y.F. Zhu, D.M. Chen, X. Wang, L.L. Huang, D.P. Peng, A. Sattar, M.A. Shabbir, H.I. Hussain, S. Ahmed, Z.H. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 18 (2016) 1-18.

- [34] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium, *J. Chromatogr. A*, 1279 (2013) 13-19.
- [35] E.J. Lenardão, R.A. Freitag, M.J. Dabdoub, A.C.F. Batista, C.C. Silveira, "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa, *Quim. Nova*, 26 (2003) 123-129.
- [36] Z.L. Zhao, Q. Li, X.L. Ji, R. Dimova, R. Lipowsky, Y.G. Liu, Molar mass fractionation in aqueous two-phase polymer solutions of dextran and poly(ethylene glycol), *J. Chromatogr. A*, 1452 (2016) 107-115.
- [37] L.A. Ferreira, N.R. da Silva, S.R. Wlodarczyk, J.A. Loureiro, P.P. Madeira, J.A. Teixeira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Interrelationship between partition behavior of organic compounds and proteins in aqueous dextran-polyethylene glycol and polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems, *J. Chromatogr. A*, 1443 (2016) 21-25.
- [38] J.C. Quintão, P.R. Patricio, A.C.G. Veloso, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C. Hespanhol, Liquid-liquid equilibrium of the ternary ammonium salt + poly(propylene glycol) + water system, *Fluid Phase Equilib.*, 442 (2017) 96-103.
- [39] S.C. Silvério, J. Gracia, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, Polyethylene glycol 8000+ citrate salts aqueous two-phase systems: relative hydrophobicity of the equilibrium phases, *Fluid Phase Equilib.*, 407 (2016) 298-303.
- [40] L. Muruchi, H.R. Galleguillos, Y.P. Jimenez, Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and ferrous sulfate at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 412 (2016) 29-38.
- [41] Y.P. Jimenez, H.R. Galleguillos, M. Claros, Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by $\text{NaNO}_3 + \text{Poly}(\text{ethylene glycol}) + \text{H}_2\text{O}$, *Fluid Phase Equilib.*, 421 (2016) 93-103.
- [42] D.D. Sampaio, L.I. Mafra, C.I. Yamamoto, E.F. de Andrade, M.O. de Souza, M.R. Mafra, F. de Castilhos, Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: equilibrium diagrams and partitioning study, *J. Chem. Thermodyn.*, 98 (2016) 86-94.
- [43] B.D. An, Y.L. Mao, W.L. Zhang, J. Han, Y. Wang, L. Ni, The cloud point and the liquid-liquid equilibrium behaviors of $\text{L31} \backslash \text{L61} - \text{K}_2\text{CO}_3 \backslash \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{K}_2$ aqueous two-phase systems at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 425 (2016) 57-64.
- [44] Y. Wang, Y.L. Mao, C. Chen, J. Han, L. Wang, X.W. Hu, T. Chen, L. Ni, Y.T. Hu, Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing thermo-sensitive copolymer L31 and salts, *Fluid Phase Equilib.*, 387 (2015) 12-17.
- [45] H. Hooshyar, R. Sadeghi, S. Khanahmadzadeh, Phase equilibria, volumetric and compressibility properties of (tetra-n-butylammonium bromide + trisodium citrate) system at

temperatures (298.15 K–318.15 K) and atmospheric pressure, *Fluid Phase Equilib.*, 417 (2016) 158-165.

[46] C. Sheng, J. Han, Y. Wang, B. Chen, Y. Liu, G. Zhang, Y. Yan, X. Zhao, Liquid–liquid equilibria of ionic liquid 1-(2-methoxyethyl)-3-methylimidazolium bromide + potassium carbonate, potassium phosphate, dipotassium phosphate + water aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 364 (2014) 55-61.

[47] A. Paraj, A. Haghtalab, B. Mokhtarani, [1-Ethyl-2,3-dimethylimidazolium][ethylsulfate]-based aqueous two phase systems: new experimental data and modeling, *Fluid Phase Equilib.*, 382 (2014) 212-218.

[48] Y.L. Li, M.S. Zhang, J.N. Wu, J.L. Shi, C. Shen, Liquid–liquid equilibria of ionic liquid N-butylpyridinium tetrafluoroborate and disodium hydrogen phosphate/sodium chloride/sodium sulfate/ammonium sulfate aqueous two-phase systems at T = 298.15 K: experiment and correlation, *Fluid Phase Equilib.*, 378 (2014) 44-50.

[49] X. Tang, J. Han, Y.J. Hu, Y. Wang, Y. Lu, T. Chen, L. Ni, The study of phase behavior of aqueous two-phase system containing [C_nmim]BF₄ (n = 2,3,4) + (NH₄)₂SO₄ + H₂O at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 383 (2014) 100-107.

[50] L.H.M. Silva, W. Loh, Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas, *Quim. Nova*, 29 (2006) 1345-1351.

[51] M.W. Beijerinck, Eigentümlichkeit der löslichen Stärke, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr.*, 2 (1896) 697-698.

[52] A. Tiselius, J. Porath, P.A. Albertsson, Separation and fractionation of macromolecules and particles, *Science*, 141 (1963) 13-20.

[53] K.H. Nam, W.J. Chang, H. Hong, S.M. Lim, D.I. Kim, Y.M. Koo, Continuous-flow fractionation of animal cells in microfluidic device using aqueous two-phase extraction, *Biomed. Microdevices*, 7 (2005) 189-195.

[54] M.C. de Oliveira, M.A.N. de Abreu, P.D. Pessoa, Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO–PPO–PEO, *Biochem. Eng. J.*, 37 (2007) 311-318.

[55] R.J. Meagher, Y.K. Light, A.K. Singh, Rapid, continuous purification of proteins in a microfluidic device using genetically-engineered partition tags, *Lab Chip*, 8 (2008) 527-532.

[56] J.R. SooHoo, G.M. Walker, Microfluidic aqueous two phase system for leukocyte concentration from whole blood, *Biomed. Microdevices*, 11 (2009) 323-329.

[57] M. Tsukamoto, S. Taira, S. Yamamura, Y. Morita, N. Nagatani, Y. Takamura, E. Tamiya, Cell separation by an aqueous two-phase system in a microfluidic device, *Analyst*, 134 (2009) 1994-1998.

- [58] Y.S. Huh, C.M. Jeong, H.N. Chang, S.Y. Lee, W.H. Hong, T.J. Park, Rapid separation of bacteriorhodopsin using a laminar-flow extraction system in a microfluidic device, *Biomicrofluidics*, 4 (2010) 1-10.
- [59] F. Mashayekhi, R.Y.T. Chiu, A.M. Le, F.C. Chao, B.M. Wu, D.T. Kamei, Enhancing the lateral-flow immunoassay for viral detection using an aqueous two-phase micellar system, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 2955-2961.
- [60] T. Hahn, S. Hardt, Concentration and size separation of DNA samples at liquid-liquid interfaces, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 5476-5479.
- [61] R. Hu, X.J. Feng, P. Chen, M. Fu, H. Chen, L. Guo, B.F. Liu, Rapid, highly efficient extraction and purification of membrane proteins using a microfluidic continuous-flow based aqueous two-phase system, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 171-177.
- [62] D.F.C. Silva, A.M. Azevedo, P. Fernandes, V. Chu, J.P. Conde, M.R. Aires-Barros, Design of a microfluidic platform for monoclonal antibody extraction using an aqueous two-phase system, *J. Chromatogr. A*, 1249 (2012) 1-7.
- [63] F. Mashayekhi, A.M. Le, P.M. Nafisi, B.M. Wu, D.T. Kamei, Enhancing the lateral-flow immunoassay for detection of proteins using an aqueous two-phase micellar system, *Anal. Bioanal. Chem.*, 404 (2012) 2057-2066.
- [64] S. Raja, V.R. Murty, Development and evaluation of environmentally benign aqueous two phase systems for the recovery of proteins from tannery waste water, *ISRN Chem. Eng.*, 2012 (2012) 1-9.
- [65] Y.S. Huang, T. Meng, T. Guo, W. Li, W.L. Yan, X.R. Li, S. Wang, Z.P. Tong, Aqueous two-phase extraction for bovine serum albumin (BSA) with co-laminar flow in a simple coaxial capillary microfluidic device, *Microfluid. Nanofluidics*, 16 (2014) 483-491.
- [66] C.J. Mazzeu, E.Z. Ramos, M.H.D. Cavalcanti, D.B. Hirata, L.S. Virtuoso, Partitioning of *Geotrichum candidum* Lipase from fermentative crude extract by aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate, *Sep. Purif. Technol.*, 156, Part 2 (2015) 158-164.
- [67] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, L.A. Minim, J.S.D. Coimbra, A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system, *Talanta*, 80 (2010) 1139-1144.
- [68] A. Šalić, A. Tušek, D. Fabek, I. Rukavina, B. Zelić, Aqueous two-phase extraction of polyphenols using a microchannel system -- Process optimization and intensification, *Food Technol. Biotechnol.*, 49 (2011) 495-501.
- [69] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, P.D. Patrício, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, Aqueous two-phase systems: a new approach for the determination of p-aminophenol, *J. Hazard. Mater.*, 192 (2011) 292-298.

- [70] V.G. Lacerda, A.B. Mageste, I.J.B. Santos, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, Separation of Cd and Ni from Ni–Cd batteries by an environmentally safe methodology employing aqueous two-phase systems, *J. Power Sources*, 193 (2009) 908-913.
- [71] Y.H. Choi, Y.S. Song, D.H. Kim, Droplet-based microextraction in the aqueous two-phase system, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3723-3728.
- [72] P.R. Patrício, M.C. Mesquita, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Application of aqueous two-phase systems for the development of a new method of cobalt(II), iron(III) and nickel(II) extraction: a green chemistry approach, *J. Hazard. Mater.*, 193 (2011) 311-318.
- [73] G.D. Rodrigues, L.R. De Lemos, L.H.M. Da Silva, M.C.H. Da Silva, Monosegmented flow analysis exploiting aqueous two-phase systems for the determination of cobalt, *Anal. Sci.*, 28 (2012) 1213-1218.
- [74] L.R. de Lemos, R.A. Campos, G.D. Rodrigues, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Green separation of copper and zinc using triblock copolymer aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.*, 115 (2013) 107-113.
- [75] R.C. da Cunha, P.R. Patrício, S.J.R. Vargas, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Green recovery of mercury from domestic and industrial waste, *J. Hazard. Mater.*, 304 (2016) 417-424.
- [76] P.R. Patrício, R.C. Cunha, S.J.R. Vargas, Y.L. Coelho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Chromium speciation using aqueous biphasic systems: development and mechanistic aspects, *Sep. Purif. Technol.*, 158 (2016) 144-154.
- [77] W.C.M. de Oliveira, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, L.R. de Lemos, Green selective recovery of lanthanum from Ni-MH battery leachate using aqueous two-phase systems, *Chem. Eng. J.*, 322 (2017) 346-352.
- [78] Y.S. Song, Y.H. Choi, D.H. Kim, Microextraction in a tetrabutylammonium bromide/ammonium sulfate aqueous two-phase system and electrohydrodynamic generation of a micro-droplet, *J. Chromatogr. A*, 1162 (2007) 180-186.
- [79] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7623-7629.
- [80] J.M. de Alvarenga, R.A. Fideles, M.V. da Silva, G.F. Murari, J.G. Taylor, L.R. de Lemos, G. Dias Rodrigues, A.B. Mageste, Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilibria*, 391 (2015) 1-8.
- [81] G.A. Borges, L.P. Silva, J.A. Penido, L.R. de Lemos, A.B. Mageste, G.D. Rodrigues, A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater, *J. Environ. Manage.*, 183 (2016) 196-203.

- [82] M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, J. Amim, R.O. Guimarães, J.P. Martins, Liquid–liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, Li₂SO₄, or MgSO₄, *J. Chem. Eng. Data*, 51 (2006) 2260-2264.
- [83] P. Alexandridis, T.A. Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, 96 (1995) 1-46.
- [84] J. Persson, A. Kaul, F. Tjerneld, Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide–propylene oxide copolymers, *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 743 (2000) 115-126.
- [85] L.R. de Lemos, I.J.B. Santos, G.D. Rodrigues, G.M.D. Ferreira, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by L35 and salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 1193-1199.
- [86] D.M. Alan, W. Andrew, *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*, Second edition ed., Blackwell Science, Malden, MA, 1997.
- [87] H.O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, C.A. Haynes, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 711 (1998) 3-17.
- [88] A.F.C. Rengifo, G.M.D. Ferreira, G.M.D. Ferreira, M.C.H. da Silva, J.D. Rezende, A.C.D. Pires, L.H.M. da Silva, Driving forces for chymosin partitioning on the macromolecule-salt aqueous two phase system, *Food Bioprod. Process.*, 100 (2016) 361-371.

Capítulo 2

Phase equilibrium of aqueous two-phase systems composed by L35 triblock copolymer + organic and inorganic ammonium electrolytes + water at 298.2 and 313.2 K

ABSTRACT

Liquid-liquid equilibrium data of aqueous two-phase systems (ATPS) composed by L35 triblock copolymer + ammonium electrolytes (nitrate, NO_3^- ; tartrate, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$; phosphate, HPO_4^{2-} ; acetate, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$) + water, at different temperatures (298.2 and 313.2 K) are presented in this paper. The experimental ATPS data were correlated with the original and modified non-random two-liquid (NRTL) for predicting energetic parameters of the studied systems. The results were satisfactory with global root mean square deviations (33 tie-lines) of the 2.36 % and 2.53 % for the original and modified models, respectively. The effect of the temperature and electrolyte nature on the biphasic area position was investigated. The increase of the temperature promoted a slight increase in the two-phase region indicating the endothermic character of the phase splitting. The increase in the temperature also promoted a rise in the module of the slope of the tie-lines. The anions ability to promote phase separation followed the order: $\text{HPO}_4^{2-} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$.

Keywords: aqueous two-phase systems; liquid-liquid equilibrium; ammonium salts; L35; NRTL.

1. Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPS) have been investigated as environmentally safe and promising alternative extraction systems. These systems can be formed by the mixture of aqueous solutions of a polymer and an electrolyte [1], two electrolytes [2] or two structurally different polymers [3], under specific thermodynamic conditions [4]. The resulting systems have two immiscible liquid phases mainly formed by water [3].

The ATPS researches involving metal ions [5-7], dyes [8,9], phenolic compounds [10,11] and enzymes [12,13] have focused on the use of systems composed by polymer and electrolyte. The poly(ethylene oxide) polymer (PEO) is one of the main used macromolecules since it contributes to some ATPS advantages as low cost [14], rapid phase separation [15], low interfacial tension [3], possibility to scale-up, and low toxicity [12]. On the other hand, for a long time, the hydrophilicity of the PEO-based systems limited the ATPS application for water soluble compounds. Da Silva et al, in 2005, were one of the firsts scientists to fine-tuned the polymer-rich phase characteristic with the use of triblock copolymer macromolecules and expand the application of the ATPS to hydrophobic compounds [16].

The triblock copolymer used in ATPS formation (commercially available as pluronic) is composed by units of poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(propylene oxide) (PPO), denoted as (PEO)_n-(PPO)_m-(PEO)_n or (EO)_n(PO)_m(EO)_n [17]. The usual nomenclature for the triblock copolymer starts with the letters L, P or F, that means liquid, paste and flakes, respectively. The first one or the two first numbers are indicative of the molecular weight of the PPO block, and the last number represents the weight fraction of the PEO block [17]. The advantage of using triblock copolymers is that, in aqueous solution, at specific temperature and concentration, these substances have the ability of self-association to form micelles with a core dominated by hydrophobic units (PPO), surrounded by a crown of hydrophilic units

(PEO) [18,19]. These micelles provide amphiphilic characteristics for the ATPS [19], allowing the partitioning of hydrophilic and hydrophobic compounds [20]. Another advantage is that triblock copolymers are thermosensitive, presenting a lower cloud point temperature than PEO polymer [21]. Consequently, these macromolecules are easier recycled by the phase separation induced by the temperature increase [21]. Despite the advantages presented by the triblock copolymer in the literature still has few ATPS equilibrium data for systems composed by triblock copolymers [16,20,22-26]. In addition, liquid-liquid equilibrium data with ammonium electrolytes are also scarce, despite these salts are environmentally safe and compatible with different analytical techniques. Finally, ATPS constituted by triblock copolymer and ammonium salt will allow that the applications of the ATPS are more extended.

In this paper, we report the phase equilibrium data for systems containing L35 triblock copolymer ((EO)₁₁(PO)₁₆(EO)₁₁), which has an average molar mass of 1900 g mol⁻¹ and different ammonium electrolytes: L35 + NH₄NO₃ + H₂O, L35 + (NH₄)₂C₄H₄O₆ + H₂O, L35 + (NH₄)₂HPO₄ + H₂O, and L35 + NH₄C₂H₃O₂ + H₂O. Phase equilibria were obtained at 298.2 and 313.2 K because these temperatures are more using to separate different analytes thus widening the applications of the aqueous biphasic systems. Equilibrium data were correlated using the original and modified NRTL models to estimate new interaction parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

L35 copolymer and all the electrolytes were analytical-grade and used as received without further purification, as shown in Table 1. Deionized water (Millipore Corp., Molsheim / Bas-Rhin, France) was used for preparing all the solutions.

Table 1

Specification of chemical samples.

Chemical name	Source	Initial mole fraction purity
L35 ^a	Aldrich	0.999
Ammonium nitrate	Aldrich	0.980
Ammonium tartrate	Vetec	0.990
Ammonium phosphate dibasic	Vetec	0.980
Ammonium acetate	Aldrich	0.980

^a Triblock copolymer ((EO)₁₁(PO)₁₆(EO)₁₁) with average molar mass of 1900 g mol⁻¹.

2.2. Preparation of the aqueous two-phase systems

Aqueous stock solutions of L35 and electrolyte were prepared using an analytical balance (AY 220, Shimadzu, Rosário / Cavite, Phillippines) with uncertainty of ± 0.0001 g. The stock solutions of copolymer and electrolyte were weighed in glass vessels to obtain the appropriated amount of each component to form biphasic systems. The glass vessels were stirred in a vortex mixer (CertomatMV, B. Braun Biotech International, Melsungen / Hesse, Germany) until the system became turbidity. They were left in a controlled bath (MQBTC 99-20, Microquimica, Palhoça / Santa Catarina, Brazil) with uncertainty of ± 0.1 K at 298.2 or 313.2 K for at least 48 h, to reach the thermodynamic equilibrium. The equilibrium state was characterized by the presence of two clear phases. Aliquots of the both phases were collected and appropriately diluted for quantification.

2.3. Determination of equilibrium composition

The electrolyte concentration (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ or $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) was determined by conductivity (DM-32, Digimed, São Paulo / São Paulo, Brazil, with uncertainty of ± 0.001) after obtaining the analytical curves [22]. The electrolytes dynamic range was 1.00×10^{-3} to 300×10^{-3} % (m/m) with $R^2 \geq 0.999$. The conductivity measurement of diluted triblock copolymer solutions was the same obtained for deionized water, indicating that the concentration of the macromolecule does not contribute to the conductivity value. So, the conductivity represents only the concentration of the electrolyte. The uncertainty of the electrolyte composition by this method was ± 0.44 %. In order to determine the concentration of the copolymer, standard copolymer aqueous solutions (or electrolyte aqueous solutions) were prepared and analyzed in a refractometer (Abbe 09-2011, Analytik Jena, Thuringia / Jena, Germany, with uncertainty of ± 0.0001). Analytical curves with similar linear adjustments for L35 and electrolytes were obtained, confirming the additivity of the refractive index. So, the measurement of the refractive index of the samples provide the sum of the concentration of copolymer and electrolyte. The concentration of the copolymer can be obtained by the difference between the refractive index value (which corresponds to the sum of the copolymer and electrolyte concentration) and conductivity value (which corresponds only to the electrolyte concentration), according to Eq. (1):

$$[Cp] = [IR] - [E] \quad (1)$$

where Cp is the concentration of the copolymer in % (m/m), IR is the refractive index and E is the electrolyte concentration in % (m/m). The uncertainty of the copolymer composition by this method was ± 0.61 %. The water content was determined by mass balance. The uncertainty of the water composition by this method was ± 0.48 %. The determination of the

concentration of the copolymer, electrolyte and water was carried out in the same way in both phases. All analytical measurements were performed in duplicate.

3. Results and Discussion

3.1. Equilibrium data of aqueous two-phase systems

Phase composition for ATPS is great important for studying the partition of strategic solutes in these environmental safe systems. Tables 2 to 5 show the phase composition and the tie-line lengths (TLL) of the new systems formed by L35 + NH_4NO_3 + H_2O , L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ + H_2O , L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + H_2O , and L35 + $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ + H_2O at 298.2 and 313.2 K. The standard uncertainties were calculated using the compositions of the macromolecule-rich phase (MRP) and electrolyte-rich phase (ERP) at 298.2 and 313.2 K. The phase compositions were presented in mass percent (w).

Table 2

Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + NH₄NO₃ (2) + H₂O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure $p = 0.09$ MPa.^a

Overall			Macromolecule-rich phase			Electrolyte-rich phase			TLL
w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	
T = 298.2 K									
16.32	33.58	50.10	28.26	26.40	45.34	1.29	41.64	57.07	30.98
17.95	34.08	47.97	33.23	25.16	41.61	1.16	42.90	55.94	36.65
20.19	34.59	45.22	36.11	24.66	39.23	0.95	45.82	53.23	41.04
22.40	35.09	42.51	41.12	23.89	34.99	0.76	47.23	52.01	46.62
24.54	35.58	39.88	43.49	23.98	32.53	0.01	49.40	50.59	50.37
T = 313.2 K									
16.33	33.58	50.09	38.36	23.28	38.36	0.93	41.38	57.69	41.58
17.95	34.08	47.97	41.48	22.82	35.70	0.70	43.52	55.78	45.73
20.21	34.59	45.20	43.71	22.42	33.87	0.21	45.87	53.92	49.42
22.42	35.07	42.51	45.65	22.25	32.10	1.06	46.89	52.05	50.95
24.55	35.58	39.87	47.46	22.31	30.23	0.01	49.89	50.10	54.88

^a Standard uncertainties u are $u(\text{temperature}) = 0.1$ K, $u(\text{L35}_{\text{MRP}}) = 0.32$, $u(\text{L35}_{\text{ERP}}) = 1.11$, $u(\text{electrolyte}_{\text{MRP}}) = 0.22$, $u(\text{electrolyte}_{\text{ERP}}) = 0.89$, $u(\text{water}_{\text{MRP}}) = 0.25$, $u(\text{water}_{\text{ERP}}) = 0.23$ and $u(p) = 0.30$ kPa.

Table 3

Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + (NH₄)₂C₄H₄O₆ (2) + H₂O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure $p = 0.09$ MPa.^a

Overall			Macromolecule-rich phase			Electrolyte-rich phase			TLL
w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	
T = 298.2 K									
12.65	16.03	71.32	45.99	4.47	49.54	0.63	20.49	78.88	48.11
14.50	17.01	68.49	50.37	3.71	45.92	0.27	22.62	77.11	53.55
16.34	18.01	65.65	53.32	3.45	43.23	0.64	24.68	74.68	56.80
18.24	19.01	62.75	57.68	2.85	39.47	1.30	26.05	72.65	60.97
20.21	20.00	59.79	60.47	2.41	37.12	0.48	28.79	70.73	65.53
T = 313.2 K									
12.55	16.10	71.35	59.46	2.27	38.27	0.01	21.61	78.38	62.52
16.34	18.01	65.65	64.80	1.76	33.44	0.41	24.23	75.36	68.20
18.25	19.01	62.74	67.42	1.49	31.09	0.42	26.26	73.32	71.43
20.22	20.00	59.78	71.64	1.21	27.15	0.15	28.96	70.89	76.69

^a Standard uncertainties u are $u(\text{temperature}) = 0.1$ K, $u(\text{L35}_{\text{MRP}}) = 0.68$, $u(\text{L35}_{\text{ERP}}) = 0.43$, $u(\text{electrolyte}_{\text{MRP}}) = 0.09$, $u(\text{electrolyte}_{\text{ERP}}) = 0.49$, $u(\text{water}_{\text{MRP}}) = 0.61$, $u(\text{water}_{\text{ERP}}) = 0.33$ and $u(p) = 0.30$ kPa.

Table 4

Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + (NH₄)₂HPO₄ (2) + H₂O (3) at the temperature 298.2 and 313.2 K and pressure p = 0.09 MPa.^a

Overall			Macromolecule-rich phase			Electrolyte-rich phase			TLL
w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	
T = 298.2 K									
19.02	7.75	73.23	37.28	2.00	60.72	1.21	13.55	85.24	37.87
21.26	8.26	70.48	42.84	1.52	55.64	2.23	14.17	83.60	42.53
23.30	8.75	67.95	46.19	1.28	52.53	1.32	16.52	82.16	47.39
25.32	9.25	65.43	49.38	1.08	49.54	1.22	17.97	80.81	51.04
27.34	9.74	62.92	53.07	0.85	46.08	1.11	19.43	79.46	55.18
T = 313.2 K									
17.06	7.75	75.19	45.83	1.55	52.62	2.38	10.99	86.63	44.46
19.07	8.25	72.68	51.54	1.15	47.31	0.66	12.94	86.40	52.23
20.90	8.75	70.35	53.79	0.98	45.23	0.83	14.14	85.03	54.57
22.69	9.25	68.06	56.69	0.80	42.51	0.01	15.51	84.48	58.56
24.52	9.74	65.74	58.89	0.67	40.44	1.02	17.27	81.71	60.20

^a Standard uncertainties u are u(temperature) = 0.1 K, u(L35_{MRP}) = 0.69, u(L35_{ERP}) = 0.32, u(electrolyte_{MRP}) = 0.05, u(electrolyte_{ERP}) = 0.31, u(water_{MRP}) = 0.66, u(water_{ERP}) = 0.09 and u(p) = 0.30 kPa.

Table 5

Experimental (liquid + liquid) equilibrium data for the system L35 (1) + NH₄C₂H₃O₂ (2) + H₂O (3) at the temperature 298.2 K and pressure p = 0.09 MPa.^a

Overall			Macromolecule-rich phase			Electrolyte-rich phase			TLL
w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	w ₁	w ₂	w ₃	
T = 298.2 K									
23.20	35.50	41.30	44.07	24.41	31.52	1.83	50.48	47.69	49.64
27.46	36.50	36.04	69.28	11.52	19.20	1.10	54.60	44.30	80.65
29.63	37.00	33.37	78.34	6.59	15.07	2.63	56.77	40.60	90.83
34.46	38.01	27.53	88.22	2.99	8.79	0.01	60.95	39.04	105.55

^a Standard uncertainties u are u(temperature) = 0.1 K, u(L35_{MRP}) = 0.61, u(L35_{ERP}) = 0.72, u(electrolyte_{MRP}) =

0.47, $u(\text{electrolyte}_{\text{ERP}}) = 1.02$, $u(\text{water}_{\text{MRP}}) = 1.00$, $u(\text{water}_{\text{ERP}}) = 0.67$ and $u(p) = 0.30$ kPa.

The tie-lines are diagram connecting lines between the composition of the two phases at constant pressure, temperature and concentration. The TLL is an important parameter that is a numerical indicator of the difference in phase composition between ERP and MRP, and when the systems are in thermodynamic equilibrium, it is related to the difference in intensive thermodynamic properties of the coexisting phases [27]. The TLL can be calculated by the difference between the macromolecule and electrolyte concentration in both phases in equilibrium, as shown in the Eq. (2):

$$\text{TLL} = \left[\left(w_{\text{M}}^{\text{MRP}} - w_{\text{M}}^{\text{ERP}} \right)^2 + \left(w_{\text{E}}^{\text{MRP}} - w_{\text{E}}^{\text{ERP}} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2)$$

where $w_{\text{M}}^{\text{MRP}}$ and $w_{\text{M}}^{\text{ERP}}$ are the macromolecule concentration in the macromolecule- and electrolyte-rich phases, respectively, and $w_{\text{E}}^{\text{MRP}}$ and $w_{\text{E}}^{\text{ERP}}$ are the corresponding electrolyte concentration in the macromolecule- and electrolyte-rich phases, respectively. The tie-lines were obtained by linear regression fitting of the appropriated values of global composition and the composition of the ERP and MRP.

As usually observed in polymer-electrolyte APTS [28-30], in the investigated systems, water is present in large quantities. The top phase is a macromolecule-rich phase whereas the bottom phase is an electrolyte-rich phase. With the increase in the global composition, the copolymer concentration increases in the MRP, and the electrolyte concentration decreases in this phase. In the ERP, the electrolyte concentration increases with the global composition, and the copolymer concentration decreases, causing an increase in the TLL thermodynamic parameter. This behavior agrees with other polymer-salt APTS results reported in the literature [4,28,29,31,32].

3.2. Effect of the anion nature on the phase separation process

Binodal curve indicates the condition at which two distinct phases may coexist in equilibrium [33]. It can be influenced by the ATPS-forming electrolyte [26]. The closer the binodal is to the origin of the Cartesian plane, lower the salt concentration required for the formation of the ATPS, and consequently, greater is the ability of the component to form the ATPS. In order to understand the effect of the electrolyte anion in forming the aqueous biphasic systems, binodal curves of four salts with different anions and common ammonium cation ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, NH_4NO_3 and $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) were obtained (Fig. 1).

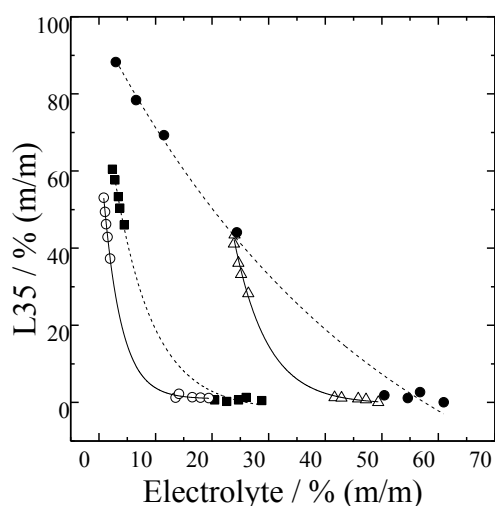


Fig.1. Influence of the anion on the phase diagram of the L35 + ammonium electrolyte + H₂O ATPS at 298.2 K. (○) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; (■) $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$; (△) NH_4NO_3 and (●) $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$.

The anion capacity to induce ATPS formation follows the order: $\text{HPO}_4^{2-} > \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$. Lower quantity of bivalent anions was needed to form biphasic systems compared to monovalent ions.

The ability of the investigated electrolytes of inducing the phase separation agrees with da Silva and Loh model [34]. Based on calorimetric measurements, the authors proposed the processes leading to ATPS formation in terms of electrolyte and polymer interaction.

Their experimental results showed that ATPS formation is an endothermic process, so, the phase separation must be driven by entropy increase. To forming the ATPS the electrolyte (cation + anion) solution is added in a polymer solution, the cation interacts with the polymer (macromolecule-cation) releasing water molecules, consequently increasing the entropy of the system. As more electrolyte is added to the system, more cations interact with the polymer to a point that macromolecule is energetically saturated. At this point, a decrease of the entropy occurs causing the segregation of the system in two phases to minimize the Gibbs free energy and turning ATPS formation more favorable. The higher the anion charge, more intense is its interaction with macromolecule-cation surface. Consequently, lower quantity of cation is required to energetically saturate the surface of the macromolecule and greater the ability of the anion to promote phase separation. As the HPO_4^{2-} and $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$ anions have higher valence than NO_3^- and $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$, they are more efficient to induce the phase separation. Several works were also able to justify the efficiency for anions and/or cations in inducing aqueous two-phase system formation by Silva and Loh model [4,27,28,35,36].

3.3. Effect of the temperature on ATPS composition

Liquid-liquid equilibrium data at different temperatures are necessary for the development and optimization of processes using ATPS since the phase separation can be dependent of the temperature. Therefore, the phase diagrams of the systems formed by L35 + NH_4NO_3 + H_2O , L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ + H_2O and L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + H_2O were obtained at 298.2 and 313.2 K (Fig. 2). The system L35 + $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ + H_2O at 313.2 K remained turbid for a long time, making its quantification impracticable and using of the system to different applications as extraction and / or determination of heavy metals, dyes and emerging contaminants [6,37,38].

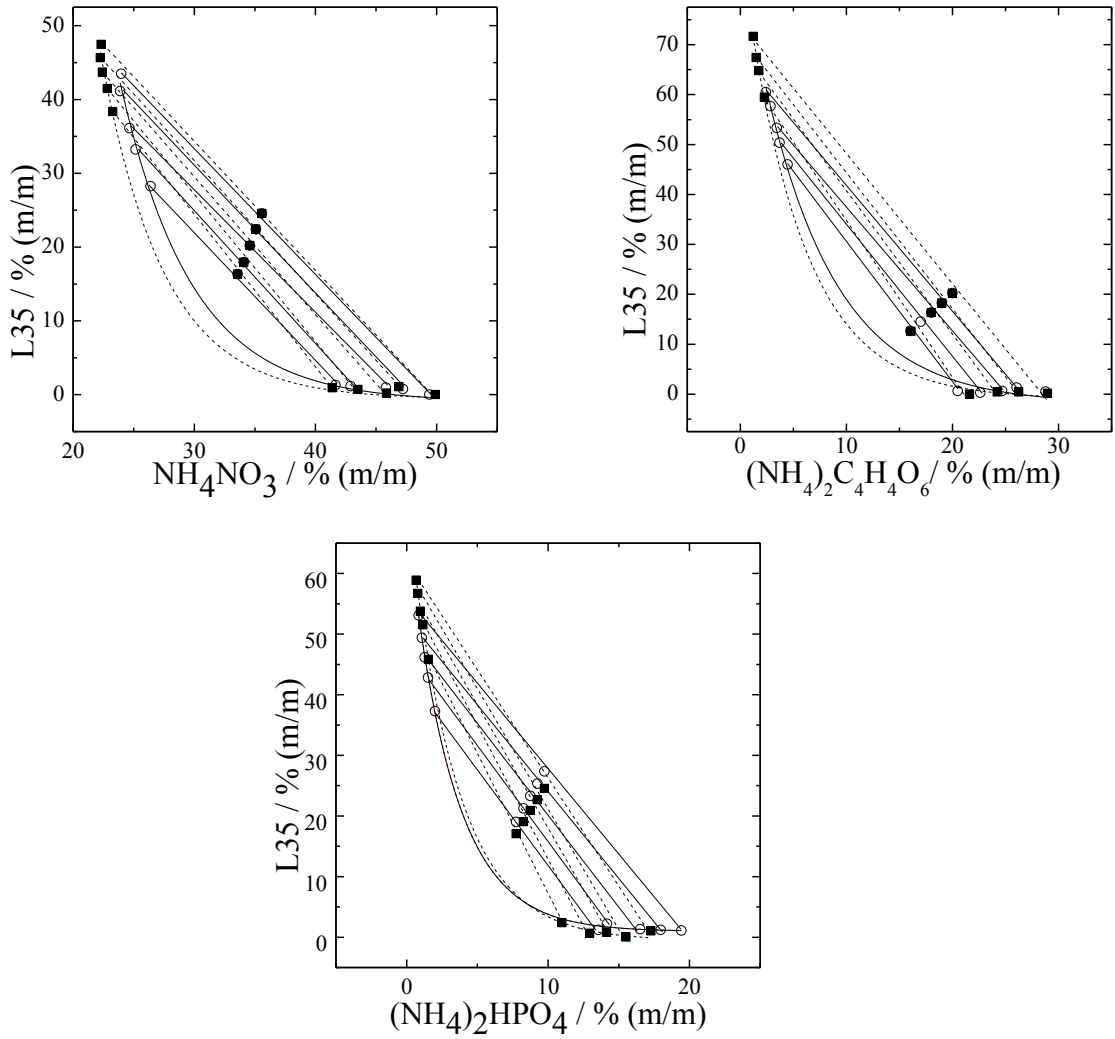


Fig.2. Influence of the temperature on the phase diagram of the L35 + ammonium electrolyte + H₂O ATPS. (—○—) 298.2 K and (---■---) 313.2 K.

For all studied systems, the raise of the temperature from 298.2 to 313.2 K increased the length of the tie-line, but it had discrete effect on the binodal position. The increase in the equilibrium temperature promoted a small increase in the biphasic region, indicating the endothermic character of the phase separation process, as proposed by da Silva and Loh [34]. The same behavior was observed in previously reported works using L35 copolymer [19,26].

The temperature effect on the phase equilibrium compositions can also be analyzed through the slope of the tie-lines (STL) values. The STL values can be calculated by Eq. (3):

$$STL = \frac{(w_{L35}^{MRP} - w_{L35}^{ERP})}{(w_{ELT}^{MRP} - w_{ELT}^{ERP})} \quad (3)$$

where w_{L35}^{MRP} and w_{L35}^{ERP} are the L35 concentration in the macromolecule- and electrolyte-rich phases, respectively, and w_{ELT}^{MRP} and w_{ELT}^{ERP} are the electrolyte concentration in the macromolecule- and electrolyte-rich phases, respectively. The obtained STL values are reported in Table 6.

Table 6

STL values systems at 298.2 and 313.2 K.

L35 + NH ₄ NO ₃ + H ₂ O			L35 + (NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆ + H ₂ O			L35 + (NH ₄) ₂ HPO ₄ + H ₂ O		
TLL	298.2 K	313.2 K	TLL	298.2 K	313.2 K	TLL	298.2 K	313.2 K
30.98	-1.82	-	48.11	-2.84	-	37.87	-3.12	-
36.65	-1.85	-	53.55	-2.66	-	42.53	-3.21	-
41.04	-1.70	-	56.80	-2.49	-	47.39	-2.94	-
46.62	-1.76	-	60.97	-2.43	-	51.04	-2.85	-
50.37	-1.71	-	65.53	-2.28	-	55.18	-2.80	-
41.58	-	-2.12	62.52	-	-3.13	44.46	-	-4.62
45.73	-	-2.01	68.20	-	-2.89	52.23	-	-4.35
49.42	-	-1.86	71.43	-	-2.73	54.57	-	-4.05
50.95	-	-1.85	76.69	-	-2.60	58.56	-	-3.86
54.88	-	-1.72				60.20	-	-3.51

In Eq. (3), the terms $(w_{L35}^{MRP} - w_{L35}^{ERP})$ and $(w_{ELT}^{MRP} - w_{ELT}^{ERP})$ represents the difference between the compound concentrations in the two coexisting phases. Consequentially, considering similar overall compositions, distinct STL values at 298.2 and 313.2 K indicates that the composition of the equilibrium phases is affected by temperature.

The module of the STL values (Table 6) increased with the elevation of the temperature, considering comparable overall compositions. As the elevation of the

temperature reduces the solubility of the ATPS-forming macromolecule [21], the STL alteration can be related to the spontaneous transfer of water molecules from the MRP raising the macromolecule concentration in the MRP and reducing the electrolyte concentration in the ERP [19,26]. This behavior was observed comparing the ATPS phase compositions formed by $L35+NH_4NO_3+H_2O$, in different TLL (50.37% and 50.95% (w/w)) and temperature (298.2 K and 313.2 K), respectively. The same behavior could be observed for ATPS composed by $L35+(NH_4)_2C_4H_4O_6+H_2O$, also comparing different phase compositions of the TLL (65.53% and 68.20% (w/w)) and temperature (298.2 K and 313.2 K) respectively. Lastly, comparing TLL (51.04% and 52.32% (w/w)) and temperature (298.2 K and 313.2 K) respectively, in the ATPS composed by $L35+(NH_4)_2HPO_4+H_2O$, similar behavior was obtained, following the trend of previously mentioned system.

3.4. Thermodynamic modeling and estimation procedure

Activity coefficient thermodynamic models are applied to describe and predict phase equilibria properties enabling the reduction of the experimental measurements and costs [39,40].

The NRTL, an activity coefficient thermodynamic model, is suitable for correlating equilibrium property of non-ideal non-electrolytic systems. In order to consider the effect of electrolytes in the liquid-liquid equilibrium, the original model was modified [41,42]. Both models use the concept of local composition, considering that the composition of the system around of the molecule is different of the composition in the bulk of the solution due to intermolecular interactions [41,43]. This concept reduces the number of adjustable parameters to apply the model.

The NRTL activity coefficient (γ_i) for components in a binary system is expressed by

Eq.(4) [43]:

$$\ln \gamma_i = \frac{\sum_j \frac{\tau_{ji} G_{ji} w_j}{M_j}}{\sum_j \frac{G_{ji} w_j}{M_j}} + \sum_j \left[\frac{w_j G_{ji}}{M_j \sum_k \frac{G_{kj} w_k}{M_k}} \left(\tau_{ij} - \frac{\sum_k \frac{w_k \tau_{kj} G_{kj}}{M_k}}{\sum_k \frac{G_{kj} w_k}{M_k}} \right) \right] \quad (4)$$

where w and M are the the mass fraction and the molar mass respectively. The parameters of interaction energy of the molecules i-j (G_{ij}) can be calculated by Eq. (5):

$$G_{ij} = \exp(-\alpha_{ij} \tau_{ij}) \quad \text{where } \tau_{ij} = \frac{A_{ij}}{T} \text{ and } \tau_{ji} = \frac{A_{ji}}{T} \quad (\tau_{ij} \neq \tau_{ji}) \quad (5)$$

α is the non-randomness factor in the mixture ($\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$). A_{ij} and A_{ji} are interaction parameters as given by Eq. (6) and Eq. (7):

$$A_{ij} = A_{0ij} + A_{1ij} T \quad (6)$$

$$A_{ji} = A_{0ji} + A_{1ji} T \quad (7)$$

The original and modified NRTL models have five adjustable parameters for each binary pair (A_{0ij} , A_{0ji} , A_{1ij} , A_{1ji} and α_{ij}).

The results of the new interaction parameters of all L35 + electrolyte + H₂O ATPS obtained by the original and modified NRTL models are shown in Tables 7 and 8.

Table 7

Estimated original NRTL parameters.

i	j	A_{0ij}	A_{0ji}	A_{1ij}	A_{1ji}	α_{ij}
L35	Ammonium acetate	237.04	-6326.4	-0.7413	-31.107	0.39765
L35	Ammonium tartrate	-601.05	1999.1	1.9987	15.216	0.21586
L35	Ammonium phosphate dibasic	-9867.5	4468.1	-109.01	40.068	0.39470
L35	Ammonium nitrate	-186.02	35.528	1.0987	-1.976	0.39142
L35	Water	124.19	-10014.6	-475.01	21.214	0.35967
Ammonium acetate	Water	-24.304	20.901	-65.342	54.953	0.39005
Water	Ammonium tartrate	-821.21	4002.32	-301.32	40.398	0.39329
Water	Ammonium phosphate dibasic	304.14	241.241	21.423	-18.143	0.21042
Water	Ammonium nitrate	21.4130	-36.104	54.104	4.6487	0.21163

Table 8

Estimated modified NRTL parameters.

i	j	A_{0ij}	A_{0ji}	A_{1ij}	A_{1ji}	α_{ij}
L35	Ammonium acetate	241.21	-6454.4	-0.654	-32.241	0.38981
L35	Ammonium tartrate	-602.54	2006.5	2.0101	15.164	0.21634
L35	Ammonium phosphate dibasic	-9867.5	4468.1	-109.01	40.068	0.39630
L35	Ammonium nitrate	-180.42	41.235	-2.5497	-8.0231	0.39404
L35	Water	134.13	-11871.1	-4601.2	191.21	0.35015
Ammonium acetate	Water	-21.541	24.041	-53.605	64.021	0.39124
Water	Ammonium tartrate	-805.43	3905.2	-201.53	39.641	0.39011
Water	Ammonium phosphate dibasic	304.14	241.241	21.423	-18.143	0.21194
Water	Ammonium nitrate	41.0161	-54.541	61.641	5.0123	0.22011

The root mean square deviation between experimental and calculated compositions ($\hat{\omega}$), are shown in Table 9.

Table 9

Root mean square deviations in ternary systems (original NRTL) and (modified NRTL).

Systems	NRTL $\hat{\omega}$ (%) (original NRTL)	NRTL $\hat{\omega}$ (%) (modified NRTL)
L35 + Ammonium acetate + water at 298.2 K	2.42	2.62
L35 + Ammonium tartrate + water at 298.2 K	2.23	2.13
L35 + Ammonium tartrate + water at 313.2 K	3.13	3.51
L35 + Ammonium phosphate dibasic + water at 298.2 K	2.22	2.34
L35 + Ammonium phosphate dibasic + water at 313.2 K	3.03	3.86
L35 + Ammonium nitrate + water at 298.2 K	2.53	2.03
L35 + Ammonium nitrate + water at 313.2 K	3.25	3.81
global (33 tie-lines)	2.36	2.53

The values indicated in Tables 7-9 for the NRTL models confirmed the reliability of the results. The small global root mean square deviations of the original (2.36 %) and modified (2.53 %) NRTL models for the investigated ATPS showed that it was possible to obtain a group of parameters that describes, with accuracy, the liquid-liquid equilibrium of the ternary systems.

4. Conclusion

The experimental LLE data for aqueous two-phase system composed by L35 + NH_4NO_3 + H_2O , L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ + H_2O , L35 + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + H_2O , and L35 + $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ + H_2O at different temperatures (298.2 and 313.2 K) and tie-line length were obtained. The influence of the ATPS forming-electrolyte, were also investigated, showing a great effect on the position of the binodal curve. The ATPS experimental data for all studied systems were correlated by original and modified NRTL models to determine the activity coefficients. The theoretical results presented good correlation with experimental data with root mean square deviation close of 2.5 %. The L35 copolymer provide new systems with potential application for the extraction / partitioning of slightly water soluble compounds, contributing to increase the literature database of copolymer + electrolyte + water ATPS.

5. References

- [1] Y.P. Jimenez, H.R. Galleguillos, M. Claros, Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by NaNO_3 + Poly(ethylene glycol) + H_2O , *Fluid Phase Equilib.*, 421 (2016) 93-103.
- [2] U. Novak, A. Pohar, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction within a microchannel system, *Sep. Purif. Technol.*, 97 (2012) 172-178.

- [3] Z.L. Zhao, Q. Li, X.L. Ji, R. Dimova, R. Lipowsky, Y.G. Liu, Molar mass fractionation in aqueous two-phase polymer solutions of dextran and poly(ethylene glycol), *J. Chromatogr. A*, 1452 (2016) 107-115.
- [4] A.F.C. Rengifo, G.M.D. Ferreira, G.M.D. Ferreira, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly(ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: effect of temperature, anion and molar mass, *Fluid Phase Equilib.*, 406 (2015) 70-76.
- [5] P.R. Patrício, R.C. Cunha, S.J.R. Vargas, Y.L. Coelho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Chromium speciation using aqueous biphasic systems: development and mechanistic aspects, *Sep. Purif. Technol.*, 158 (2016) 144-154.
- [6] R.C. da Cunha, P.R. Patrício, S.J.R. Vargas, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Green recovery of mercury from domestic and industrial waste, *J. Hazard. Mater.*, 304 (2016) 417-424.
- [7] W.C.M. de Oliveira, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, L.R. de Lemos, Green selective recovery of lanthanum from Ni-MH battery leachate using aqueous two-phase systems, *Chem. Eng. J.*, 322 (2017) 346-352.
- [8] G.A. Borges, L.P. Silva, J.A. Penido, L.R. de Lemos, A.B. Mageste, G.D. Rodrigues, A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater, *J. Environ. Manage.*, 183 (2016) 196-203.
- [9] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7623-7629.
- [10] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, P.D. Patrício, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, Aqueous two-phase systems: a new approach for the determination of p-aminophenol, *J. Hazard. Mater.*, 192 (2011) 292-298.
- [11] G.D. Rodrigues, L.R. de Lemos, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, L.A. Minim, J.S.D. Coimbra, A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system, *Talanta*, 80 (2010) 1139-1144.
- [12] C.J. Mazzeu, E.Z. Ramos, M.H.D. Cavalcanti, D.B. Hirata, L.S. Virtuoso, Partitioning of *Geotrichum candidum* Lipase from fermentative crude extract by aqueous two-phase system of polyethylene glycol and sodium citrate, *Sep. Purif. Technol.*, 156, Part 2 (2015) 158-164.
- [13] A.F.C. Rengifo, G.M.D. Ferreira, G.M.D. Ferreira, M.C.H. da Silva, J.D. Rezende, A.C.D. Pires, L.H.M. da Silva, Driving forces for chymosin partitioning on the macromolecule-salt aqueous two phase system, *Food Bioprod. Process.*, 100 (2016) 361-371.
- [14] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, R.A.N. de Aquino, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as 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.

[15] R.M. de Oliveira, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, L.H.M. da Silva, M.P.F. Fontes, Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 895-899.

[16] L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, A.F. Mesquita, K.S. do Nascimento, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH, *J. Chem. Eng. Data*, 50 (2005) 1457-1461.

[17] P. Alexandridis, J.F. Holzwarth, T.A. Hatton, Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association, *Macromolecules*, 27 (1994) 2414-2425.

[18] J. Persson, A. Kaul, F. Tjerneld, Polymer recycling in aqueous two-phase extractions using thermoseparating ethylene oxide-propylene oxide copolymers, *J Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 743 (2000) 115-126.

[19] L.R. de Lemos, I.J.B. Santos, G.D. Rodrigues, G.M.D. Ferreira, L.H.M. da Silva, M.D.H. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase compositions of aqueous two-phase systems formed by L35 and salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 1193-1199.

[20] L.S. Virtuoso, L.M.D. Silva, B.S. Malaquias, K.A.S.F. Vello, C.P.R. Cindra, L.H.M. da Silva, A.F. Mesquita, M.C.H. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 3847-3852.

[21] P. Alexandridis, T.A. Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, 96 (1995) 1-46.

[22] M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, J. Amim, R.O. Guimarães, J.P. Martins, Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixture of triblock copolymers L35 and F68 with Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , or MgSO_4 , *J. Chem. Eng. Data*, 51 (2006) 2260-2264.

[23] M.C. de Oliveira, M.A.N. de Abreu, P.D. Pessoa, Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO, *Biochem. Eng. J.*, 37 (2007) 311-318.

[24] L.H. da Silva, M.D.H. da Silva, R.D.S. de Sousa, J.P. Martins, G.D. Rodrigues, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Surface excess enthalpy of PEO + salt + water and L35 + salt + water aqueous two-phase systems, *J. Chem. Eng. Data*, 54 (2009) 531-535.

[25] J.P. Martins, A.B. Mageste, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, P.D. Patricio, J.S.D. Coimbra, L.A. Minim, Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 54 (2009) 2891-2894.

- [26] L.S. Virtuoso, K.A.S.F. Vello, A.A. de Oliveira, C.M. Junqueira, A.F. Mesquita, N.H.T. Lemes, R.M.M. de Carvalho, M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, Measurement and modeling of phase equilibrium in aqueous two-phase systems: L35 + sodium citrate + water, L35 sodium tartrate + water, and L35 + sodium hydrogen sulfite + water at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 57 (2012) 462-468.
- [27] P.D. Patricio, A.B. Mageste, L.R. de Lemos, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H₂O and PPO + organic salts + H₂O aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 305 (2011) 1-8.
- [28] J.C. Quintão, P.R. Patricio, A.C.G. Veloso, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C. Hespanhol, Liquid-liquid equilibrium of the ternary ammonium salt + poly(propylene glycol) + water system, *Fluid Phase Equilib.*, 442 (2017) 96-103.
- [29] Y. Wang, Y.L. Mao, C. Chen, J. Han, L. Wang, X.W. Hu, T. Chen, L. Ni, Y.T. Hu, Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems containing thermo-sensitive copolymer L31 and salts, *Fluid Phase Equilib.*, 387 (2015) 12-17.
- [30] G.F. Murari, J.A. Penido, P.A.L. Machado, L.R. de Lemos, N.H.T. Lemes, L.S. Virtuoso, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, Phase diagrams of aqueous two-phase systems formed by polyethylene glycol + ammonium sulfate + water: equilibrium data and thermodynamic modeling, *Fluid Phase Equilib.*, 406 (2015) 61-69.
- [31] B.D. An, Y.L. Mao, W.L. Zhang, J. Han, Y. Wang, L. Ni, The cloud point and the liquid-liquid equilibrium behaviors of L31/L61-K₂CO₃/C₄H₄O₆K₂ aqueous two-phase systems at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 425 (2016) 57-64.
- [32] D.N. Faria, A.S. da Silva, L.S. Virtuoso, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, A.F. Mesquita, Aqueous two-phase systems of mixture of triblock copolymer (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃ (L64) and sulfate salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 60 (2015) 1722-1726.
- [33] J. Benavides, M. Rito-Palomares, J.A. Asenjo, 2.49 - Aqueous two-phase systems A2 - Moo-Young, Murray, in: *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, Burlington, 2011, pp. 697-713.
- [34] L.H.M. Da Silva, W. Loh, Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran), *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 10069-10073.
- [35] V.M. de Andrade, G.D. Rodrigues, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, Aqueous two-phase systems of copolymer L64 + organic salt + water: enthalpic L64-salt interaction and Othmer-Tobias, NRTL and UNIFAC thermodynamic modeling, *Chem. Eng. J.*, 171 (2011) 9-15.
- [36] G.D. Rodrigues, L.D. Teixeira, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.M.M. de Carvalho, Phase diagrams of aqueous two-phase systems with organic salts and F68 triblock copolymer at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 1158-1165.

- [37] J.M. de Alvarenga, R.A. Fideles, M.V. da Silva, G.F. Murari, J.G. Taylor, L.R. de Lemos, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 391 (2015) 1-8.
- [38] D.D. Sampaio, L.I. Mafra, C.I. Yamamoto, E.F. de Andrade, M.O. de Souza, M.R. Mafra, F. de Castilhos, Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: equilibrium diagrams and partitioning study, *J. Chem. Thermodyn.*, 98 (2016) 86-94.
- [39] S. Gebreyohannes, B.J. Neely, K.A.M. Gasem, One-parameter modified nonrandom two-liquid (NRTL) activity coefficient model, *Fluid Phase Equilib.*, 379 (2014) 196-205.
- [40] S. Gebreyohannes, B.J. Neely, K.A.M. Gasem, Generalized nonrandom two-liquid (NRTL) interaction model parameters for predicting liquid-liquid equilibrium behavior, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53 (2014) 12445-12454.
- [41] F.S. Santos, S.G. d'Avila, M. Aznar, Salt effect on liquid-liquid equilibrium of water plus 1-butanol plus acetone system: experimental determination and thermodynamic modeling, *Fluid Phase Equilib.*, 187 (2001) 265-274.
- [42] Y.T. Wu, D.Q. Lin, Z.Q. Zhu, Thermodynamics of aqueous two-phase systems - the effect of polymer molecular weight on liquid-liquid equilibrium phase diagrams by the modified NRTL model, *Fluid Phase Equilib.*, 147 (1998) 25-43.
- [43] R.A.G. Se, M. Aznar, Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water plus PEG 4000 plus potassium phosphate at four temperatures: experimental determination and thermodynamic modeling, *J. Chem. Eng. Data*, 47 (2002) 1401-1405.

Capítulo 3

Novo método ambientalmente seguro para determinação de corantes em alimentos utilizando SAB

RESUMO

Corantes artificiais são largamente utilizados na indústria de alimentos com o objetivo de tornar o alimento mais apetitoso. Todavia, o consumo de corantes artificiais está associado à diversos efeitos deletérios à saúde humana, tornando necessário o seu estrito monitoramento em alimentos. Os métodos de determinação de corantes em geral contam com etapas de preparo de amostras demoradas, fazem uso de solventes orgânicos e utilizam equipamentos onerosos na etapa de detecção. Uma alternativa são os métodos envolvendo sistema aquoso bifásico (SAB) com determinação espectrofotométrica. Neste trabalho, estudou-se o comportamento de partição dos corantes azul brilhante (AB), amarelo crepúsculo (AC), amarelo tartrazina (AT) e vermelho 40 (V40) nos SAB formados por L35 + eletrólitos de amônio [(NH₄NO₃, (NH₄)₂C₄H₄O₆ ou (NH₄)₂HPO₄)] + água, em diferentes comprimentos de linha de amarração (CLA) e valores de pH. Nas condições otimizadas: SAB L35 + tartarato de amônio + água, pH 6,0, CLA 48,11 % (m/m) a 25 °C, a porcentagem de extração foi de 99,7, 99,7, 99,3 e 99,8%, para os corantes AB, AC, AT e V40, respectivamente. O método desenvolvido foi aplicado para a determinação dos corantes AB, AC e AT em amostras autênticas de repositores hidroeletrólíticos das marcas Poweread mix de frutas, Gatorade tangerina e Poweread limão, respectivamente, bem como suco MID groselha contendo o corante V40. Foram obtidos limites de quantificação 0,135, 0,203, 0,364 e 1,20 mg kg⁻¹ para os corantes AB, AC, AT e V40, respectivamente. Para todos os corantes, as curvas analíticas apresentaram R² > 0,999. O método apresentou boa exatidão, variando de 0,11 a 2,71 % e boa precisão 0,3 a 1,6 %. Todas as amostras avaliadas apresentaram teores de corantes adequados com a legislação brasileira. O método foi eficiente em eliminar efeito de matriz. Foi possível o desenvolvimento de um método rápido, eficiente, fácil e de baixo custo para a determinação de corantes em amostras alimentícias, podendo ser utilizado em laboratórios de controle de qualidade da indústria de bebidas.

ABSTRACT

VELOSO, Anne Caroline Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June de 2018.
New environmentally safe method for determination of dyes in foods using ATPS.
Adviser: Maria do Carmo Hespanhol. Co-Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva.

Artificial dyes are widely used in the food industry with the aim of making the food more appetizing. However, artificial dye consumption is associated with several deleterious effects on human health, necessitating strict monitoring of food. The dye determination methods generally have time-consuming sample preparation steps, which use organic solvents and expensive equipment in the detection stage. An alternative is the methods involving aqueous two-phase system (ATPS) with spectrophotometric determination. In this work, the partitioning behavior of the brilliant blue (BB), sunset yellow (SY), yellow tartrazine (AT) and allura red 40 (AR-40) dyes were studied in ATPS formed by L35 + ammonium electrolytes [(NH₄NO₃, (NH₄)₂C₄H₄O₆ or (NH₄)₂HPO₄)] + water at different tie line lengths (TLL) and pH values. Under optimized conditions: ATPS L35 + ammonium tartrate + water, pH 6.0, TLL 48.11 % (w/w) at 25 ° C, the extraction percentage was 99.7, 99.7, 99.3 and 99.8 %, for the dyes AB, AC, AT and V40, respectively. The developed method was applied for the determination of the dyes BB, SY and TY in the authentic samples of hydroelectrolytic replenishers Poweread fruit mix, Gatorade tangerine and Poweread lemon, respectively. As well as in juice MID redcurrant, containing the AR-40 dye. It was obtained quantification limits of 0.135, 0.203, 0.364 and 1.20 mg kg⁻¹, respectively for dyes BB, SY, TY and AR-40. For all dyes, the analytical curves showed R² > 0.999. The method showed good accuracy, varying from 0.11 to 2.71 % and good precision from 0.3 to 1.6 %. It was obtained quantification limits of 0.135, 0.203, 0.364 and 1.20 mg kg⁻¹, respectively for dyes BB, SY, TY and AR-40. For all dyes, the analytical curves showed R² > 0.999. The method showed good accuracy, varying from 0.11 to 2.71 % and good precision from 0.3 to 1.6 %. All samples showed dyes levels suitable to Brazilian law. The method was efficient in eliminating matrix effect. It was possible to develop a fast, efficient, easy and low-cost method for the determination of dyes in food samples that can be used in laboratories of quality control of the beverage industry.

1. Introdução

A escolha de um alimento por parte do consumidor final leva inconscientemente em consideração a cor do produto. Esta tem o poder de conferir ao alimento um aspecto convidativo, neutro ou repugnante. Este apelo visual é amplamente explorado pela indústria de alimentos através do uso de corantes naturais e artificiais.

No Brasil, o teor de corantes em alimentos é legislado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que define corante como a substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (sólido, pastoso ou líquido) [1]. Ainda segundo a legislação brasileira, os corantes são divididos em: orgânico natural, orgânico sintético, orgânico sintético idêntico ao natural, inorgânico e caramelo [1]. Destaque para os corantes orgânicos sintéticos (artificiais) que possuem ampla utilização por apresentarem menor custo, maior poder tintorial, maior estabilidade às variações de pH, maior uniformidade na cor e menor contaminação microbiológica que os demais [2].

No Brasil, é permitido o uso de onze corantes sintéticos: amarelo tartrazina (AT), amarelo crepúsculo (AC), azorrubina, amaranto, ponceau 4R, eritrosina, vermelho 40 (V40), azul patente V, azul indigotina, azul brilhante (AB) e verde rápido [1]. Dentre estes, destaca-se os corantes AB, AC, AT e V40 cuja ingestão está associada a diversos efeitos deletérios à saúde humana [3-5], tornando necessário o monitoramento do seu teor em alimentos.

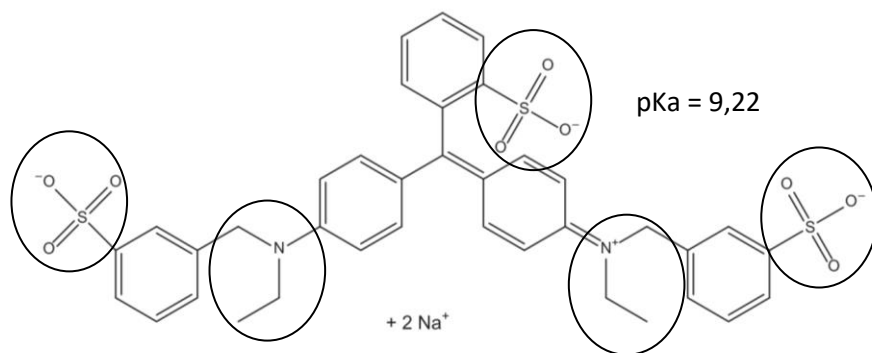
O azul brilhante (E133) é um corante aniônico da classe dos trifenilmetanos [6], cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 1a. Apresenta massa molar de $792,86 \text{ g mol}^{-1}$, máximo de absorção em aproximadamente 630 nm e solubilidade em água de $3,0 \times 10^4 \text{ mg L}^{-1}$ [7]. O amarelo crepúsculo (E 110), amarelo tartrazina (E 102) e vermelho 40 (E129) são

corantes aniônicos pertencentes à classe de azo compostos [6]. Classe esta, que tem como característica um grupamento azo (-N=N-) em sua estrutura molecular, geralmente ligado a duas estruturas aromáticas. Os corantes AC, AT e V40 apresentam máximos de absorção de 481, 426 e 505 nm e solubilidade em água de $1,9 \times 10^5$, $2,0 \times 10^5$ e $2,25 \times 10^5$ mg L⁻¹ [7], respectivamente. Esta variação de cores para a classe dos azo-compostos pode ser creditada ao grande número de grupamentos que podem se ligar às estruturas azo [8].

Os azo-corantes representam 70% dos corantes utilizados na indústria de alimentos [8]. Os corantes AC, AT, V40 apresentam massas molares de, respectivamente, 452,37, 534,35 e 496,42 g mol⁻¹ e suas estruturas são mostradas, respectivamente, na Figura 1b, 1c e 1d [9]. Os corantes artificiais não são encontrados na natureza, sua manufatura dá-se por síntese orgânica, tendo originalmente como matéria-prima alcatrão de hulha, e atualmente produtos purificados de petróleo [6]. Na Figura 1 estão destacados os grupos ionizáveis das moléculas dos corantes, bem como o valor correspondente de pKa. Dos corantes analisados, o V40 é o mais hidrofóbico além de apresentar o maior valor de pKa = 11,45. Já o AT é o mais hidrofílico, apresentando os menores valores de pKa = 2, 5 e 10,86.

Os corantes AB, AC, AT e V40 são frequentemente utilizados na fabricação de sucos, refrigerantes e repositores hidroeletrólíticos. Segundo a legislação brasileira, o teor destes corantes neste tipo de matriz é de 100 mg kg⁻¹ [1]. No Brasil, o método de análise recomendado para a determinação de corantes em alimentos faz uso de solventes nocivos, tais quais éter de petróleo, hidróxido de amônio e ácido clorídrico; além de apresentar um preparo de amostra demorado [7]. O preparo de amostra do método oficial baseia-se na adsorção dos corantes presentes na amostra em lã natural. A lã é lavada com éter de petróleo com o intuito de desengordurá-la, em uma etapa realizada sob aquecimento a 80 °C durante 1 hora. Além disso, as etapas de adsorção e dessorção do corante são realizadas com o acréscimo de ácido clorídrico e hidróxido de amônio, respectivamente [7]. A literatura reporta métodos que

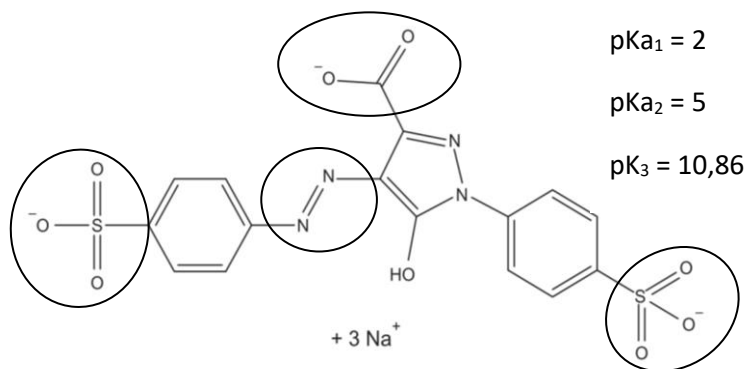
envolvem técnicas cromatográficas [9-12], eletroquímicas [13-16], espectrofotométricas [5,17] e por espectroscopia Raman [18]. Todavia, estes métodos, em geral, apresentam um preparo de amostra demorado, fazem uso de solventes danosos e requerem equipamentos sofisticados e de alto custo que necessitam de um elevado grau de treinamento por parte do operador, inviabilizando sua aplicação em laboratórios com poucos recursos [12-15,18,19].



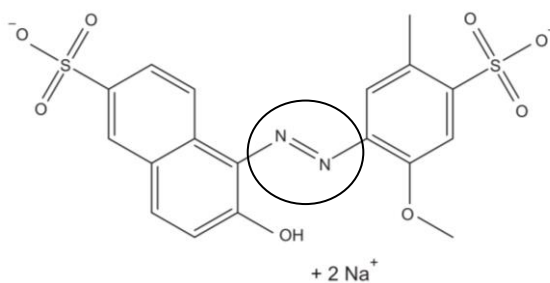
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 1. Estrutura molecular dos corantes (A) Azul Brilhante, (B) Amarelo Crepúsculo, (C) Amarelo Tartrazina e (D) Vermelho 40 [8].

Uma alternativa a esses métodos onerosos e nocivos são os métodos envolvendo sistemas aquosos bifásicos (SAB) com determinação espectrofotométrica. Pautados nos princípios da Química Verde [20], os SAB são compostos majoritariamente por água e por outros componentes atóxicos e de baixo custo [21]. Os SAB podem ser formados através da mistura de soluções aquosas de dois polímeros [22,23], um polímero e um eletrólito [24-27], ou ainda dois eletrólitos [28,29] em condições específicas de temperatura, pressão e concentração, resultando em duas fases líquidas límpidas e distintas [30]. A espectrofotometria figura como uma técnica relativamente simples e barata para a determinação de diversos compostos [5,17,31]. Esta técnica acoplada à rapidez e eficiência do SAB em extrair, separar e pré-concentrar analitos estratégicos em matrizes complexas, pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de métodos de determinação de corantes em amostras de alimentos [30].

O presente estudo objetivou conhecer o comportamento de partição dos corantes AB, AC, AT e V40 nos sistemas de L35 + nitrato de amônio ou tartarato de amônio ou fosfato de amônio dibásico + água. Bem como, desenvolver um método espectrofotométrico para a determinação destes corantes em amostras alimentícias utilizando SAB.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

O copolímero tribloco L35 com massa molar 1900 g mol^{-1} foi adquirido da Sigma-Aldrich do Brasil. Os eletrólitos tartarato de amônio e fosfato de amônio dibásico foram adquiridos da Vetec do Brasil e o nitrato de amônio da Sigma-Aldrich do Brasil. Os corantes AT e V40 foram adquiridos da Sigma-Aldrich do Brasil e o AB e AC foram adquiridos da Nova Aroma Corantes. O hidróxido de sódio e o ácido nítrico foram adquiridos da Vetec do

Brasil. Todos os reagentes utilizados apresentaram grau analítico, e foram utilizados como recebidos, sem qualquer etapa adicional de purificação. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (modelo: MilliQ, marca: Millipore Corp., país: Estados Unidos). As amostras autênticas de alimentos foram adquiridas no mercado local da cidade de Viçosa/MG, estando dentro do seu prazo de validade, conforma embalagem. O preparado em pó para refresco sabor groselha foi adquirido da marca MID, contendo o corante V40. Os repositores hidroeletrólíticos nos sabores: mix de frutas e limão foram adquiridos da marca Poweread Pro, enquanto o de sabor tangerina da marca Gatorade, contendo os corantes AB, AT e AC respectivamente.

2.2. Equipamentos

Todas as soluções foram preparadas com o auxílio de uma balança analítica (modelo: AY 220, marca: Shimadzu, incerteza de $\pm 0,0001$ g, país: Filipinas). A centrifugação foi realizada com o auxílio de duas centrifugas (modelo: Heraeus Megafure 11R, marca: Thermo Scientific, país: Alemanha e a modelo Excelsa Flex 400, marca: FANEM, país: Brasil). Para o controle de temperatura foi utilizado banho termostático (modelo: MQBTC 99-20, marca: Microquímica Equipamentos, incerteza de $\pm 0,1$ °C, país: Brasil). Soluções aquosas de HNO₃ e NaOH, pH 2,0 e 10,0, respectivamente, tiveram seus valores de pH medidos com o auxílio de um pHmetro (modelo: H1221, marca: Hanna Instruments, país: Brasil). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de absorção molecular na região do ultravioleta/visível (EAM) (modelo:UV-2550, marca: Shimadzu, país: Japão).

2.3. Preparo do sistema aquoso bifásico e montagem dos tubos de partição

Para a montagem do SAB foram medidas quantidades adequadas de copolímero tribloco L35, eletrólito de amônio e água deionizada pH 6,0, que é o pH da água deionizada

sem qualquer ajuste (ou solução de HNO₃, pH 2,0, ou solução de NaOH, pH 10,0), tendo como base os dados de equilíbrio líquido-líquido a 25 °C, mostrados na Tabela 1 [27]. Em todas as montagens, o tubo foi fechado, agitado manualmente por 3 min e deixado em repouso em banho termostático a 25,0 °C por 72 h. Após este período, as fases superior (FS) e inferior (FI) foram recolhidas e reservadas.

Tabela 1

Dados de equilíbrio líquido-líquido dos SAB utilizados.

Eletrólito	FS			FI			CLA / % (m/m)
	Água / g	L35 / g	Eletrólito / g	Água / g	L35 / g	Eletrólito / g	
Nitrato de amônio	28,26	26,40	45,34	1,29	41,64	57,07	30,98
	33,23	25,16	41,61	1,16	42,90	55,94	36,65
	36,11	24,66	39,23	0,95	45,82	53,23	41,04
	41,12	23,89	34,99	0,76	47,23	52,01	46,62
	43,49	23,98	32,53	0,01	49,40	50,59	50,37
	45,99	4,47	49,54	0,63	20,49	78,88	48,11
Tartarato de amônio	50,37	3,71	45,92	0,27	22,62	77,11	53,55
	53,32	3,45	43,23	0,64	24,68	74,68	56,80
	57,68	2,85	39,47	1,30	26,05	72,65	60,97
	60,47	2,41	37,12	0,48	28,79	70,73	65,53
	37,28	2,00	60,72	1,21	13,55	85,24	37,87
Fosfato de amônio dibásico	42,84	1,52	55,64	2,23	14,17	83,60	42,53
	46,19	1,28	52,53	1,32	16,52	82,16	47,39
	49,38	1,08	49,54	1,22	17,97	80,81	51,04
	53,07	0,85	46,08	1,11	19,43	79,46	55,18

Para os experimentos de partição, em um tubo foram adicionados 0,500 g de FS, 3,500 g de FI e 0,100 g de solução aquosa concentrada de corante (para as amostras) ou 0,100 g de água pH 6,0 (para os brancos). Utilizou-se a concentração de 4100 mg kg⁻¹ para os corantes AB, AC e AT. Para o V40, foi utilizada uma concentração de 1,628 x 10⁴ mg kg⁻¹. Após as pesagens, o tubo foi então fechado, agitado manualmente por 3 min, levado a centrifuga por 5 min 9520 g, e posteriormente acondicionado em banho termostático a 25,0 °C por 72 horas. As fases superior e inferior foram recolhidas em separado e diluídas de modo apropriado para posterior determinação no EAM. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Experimentos realizados em condição de equilíbrio termodiâmico.

2.3.1. Influência da concentração do corante na razão de partição (K)

Em um tubo foram adicionados 0,500 g de FS e 3,500 g de FI do SAB L35 + tartarato de amônio + água, CLA 48,11% (m/m), 25 °C, pH 6,0 (preparado como descrito no item 2.3) e 0,100 g de solução aquosa concentrada de corante (para as amostras) ou 0,100 g de água pH 6,0 (para os brancos). Para a obtenção de distintas concentrações finais do corante no SAB, de modo a se avaliar uma faixa de concentração do corante e seu efeito na razão de partição, foram utilizadas seis diferentes soluções aquosas concentradas de cada corante. Para o AB as soluções concentradas variaram de 1617 a 2,629 x 10⁴ mg kg⁻¹, para o AC variaram de 1143 a 1,484 x 10⁴ mg kg⁻¹, para o AT 1340 a 1,787 x 10⁴ mg kg⁻¹ e para o V40 de 1219 a 1,628 x 10⁴ mg kg⁻¹. A amplitude da faixa de concentração do estudo foi escolhida de tal forma a abranger o limite máximo preconizado para corantes em bebidas, que é de 100 mg kg⁻¹[32], bem como concentrações superiores e inferiores. Exceto pelas concentrações finais dos corantes utilizadas, o procedimento para a montagem dos tubos de partição foi realizado conforma descrito no item 2.3. Experimentos realizados em condição de equilíbrio

termodiâmico.

2.3.2. Efeito da composição do SAB na partição dos corantes

Inicialmente foram montados os SAB formados por L35 + tartarato de amônio + água, pH 6,0, nos CLA 48,11, 53,55, 56,80, 60,97 e 65,53% (m/m); L35 + nitrato de amônio + água, pH 6,0, nos CLA 30,98, 36,65, 41,04 e 50,37% (m/m) e os SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, pH 6,0, nos CLA 37,87, 42,53, 47,39, 51,04 e 55,18% (m/m) conforme descrito no item 2.3, tendo como base as composições já descritas na literatura [27] e mostradas na Tabela 1. Após equilíbrio, as FS e FI foram recolhidas em separado e reservadas. A montagem dos tubos de partição foi realizada como descrito no item 2.3. Experimentos realizados em condição de equilíbrio termodiâmico.

2.3.3. Efeito do pH sobre a razão de partição

Inicialmente foram preparados os SAB L35 + tartarato de amônio + água, CLA 48,11% (m/m); SAB L35 + nitrato de amônio + água, CLA 46,62% (m/m) e o SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, CLA 47,39% (m/m). Foram escolhidas condições nos quais os valores de CLA fossem próximos a 47 % (m/m), permitindo a comparação entre os resultados. A montagem foi realizada como descrito no item 2.3, tendo como base as concentrações já descritas na literatura [27] e mostradas na Tabela 1. Os SAB foram montados de três formas: com água deionizada pH 6,0 ou com solução de HNO₃ pH 2,0, ou com solução de NaOH pH 10,0. Este recurso experimental, sugerido por Rogers e colaboradores [33], minimiza o gradiente de pH entre as fases. Após o equilíbrio, as FS e FI foram recolhidas em separado e reservadas. A montagem dos tubos de partição foi realizada como descrito no item 2.3. Experimentos realizados em condição de equilíbrio termodiâmico.

2.3.4. Efeito do ânion formador do SAB sobre a razão de partição

Inicialmente, foram montados os SAB L35 + tartarato de amônio + água, nos CLA 48,11; 53,55; 56,80; 60,97 e 65,53% (m/m); SAB L35 + nitrato de amônio + água, nos CLA 30,98; 36,65; 41,04; 46,62 e 50,37% (m/m) e o SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, nos CLA 37,87; 42,53; 47,39, 51,04 e 55,18% (m/m), todos em pH 6,0. A montagem foi realizada como descrito no item 2.3, tendo como base as concentrações já descritas na literatura [27]. Após equilíbrio, as FS e FI foram recolhidas em separado e reservadas. A montagem dos tubos de partição foi realizada como descrito no item 2.3. Experimentos realizados em condição de equilíbrio termodinâmico

2.4. Determinação da razão de partição (K)

Para a determinação da K cada fase do SAB contendo corante (ou não, branco) foi diluída apropriadamente e levada ao EAM para medida da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção (λ) de cada corante. Os λ s definidos para o AB, AC, AT e V40 foram 629, 481, 426 e 504 nm, respectivamente. A K foi calculada pela equação 1 [34]:

$$K = \frac{C_C^{FS}}{C_C^{FI}} \quad (1)$$

onde C_C^{FS} e C_C^{FI} são a concentração do corante na FS e FI, respectivamente.

Experimentos realizados em condição de equilíbrio termodinâmico

2.5. Determinação da porcentagem de extração dos corantes

Para o desenvolvimento de um método de extração, é imprescindível conhecer a quantidade de analito particionada para a fase de interesse. A eficiência da partição de um analito pode ser calculada através da porcentagem de extração (%E), expressa pela equação 2 [34]:

$$\%E = \left(\frac{K}{1 + K} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde %E é a porcentagem de extração e K é a razão de partição.

2.6. Determinação de corante nas amostras autênticas

A concentração real dos corantes nas amostras de bebidas foi obtida pelo método de adição padrão. Avaliou-se também a concentração dos corantes sem qualquer etapa de preparo de amostra (método direto) com a finalidade de verificar o efeito de matriz, assim como pelo método do SAB. Foram utilizadas as amostras dos repositores hidroeletrólitos Powerade sabor mix de frutas, contendo o corante AB, Powerade sabor limão, contendo o corante AT, Gatorade sabor tangerina contendo o corante AC e o preparado sólido para refresco MID sabor groselha, contendo o corante V40. Os experimentos envolvendo amostras autênticas foram realizados fora do equilíbrio termodinâmico.

2.6.1. Método de adição padrão

Na curva de adição padrão, foram medidas quantidade adequadas de amostra (Powerade sabor mix de frutas, Gatorade sabor tangerina, Powerade sabor limão e suco MID sabor groselha), solução concentrada de corante e água deionizada pH 6,0, de tal forma a se obter pontos de mesma massa final, cada vez mais concentrados em corante, e de mesma diluição final da amostra. Foram utilizadas soluções concentradas dos corantes AB, AC, AT e V40 nas concentrações de 146,7; 256,7; 230,3; 291,7 mg kg⁻¹, respectivamente. A faixa de concentração das curvas variou de 0 a 4,25; 0 a 13,8; 0 a 11,6 e 0 a 11,2 mg kg⁻¹ para o AB, AC, AT e V40, respectivamente. As curvas foram analisadas por EAM, nos comprimentos de onda de 629, 481, 426 e 504 nm para os corantes AB, AC, AT e V40, respectivamente. A concentração real do corante na amostra foi obtida por extrapolação da curva de adição

padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6.2. Método direto

No método direto as amostras de bebidas contendo AC e V40 foram diluídas em água de, respectivamente, 2 e 120 vezes, e, posteriormente, levadas a análise por EAM nos comprimentos de onda de respectivamente 481 e 504 nm. Já as amostras contendo AB e AT foram analisadas diretamente, nos comprimentos de onda de respectivamente 629 e 426 nm, sem a etapa de diluição. Para a quantificação do teor de corantes, foi construída uma curva dos corantes em água, com faixa linear variando de 0,135 a 4,62; 0,203 a 14,8; 0,364 a 14,3 e 1,20 a 13,3 mg kg⁻¹ para o AB, AC, AT e V40, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6.3. Método SAB

Inicialmente, testou-se a formação de novos sistemas compostos por 0,0485 g de L35, 0,0864 g de sal e 0,361 g de amostra, objetivando a formação de SAB com fases distintas e sem a formação de precipitado. Após adequação de concentrações, foram obtidos novos SAB, cuja composição é mostrada na Tabela 2. Foram utilizadas as amostras dos repositores hidroeletrólitos Powerade sabor mix de frutas, contendo o corante AB, Powerade sabor limão, contendo o corante AT, Gatorade sabor tangerina contendo o corante AC e o preparado sólido para refresco MID sabor groselha, contendo o corante V40. O suco MID foi diluído 40 vezes em água deionizada para o preparo do SAB; as demais amostras foram utilizadas puras.

Tabela 2

Composição global do SAB formado por L35 + tartarato de amônio + amostra.

amostra	L35 / % (m/m)	tartarato de amônio / % (m/m)	amostra / % (m/m)	corante
Powerade sabor mix de frutas	17,27	12,94	69,79	AB
Powerade sabor limão	14,96	13,04	72,00	AT
Gatorade sabor tangerina	5,94	14,53	79,53	AC
MID sabor groselha ^a	13,20	13,19	73,61	V40

^a Diluído 40 vezes em água.

Na formação do SAB, em um tubo foram medidas quantidades adequadas de L35, tartarato de amônio e amostra a fim de obter uma massa total de 0,5 gramas com a composição global indicada na Tabela 2. Em seguida, o tubo foi fechado, agitado manualmente durante 3 min e levado a centrifugação durante 10 min a 4116 g, de tal forma que as duas fases estivessem límpidas e separadas. Condição de tempo e rotação previamente otimizada. Após este tempo, a FS formada foi imediatamente recolhida com o auxílio de uma seringa e diluída de 3, 10, 2 e 10 vezes para os SAB contendo AB, AC, AT e V40, respectivamente, com posterior determinação no EAM. Para garantir a reprodutibilidade dos experimentos, já que o experimento foi realizado fora do equilíbrio termodinâmico, as etapas foram realizadas sempre da mesma forma, e a FS sempre recolhida e diluída imediatamente após a etapa de centrifugação. Para a determinação da concentração do corante, foi realizada uma curva em água, conforme descrito no item 2.5.2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.7. Análise estatística

Todos os resultados foram avaliados estatisticamente pela análise de variância e pelo teste Tuckey de comparação de médias. O tratamento estatístico foi feito no programa Excel, com o auxílio do programa Action. No tratamento de dados, foi considerado um intervalo de confiança de 95% e um nível de significância de 0,05.

3. Resultados e discussão

3.1. Efeito da concentração do corante sobre a razão de partição

A K expressa a distribuição de uma única espécie entre as fases. Em uma condição de diluição infinita, em que apenas uma espécie está presente, o valor da K independe da concentração da espécie [30]. Com o intuito de verificar esta assertiva, realizou-se um estudo de partição dos corantes AB, AC, AT e V40 em uma faixa de concentração de respectivamente, 39,00 a 641,0; 28,00 a 361,0; 32,00 a 436,0 e 29,00 a 397,0 mg kg⁻¹ no SAB L35 + tartarato de amônio + água a 25,0 °C, pH 6,0 (valor de pH aproximado da água deionizada) e no comprimento de linha de amarração (CLA) 48,11 % (m/m). O CLA 48,11 % (m/m) é comum a todos os SAB.

A Figura 2 mostra os valores médios da K obtidos em função da concentração do corante. Para todos os corantes o valor da K independe de suas concentrações, ou seja, a K mantém-se praticamente constante por toda a faixa de concentração de corante estudada. Este perfil sugere que para todos os corantes apenas uma espécie está sendo particionada, ou seja, não há formação de aglomerados.

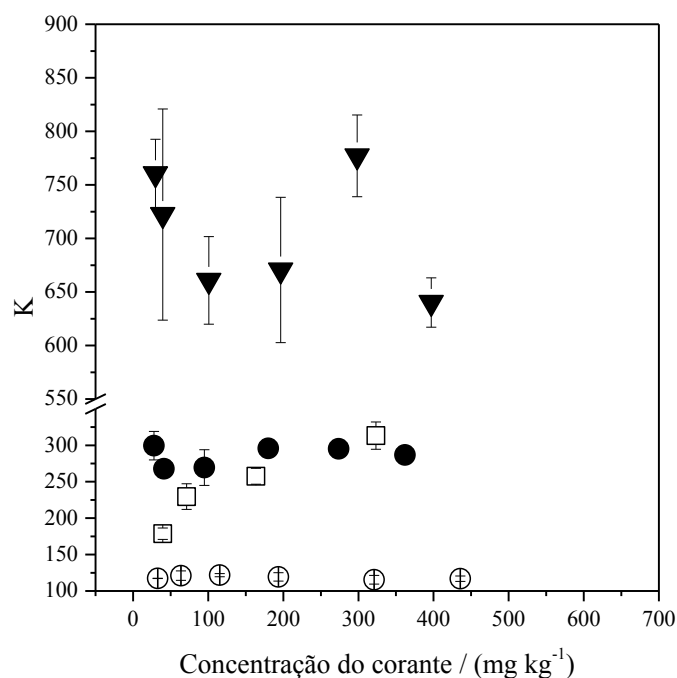


Figura 2. Razão de partição (K) em função da concentração dos corantes AB (□), AC (●), AT (⊕) e V40 (▼) no SAB L35 + tartarato de amônio + água a 25,0 °C e CLA 48,11% (m/m), pH 6,0.

Na análise individual dos corantes AC, AT e V40 não houve diferença significativa entre as médias dos valores de K para a faixa de concentração estudada, tendo como base os testes estatísticos de Tukey e ANOVA. Para o AB, houve diferença significativa. Para que o valor de K varie em função da concentração do corante, deve haver alguma mudança na estrutura do analito (formação de aglomerados, por exemplo), o que necessariamente alteraria o perfil típico do seu espectro. Na Figura 3 são mostrados os espectros do AB na FS e na FI em toda a faixa de concentração estudada (39,00 a 641,0 mg kg⁻¹) em comprimento de onda variando de 190 a 900 nm. Bem como o espectro do AB em água.

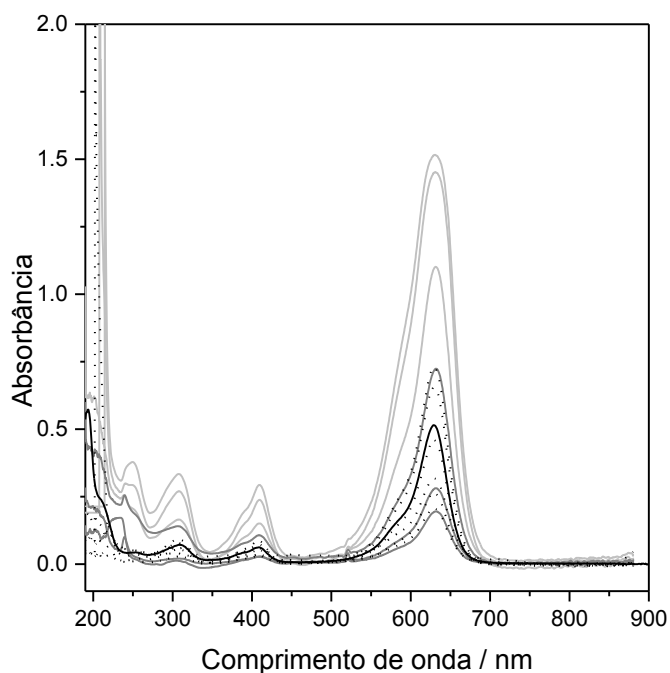


Figura 3. Espectros do corante AB na fase superior (...) na fase inferior (—) e em água (---) em faixa de comprimento de onda de 190 a 900 nm e concentrações finais do corante variando de 39 a 641 mg kg⁻¹.

Como mostrado na Figura 3, em toda a faixa de concentração estudada, o perfil do espectro do corante AB é o mesmo na FS, na FI e em água, apresentando em todos máximo de absorção em 629 nm, característico do AB. Este resultado, indica que em toda a faixa de concentração estudada (39 a 641 mg kg⁻¹) o mesmo analito está sendo particionado. A mesma comparação foi realizada para os demais corantes, e em todos, foi observado o mesmo perfil em FS, FI e em água.

Escolheu-se para os próximos experimentos de partição a concentração final no SAB igual a 100 mg kg⁻¹ para os corantes AB, AC, AT (para a obtenção desta concentração final no SAB, utilizou-se uma solução estoque de corante de 4100 mg kg⁻¹). Esta concentração corresponde ao máximo de corante permitido pela legislação brasileira em bebidas não alcoólicas [32]. Entretanto, nos experimentos de partição utilizando o corante V40, foi

utilizada uma concentração final igual a 397,0 mg kg⁻¹ (para a obtenção desta concentração final no SAB, utilizou-se uma solução estoque de corante de 1,628 x 10⁴ mg kg⁻¹). Isto porque a partição deste corante é muito alta para a FS. Assim não era possível medir a absorvância do V40 na FI do SAB usando a concentração de 100 mg kg⁻¹.

3.2. Efeito da composição do SAB sobre a partição dos corantes

O CLA é um importante parâmetro termodinâmico que expressa a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases em equilíbrio. Este pode ser calculado em função da composição das fases, conforme mostrado na equação 3:

$$CLA = \left[(C_M^{FS} - C_M^{FI})^2 + (C_E^{FS} - C_E^{FI})^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

em que, C_M^{FS} e C_M^{FI} são as concentrações, expressas em % (m/m), da macromolécula na FS e na FI, respectivamente. Enquanto, C_E^{FS} e C_E^{FI} são as concentrações, expressas em % (m/m), do eletrólito na FS e na FI, respectivamente.

Vale destacar que quanto maior o valor de CLA, maior é a diferença na concentração dos componentes das fases, por isso, são mais distintas as propriedades termodinâmicas intensivas das fases. Isto, em geral, aumenta a partição do analito para uma das fases do SAB [30]. Para verificar se isto se dava com os corantes em estudo, inicialmente, particionou-se os corantes AB, AC, AT e V40 no SAB L35 + tartarato de amônio + água a 25,0 °C e nos CLA 48,11 a 65,53 % (m/m), pH 6,0. Os resultados são mostrados na Figura 4.

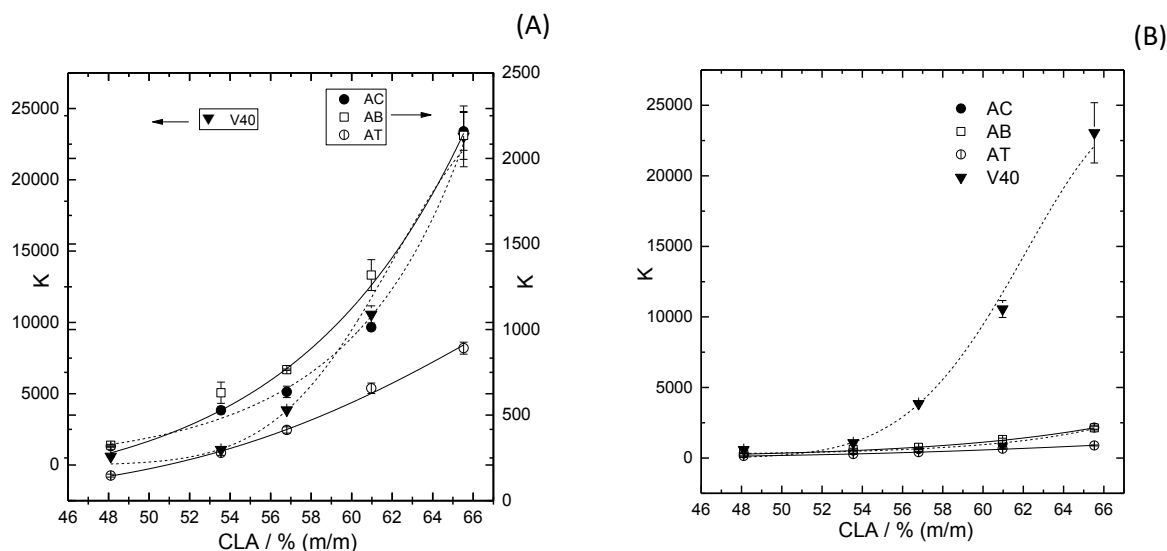


Figura 4. Variação da K dos corantes AB (□), AC (●), AT (⊙) e V40 (▼) em função do CLA no SAB L35 + tartarato de amônio + água, 25,0 °C, pH 6,0.

Como mostrado na Figura 4, todos os corantes particionaram-se preferencialmente para a fase rica em macromolécula (FS), tendo em vista que o valor da K foi maior que a unidade. Para o CLA de 48,11 % (m/m) o valor médio de K para os corantes AB, AC, AT e V40 foi de respectivamente $323,4 \pm 5,6$; $314,4 \pm 6,0$; $146,4 \pm 8,4$ e $599,2 \pm 51,5$. Além disso, os valores da K aumentaram com o aumento do valor do CLA, tendo em vista que no CLA 65,53 % (m/m) os valores de K para o AB, AC, AT e V40 foram, respectivamente, 2134 ± 139 ; 2158 ± 110 ; $891,2 \pm 35,0$ e $2,305 \times 10^4 \pm 0,213 \times 10^4$. O aumento do valor médio de K com o aumento do CLA pode ser creditado ao fato de que com o aumento do comprimento de linha de amarração, as composições das fases ficarão cada vez mais distintas, bem como haverá um aumento na concentração do componente com o qual o corante interage mais fortemente, logo, como o aumento de CLA ocorre um aumento de K. Este mesmo comportamento foi observado no trabalho de Mageste e colaboradores [35], onde o corante natural carmim particionou-se, preferencialmente, para a FS, em SAB formados por (L35 ou poli(óxido de etileno, PEO) + (sulfato de lítio, hidróxido de sódio ou sulfato de sódio) + água.

No trabalho de Alvarenga e colaboradores [36], o mesmo comportamento de partição foi observado para o corante têxtil amarelo remazol, nos sistemas formados por PEO + sulfato de magnésio + água. No trabalho de Borges e colaboradores [37], a partição também ocorreu, preferencialmente, para a FS, quando os corantes têxteis azul de metileno, verde malaquita e vermelho reativo 195 foram particionados no SAB formado por PEO + tartarato de sódio + água. No trabalho de Mageste e colaboradores [31], o corante natural norbixina foi, preferencialmente, particionado para a FS de SAB formados por (PEO, poli(óxido de propileno), PPO, ou L35) + (tartarato ou succinato de sódio) + água.

O processo de partição de um soluto pode ser explicado através do modelo desenvolvido por Johansson e colaboradores [38], o qual foi baseado na teoria de Flory-Huggins [39,40]. Segundo este modelo, descrito pela equação 4, desconsiderando as forças entrálpicas, a partição ocorre apenas devido às contribuições entrópicas. Assim, a partição do soluto entre as fases ocorre devido à diferença de densidade numérica entre as fases (n/V). Neste caso, o soluto será, preferencialmente, particionado para a fase de maior densidade numérica, uma vez que nesta fase o soluto poderia se distribuir espacialmente em um maior número de configurações, aumentando a entropia configuracional, por consequência, aumentando a entropia, e diminuindo a energia livre de Gibbs. No SAB o componente majoritário em ambas as fases é a água, logo, a quantidade de água impactará na densidade numérica das fases e, conseqüentemente, no comportamento de partição do soluto.

$$\ln K_A = \frac{M_A}{\rho} \left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (4)$$

Em que K_A é a razão de partição do analito, M_A é a massa molar do analito particionado, n^{FS} e n^{FI} é a quantidade total de moléculas na fase superior e inferior respectivamente, ρ é o número de sítios por unidade de volume de todo o sistema bifásico e

V^{FS} e V^{FI} são o volume da fase superior e inferior respectivamente [38].

Na Tabela 3 estão apresentadas as diferenças da concentração de água entre as fases inferior e superior do SAB L35 + tartarato de amônio + água. O maior conteúdo de água e, conseqüentemente, a maior densidade numérica é encontrada na FI, de fato, de modo geral, para SAB do tipo polímero + eletrólito a maior densidade numérica é encontrada na FI [21]. Logo, para estes sistemas, desconsiderando-se qualquer contribuição entálpica, a partição do corante se daria preferencialmente para a FI, o que não ocorreu nos sistemas utilizados neste trabalho e nem em outros de partição de corante utilizando SAB [31,35-37]. Logo, os resultados obtidos sugerem que a partição é entálpicamente dirigida.

Tabela 3

Diferença na concentração de H₂O, % (m/m), entre FI e FS do SAB formado por L35 + tartarato de amônio + H₂O a 25,0 °C.

CLA / % (m/m)	$\Delta[\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}_2\text{O}]_{\text{FI}} - [\text{H}_2\text{O}]_{\text{FS}} / \% \text{ (m/m)}$
48,11	29,34
53,35	31,19
56,80	31,45
60,97	33,18
65,53	33,61

A contribuição entálpica do processo de partição descrita pelo modelo de Johansson e colaboradores pode ser representada pela equação 5 [21]:

$$\ln K_A = -\frac{M_A}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) w_{iA} - \sum_{i=1(i \neq A)}^{m-1} \sum_{j=i+1(j \neq A)}^m (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (5)$$

Em que M_A é a massa molar do analito particionado, R é a constante dos gases, T é a temperatura em Kelvin, ϕ_i^{FS} e ϕ_i^{FI} são as frações volumétricas do componente i respectivamente nas fases superior e inferior, W_{ij} é a energia de formação do par entre os componentes i e j .

A equação 5 apresenta dois somatórios, o primeiro, leva em consideração a interação entre o soluto particionado e os componentes formadores do SAB. Quanto mais o soluto interagir com um dos componentes do SAB, menos positiva será a contribuição entálpica, levando então à diminuição da energia livre de Gibbs. Pode-se inferir então que o soluto preferencialmente será particionado para a fase mais concentrada no componente em que sua interação é mais intensa. Tendo em vista os resultados, todos os corantes interagem mais fortemente com a macromolécula, uma vez que sua partição dá-se preferencialmente para a fase mais concentrada neste componente. Além disso, quanto maior for a diferença de composição entre as fases, mais intensa será a interação soluto–componente formador [21]. Uma vez que, quanto maior o CLA, maior a concentração da macromolécula na FS, mais intensa é a interação corante-macromolécula, aumentando assim o valor da K com o aumento do CLA. Todos os corantes apresentaram aumento do valor de K com o aumento do valor do CLA, como visto na Figura 4. Todavia, os valores da K de cada corante, para um mesmo CLA são diferentes. Esta diferença de comportamento entre os corantes pode ser creditado às interações específicas entre as estrutura dos corantes (Figura 1) e os componentes formadores do SAB [37]. Dentre os corantes avaliados, o V40 é o mais hidrofóbico, devido à sua maior estrutura, além de apresentar um grupo naftaleno e um grupamento metila a mais que o AC. O AC e o AB apresentam hidrofobicidades semelhantes. Já o AT é a menor molécula dentre os corantes estudados, bem como a menos hidrofóbica. Logo, haverá uma maior interação entre os corantes mais hidrofóbicos e a FS que apresenta esta característica, resultando em maiores valores de K . Por este motivo, o V40 apresenta os maiores valores de K , seguido por AC e

AB, que apresentam valores semelhante e por último o AT.

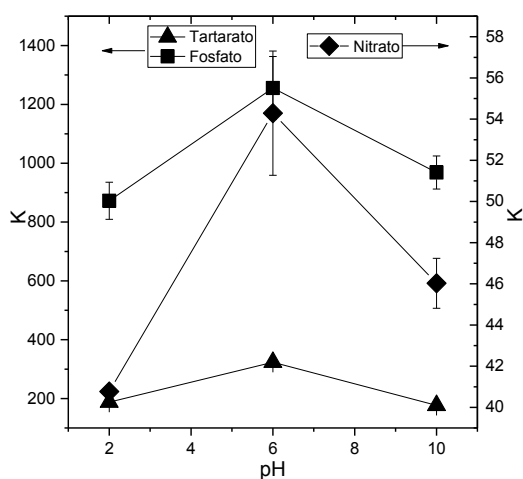
No segundo somatório da equação 5, são desconsideradas as interações soluto-componentes formadores do SAB. Somente é levado em consideração o conteúdo energético de cada fase, assim como a energia associada à transferência do soluto entre as fases. Este termo independe da natureza do soluto particionado. Quando o soluto transfere-se de uma fase para a outra, ele libera o volume no qual estava alojado dentro da fase, permitindo a interação entre os componentes da fase neste espaço, antes ocupado por ele. Uma vez alojado na fase para a qual se deslocou, o soluto formará uma cavidade, na qual ficará acomodado. Nesta cavidade formada, não haverá interação entre os componentes das fases, uma vez que esta se encontra agora ocupada pelo soluto [21].

3.3. Efeito do pH sobre a razão de partição

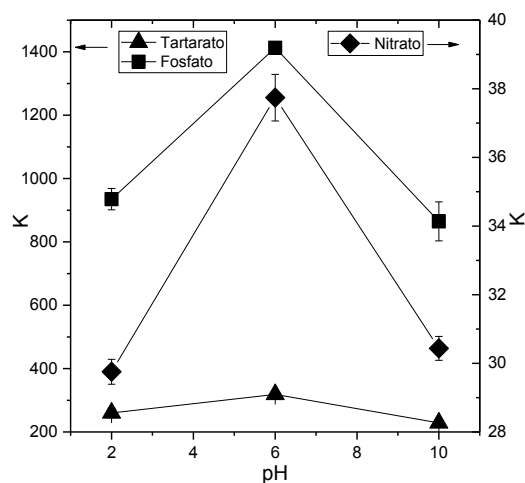
A partição de um analito pode ser influenciada por diversos fatores, como por exemplo, o pH do meio [30]. Para verificar a influência do pH, foi realizada a partição dos corantes AB, AC, AT e V40 no SAB L35 + (nitrato de amônio, tartarato de amônio ou fosfato de amônio dibásico) + água em CLA ~ 47 % (m/m) (comum a todos os SAB) e nos valores de pH 2,0, 6,0 e 10,0.

A Figura 5 mostra a razão de partição dos corantes em função do pH. Todos os corantes, independente do valor de pH, particionam-se preferencialmente para a FS em todos os SAB, tendo em vista que a K é maior que a unidade. No SAB L35 + tartarato de amônio + água, para o corante AB, os valores de K são de $187,9 \pm 7,8$; $323,2 \pm 5,6$ e $176,6 \pm 7,4$ para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AC, os valores de K são de $260,1 \pm 15,2$; $318,4 \pm 6,0$ e $228,7 \pm 10,1$ para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AT, os valores de K são de $112,3 \pm 8,7$; $146,3 \pm 8,4$ e $110,8 \pm 3,4$ para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. E para o V40, os valores de K são de $497,7 \pm 39,4$;

599,2 ± 51,5 e 508,8 ± 28,1 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. No SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, para o corante AB, os valores de K são de 872,3 ± 62,9; 1255 ± 107 e 968,5 ± 56,2 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AC, os valores de K são de 935,0 ± 33,8; 1412 ± 19 e 864,8 ± 61,5 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AT, os valores de K são de 468,1 ± 18,1; 650,4 ± 55,6 e 476,3 ± 15,3 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. E para o V40, os valores de K são de 4449 ± 185; 1,155 x 10⁴ ± 0,0904 x 10⁴ e 5299 ± 105 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. No SAB L35 + nitrato de amônio + água, para o corante AB, os valores de K são de 40,77 ± 0,02; 54,29 ± 3,02 e 46,02 ± 1,21 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AC, os valores de K são de 29,75 ± 0,36; 37,04 ± 0,68 e 30,44 ± 0,35 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. Para o AT, os valores de K são de 4,283 ± 0,10; 3,450 ± 0,051 e 3,373 ± 0,123 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente. E para o V40, os valores de K são de 96,91 ± 3,72; 143,5 ± 2,5 e 109,5 ± 3,2 para os valores de pH de 2,0, 6,0 e 10,0, respectivamente.



A



B

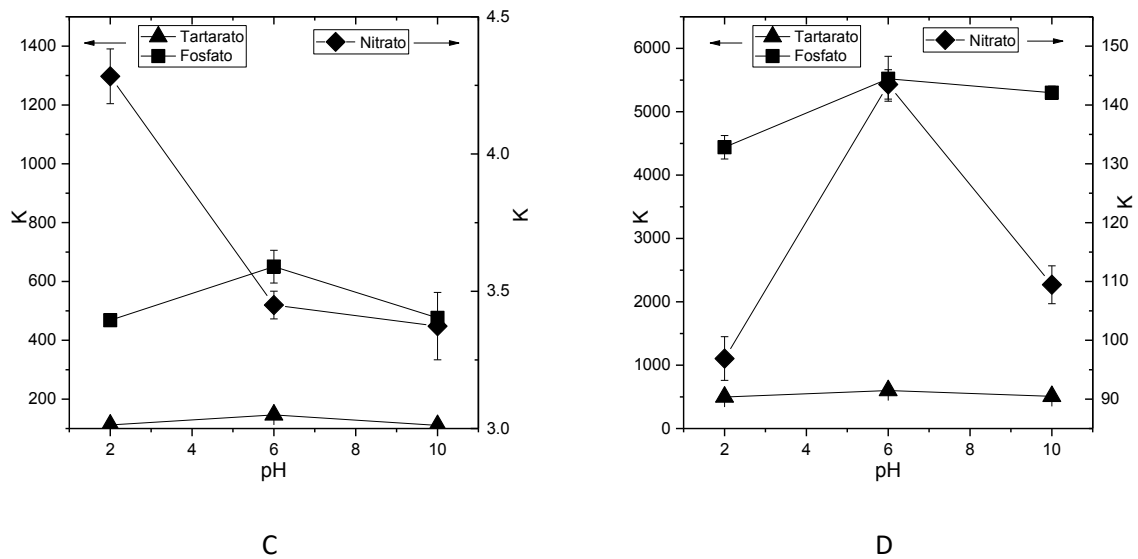


Figura 5. Variação da K dos corantes: (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 no SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, em CLA ~ 47 % (m/m) e nos pHs 2,0, 6,0 e 10,0. (◆) nitrato de amônio, (▲) tartarato de amônio e (■) fosfato de amônio dibásico.

Em todos os SAB, o maior valor da razão de partição foi observado no pH 6,0 para os corantes AB, AC, AT e V40. Neste valor de pH em todos os SAB avaliados os eletrólitos formadores do sistema estarão dissociados, logo, haverá cargas negativas tanto na FS quanto na FI. Em pH 6,0 os corantes AB, AC e V40 estão em sua forma neutra logo, não sofrerão repulsão das cargas negativas presentes na FS, resultando em um maior valor de partição. Quando comparada à condição de pH 6,0, em pH 2,0 haverá a presença de íons NO_3^- no meio, oriundos do ácido nítrico, desfavorecendo a partição. Já em pH 10,0 haverá uma maior concentração de cargas negativas oriundas do hidróxido de sódio, também desfavorecendo a partição.

Apenas o corante AT que no SAB L35 + nitrato de amônio + água apresenta um maior valor de K no pH 2,0. Este comportamento pode ser explicado levando-se em consideração tanto a estrutura do AT quanto as características do SAB L35 + nitrato de amônio + água. O processo de partição é o resultado de contribuições tanto eletrostáticas quanto hidrofóbicas. O AT apresenta dois grupos sulfônicos, um grupo carboxílico e um grupo azo, sendo os

respectivos $pK_a = 2, 5$ e $10,86$ [41]. Dentre os corantes avaliados é a molécula mais hidrofílica, logo, a que terá menor afinidade, dentre os corantes avaliados, com a FS. No pH igual a 2,0, a molécula encontra-se parcialmente protonada, estando o seu grupo carboxílico 50% ionizado. O SAB formado por nitrato apresenta uma alta concentração de eletrólito na FS (23,89 %), logo, quanto menor a carga negativa da molécula menos repulsão haverá entre a molécula e os ânions presentes na FS. No pH 2,0, o AT estará menos ionizado que nos valores de pH 6,0 e 10,0, logo, nesta condição haverá uma menor repulsão com consequente maior partição. Este comportamento não é observado nos demais SAB porque o conteúdo de eletrólito na FS é menor e igual a 4,47 e 1,28% para os SAB L35 + tartarato de amônio + água e L35 + fosfato de amônio dibásico + água, respectivamente. Logo, o efeito repulsivo não será tão pronunciado.

Os outros corantes são mais hidrofóbicos que o AT, logo serão mais atraídos para a FS, rica em macromolécula, e a contribuição de repulsão eletrostática será menos representativa no processo de partição. O corante AB apresenta três grupos sulfônicos e dois grupos amino e o $pK_a = 9,22$ [41]. O AC apresenta apenas dois grupos sulfônicos e um grupo azo e o $pK_a = 9,20$ [41]. Além disso, por ele ter um anel naftaleno ele é mais hidrofílico que o AB. O V40 apresenta dois grupos sulfônicos, um grupo azo e $pK_a = 11,45$ [42]. Ele possui um anel naftaleno e um grupamento metila a mais que o AC, sendo o corante mais hidrofóbico dos estudados neste trabalho. Logo, os corantes AB, AC e V40 não estarão desprotonados em pH 2,0.

O pH 6,0 foi escolhido como valor de trabalho por dois motivos, o primeiro é que de modo geral o valor de K foi maior. O segundo é que não é necessário nenhum ajuste de pH tornando o método mais simples e verde para a determinação de corantes, ou seja, não é necessário o uso de reagentes alcalinos ou ácidos. O fato do valor da K variar pouco em uma ampla faixa de valores de pH, indicando a robustez do método.

3.4. Efeito do ânion formador do SAB sobre a razão de partição

A partição de um soluto pode ser influenciada pela natureza dos componentes formadores do SAB [30], como por exemplo, o tipo de ânion. Para verificar esta influência, os corantes AB, AC, AT e V40 foram particionados no SAB L35 + (nitrato de amônio, tartarato de amônio ou fosfato de amônio dibásico) + água a 25,0 °C, pH 6,0.

A Figura 6 mostra a razão de partição de cada corante em função do CLA para os diferentes SAB, cuja diferença entre eles é o tipo de ânion formador (tartarato, nitrato ou hidrogenofosfato). Os corantes em todos os SAB apresentarem valores de K maiores que a unidade e aumentarem com o aumento do CLA. A única exceção é corante AT, que no SAB L35 + nitrato de amônio + água, que apresentou valores médios de K praticamente constantes com o aumento de CLA. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que o AT é a molécula mais hidrofílica dentre os corantes avaliados, logo será menos atraído para a FS, que apresenta características hidrofóbicas. E como em pH 6,0 apresentara carga negativa, sofrerá mais influência das forças repulsivas presentes na FS, geradas pelas cargas negativas oriundas da dissociação do eletrólito formador do SAB. No sistema de nitrato, a concentração de eletrólito na FS em todos os CLA é alta e praticamente constante, variando de 26,40 a 23,98 % (m/m). Logo o aumento da concentração de macromolécula com o aumento do CLA, e seu efeito positivo no processo de partição, é praticamente compensado pela alta concentração de eletrólito na FS, logo, mesmo com o aumento de CLA os valores médios de K permanecem praticamente constantes.

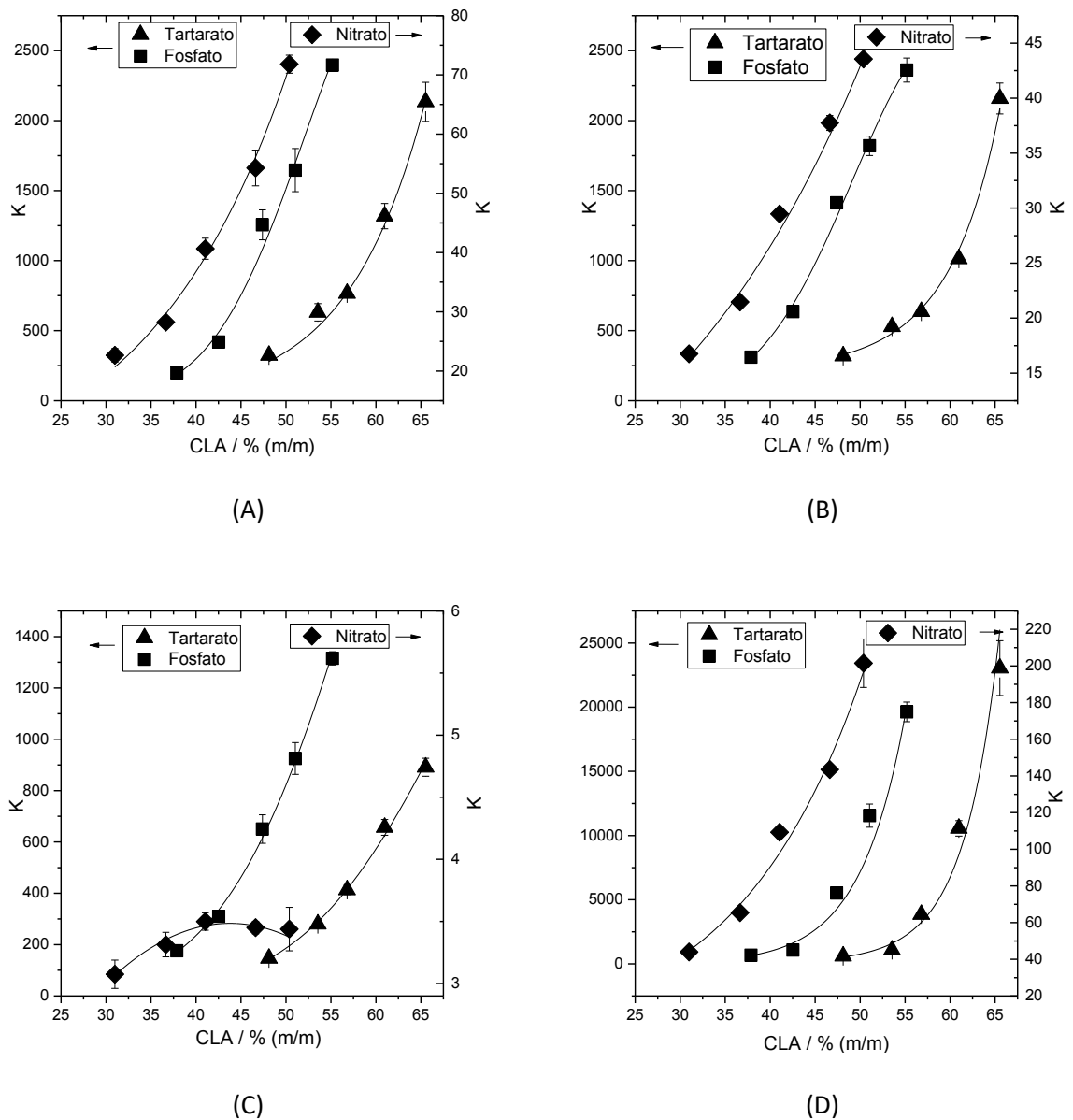


Figura 6: Variação dos valores médios da K dos corantes (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 no SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, pH 6,0. (♦) nitrato de amônio, (▲) tartarato de amônio e (■) fosfato de amônio dibásico.

A Tabela 4 mostra os valores da K obtidos para cada corante nos diferentes SAB no CLA próximo a 47 % (m/m), que é comum a todos os sistemas. Todos os corantes apresentaram um maior valor de K no SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água e um menor valor de K no SAB L35 + nitrato de amônio + água comparando-se um CLA próximo a 47 % (m/m). De todas as condições estudadas, os maiores valores médios de K foram obtidos

no SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, CLA 55,18 % (m/m), pH 6,0, sendo de 2397 ± 19 , 2361 ± 85 , 1315 ± 26 e $1,964 \times 10^4 \pm 0,765 \times 10^4$ para os corantes AB, AC, AT e V40 respectivamente. Uma possível explicação reside no fato de os corantes estudados serem todos aniônicos, logo haverá uma interação desta espécie aniônica com o pseudopolication presente na fase rica em macromolécula (FS) do SAB. O pseudopolication é formado entre a macromolécula (via grupo EO) e o cátion formador do SAB (no caso amônio) [43]. Então, quanto mais carregado positivamente for o pseudopolication, maior interação com consequente maior valor de partição. O SAB de fosfato de amônio dibásico implicará em um pseudopolication mais carregado positivamente que um sistema formado por nitrato de amônio, tendo em vista que o primeiro conta com dois mols de amônio por mol de eletrólito, enquanto que o segundo conta com apenas um mol de amônio por mol de eletrólito, o que justifica a partição do corante no SAB de hidrogenofosfato ser maior que o SAB de nitrato.

Tabela 4

Comparação da K dos corantes nos SAB formados por diferentes ânions em CLA próximo a 47% (m/m).

Corante	K (NO ₃ ⁻)	K (C ₄ H ₄ O ₆ ²⁻)	K (HPO ₄ ²⁻)
AB	54,30 ± 3,00	323,0 ± 5,0	1256 ± 107
AC	37,70 ± 0,70	319,0 ± 1,0	1413 ± 19
AT	3,480 ± 0,050	146,0 ± 8,0	650,0 ± 56,0
V40	144,0 ± 3,0	599,0 ± 52,0	5521 ± 355

Além da carga do pseudopolication, a concentração de macromolécula na FS também influenciará no valor de K. Quanto maior a concentração de macromolécula na FS, maior será a partição do corante, tendo em vista que a interação se dá entre o corante e a macromolécula. A Tabela 5 mostra a composição das fases superior e inferior dos SAB utilizados neste

trabalho, que já estão descritos na literatura[27]. Comparou-se CLA próximo a 47 % (m/m), comum a todos os sistemas.

Tabela 5

Composição dos SAB formados por L35 + eletrólito de amônio + água a 25,0 °C.

Ânion	Composição FS			Composição FI			CLA / % (m/m)
	L35	S*	água	L35	S*	água	
NO ₃ ⁻	41,12	23,89	34,99	0,76	47,23	52,01	46,62
C ₄ H ₄ O ₆ ²⁻	45,99	4,47	49,54	0,63	20,49	78,88	48,11
HPO ₄ ²⁻	46,19	1,28	52,53	1,32	16,52	82,16	47,39

S* eletrólito

Como mostrado na Tabela 5 a concentração de macromolécula na FS segue a ordem HPO₄²⁻ > C₄H₄O₆²⁻ > NO₃⁻, que corresponde a ordem de razão de partição. O sistema com maior concentração de macromolécula na FS resultará em uma maior interação com os corantes, tendo em vista a interação corante-macromolécula (pseudopolication-corante) com uma consequente maior partição.

3.5. Porcentagem de extração dos corantes

No desenvolvimento de um método analítico, é necessário o conhecimento da porcentagem de extração do analito de interesse. A Figura 7 mostra a porcentagem de extração para os corantes AB, AC, AT e V40 no SAB L35 + (nitrato de amônio, tartarato de amônio ou fosfato de amônio dibásico) + água a 25,0 °C, pH 6,0. Dentre os SAB utilizados para a extração dos corantes, comparando-se um valor de CLA comum de, aproximadamente, 47% (m/m), os maiores valores de %E foram encontrados para o SAB contendo por fosfato. O SAB contendo nitrato foi o que apresentou os menores valores de %E. Este resultado era previsível tendo em vista que o cálculo de %E leva em consideração os valores de K. Em

todos os SAB avaliados, para o corante AB, a %E variou de 95,8 a 100%, para o AC a %E foi 94,4 a 100%, para o AT a %E variou de 75,5 a 100% e, finalmente para o V40 a %E foi igual a 97,8 a 100% (m/m).

Comparando-se um valor de CLA próximo a 47% (m/m) os valores de %E para os corantes AB, AC, AT e V40 foram de respectivamente, 99,92, 99,83, 99,85 e 99,98 no SAB L35 + fosfato de amônio dibásico + água, e de respectivamente, 99,70, 99,70, 99,32 e 99,83 no SAB L35 + tartarato de amônio + água. Apesar dos valores de %E serem ligeiramente maiores no SAB formado por fosfato de amônio dibásico quando comparado ao SAB formado por tartarato de amônio em um valor de CLA próximo, o último foi escolhido para a determinação dos corantes em alimentos, pois este sistema é mais amigável para o meio ambiente, tendo em vista que decompõe-se mais facilmente que o fosfato de amônio dibásico. Além disso, a separação de fases é instantânea, tornando o método rápido e ambientalmente seguro. Para o desenvolvimento do método de determinação dos corantes, foi escolhido o SAB L35 + tartarato de amônio + água, CLA = 48,11% (m/m), pH 6,0. O CLA foi escolhido por ser o menor para este sistema, ou seja, será necessário um menor gasto de reagentes para a sua formação que nos demais. Nestas condições experimentais, os valores de %E para os corantes AB, AC, AT e V40 são muito bons e iguais a 99,70, 99,70, 99,32 e 99,83%, representando uma destacada vantagem para sua utilização em amostras autênticas, bem como o fato de não ser necessário o ajuste de pH neste procedimento.

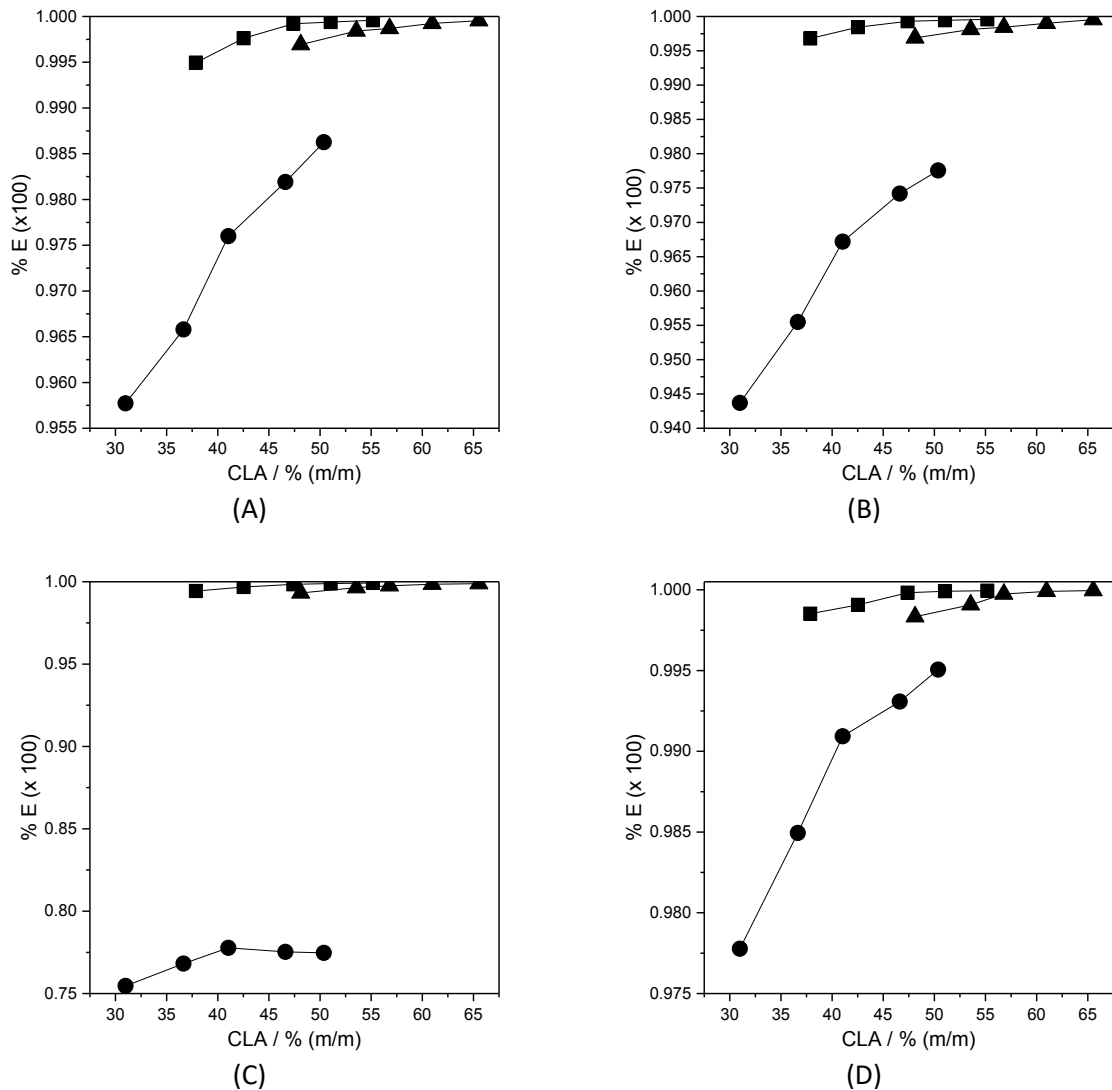


Figura 7: Porcentagem de extração (%E) dos corantes (a) AB, (b) AC, (c) AT e (d) V40 nos SAB L35 + sal de amônio + água a 25,0 °C, pH 6,0. (▲) tartarato de amônio, (■) fosfato de amônio dibásico e (●) nitrato de amônio.

3.6. Extração e determinação de corantes em amostras autênticas

Foi desenvolvido um método para extração, pré concentração e determinação dos corantes AB, AC, AT e V40 em amostras de alimentos usando o SAB L35 + tartarato de amônio + amostra, tendo como referência o SAB L35 + tartarato de amônio + água, CLA = 48,11 % (m/m) e pH 6,0. Para demonstrar a aplicabilidade do método, os corantes AB, AC, AT e V40 foram determinados nas amostras Poweread mix de frutas, Gatorade tangerina, Poweread limão e MID groselha, respectivamente.

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos na quantificação dos corantes utilizando o SAB, bem como, os resultados encontrados quando a quantificação foi realizada utilizando o método de adição padrão (AP) , pelo método por SAB (SAB) e diluindo as amostras diretamente em água(MD). O teor de todos os corantes nas amostras foi inferior a 100 mg kg⁻¹, atendendo as especificações da legislação brasileira [32].

Tabela 6

Comparação entre a quantificação dos corantes nas amostras autênticas.

corante	(C _{AP} ± dp) / mg kg ⁻¹	CV / %	(C _{SAB} ± dp) / mg kg ⁻¹	CV / %	Er / %	(C _{MD} ± dp) / mg kg ⁻¹	CV / %	Er / %
AB	2,92 ± 0,13	4,6	2,99 ± 0,02	0,7	2,71	2,96 ± 0,10	3,3	1,42
AC	14,7 ± 1,1	7,7	14,9 ± 0,1	0,9	1,39	15,3 ± 0,7	4,5	4,18
AT	5,04 ± 0,26	5,1	5,03 ± 0,02	0,3	-0,11	5,13 ± 0,16	3,0	1,77
V40	35,2 ± 1,5	4,3	35,3 ± 0,6	1,6	0,46	30,9 ± 1,5	4,9	-12,2

C_{AP}: concentração pelo método de adição padrão, C_{SAB}: concentração pelo método de SAB e C_{MD}: concentração pelo método direto.

A concentração de corante obtida utilizando o método proposto neste trabalho (C_{SAB}) foi comparada com a concentração de corante obtida pelo método de adição padrão através do cálculo do erro relativo (Er) dado pela equação 6:

$$E_R = \frac{C_{OB} - C_{AP}}{C_{AP}} \times 100 \quad (6)$$

onde C_{OB} é a concentração obtida no método proposto ou no método direto e C_{AP} é a concentração obtida pelo método de adição padrão.

O erro relativo encontrado quando comparado o método proposto com o método de adição padrão, foi inferior a 2,7 %. Este é um resultado muito bom quando se considera a complexidade das amostras, e, portanto, o pronunciado efeito de matriz.

O efeito de matriz pôde ser verificado quando comparada a concentração dos corantes obtida pelo método direto, ou seja, quando a amostra de alimento foi diluída diretamente em água, seguida da determinação utilizando o EAM, com a concentração obtida pelo método de adição padrão. No caso do corante V40, o erro relativo obtido, em módulo, é superior a 12% o que demonstra que há efeito de matriz. Além disso, os valores de concentração obtidos pelo método de adição padrão são estatisticamente diferentes dos obtidos pelo método direto no caso do corante V40.

Podemos verificar graficamente o efeito de matriz, quando comparamos a curva em água e a curva de adição padrão do V40, mostrado na Figura 8.

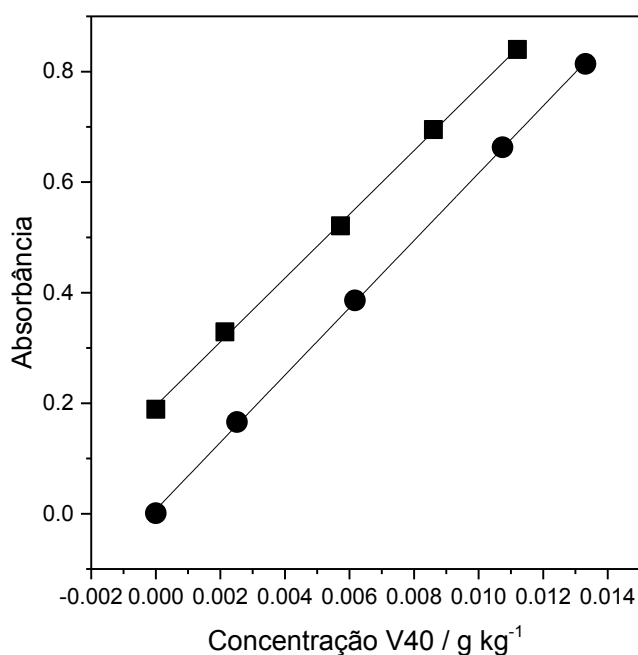


Figura 8. Curva de adição padrão (■) e curva em água (●) do corante V40.

Como mostrado na Figura 8, para o V40, as curvas de adição padrão e a curva em água apresentam inclinações diferentes, sendo o coeficiente angular igual a 57,71 para a curva de adição padrão, e de 60,89 para a curva em água. Esta diferença de inclinação das curvas é um indicativo de efeito de matriz. Neste caso, o uso do SAB foi necessário para eliminar este

efeito reduzindo o erro relativo para 0,46. De modo geral, quando o SAB foi usado para extrair o corante os erros relativos foram menores, do que quando não se utilizou SAB. No caso do V40, os valores obtidos por SAB e método de adição padrão foram estatisticamente iguais, todavia, o método direto apresentou diferença significativa. Nas demais amostras, contendo os corantes AB, AC e AT não houve diferença significativa entre os valores de concentração obtidos pelos três métodos.

Vale ressaltar que o método por SAB faz uso de uma menor quantidade de amostra que o método de adição padrão. No SAB, são utilizados menos de 0,8 gramas, enquanto que pelo método de adição padrão são utilizados no mínimo 8,0 gramas. Um ponto positivo para o método desenvolvido neste trabalho, é o menor consumo de amostras com conseqüente, menor geração de resíduos que o método de adição padrão. Além disso, o método desenvolvido é robusto, podendo ser aplicado em uma ampla faixa de valores de pH; não faz uso de solventes orgânicos, é rápido, simples, de baixo custo e eficiente.

A Tabela 7 mostra uma comparação entre o método proposto neste trabalho e outros métodos descritos na literatura para a determinação de corantes em alimentos. Neste trabalho, o limite de detecção (LD) foi calculado como 3,3 vezes o coeficiente linear da equação de reta sobre o coeficiente angular da equação da reta [44]. O limite de quantificação (LQ) foi calculado como 10 vezes o coeficiente linear da equação da reta sobre o coeficiente angular da equação da reta [44]. Para os corantes AB, AC, AT e V40, os LQ foram de respectivamente 0,135, 0,203, 0,364 e 1,20 mg kg⁻¹. Para todos os corantes, as curvas analíticas apresentaram $R^2 > 0,999$.

Como mostrado na Tabela 7 diversos métodos são reportados para a determinação de corantes em alimentos. Apesar de o método proposto apresentar um maior LD quando comparado a alguns dos métodos descritos na literatura, a faixa de trabalho, bem como o LQ são adequados para atender a legislação brasileira quanto ao teor de corantes em bebidas.

Além disso, o método proposto apresenta um menor consumo de amostra (menos de 1 g) que os demais, é mais rápido, não faz uso de solventes orgânicos e nem de equipamentos caros. Em comparação com os demais métodos espectrofotométricos descritos na Tabela 7, o método proposto é mais rápido, e não requer temperaturas elevadas na etapa de preparo de amostra.

Os resultados apresentados mostram que o método desenvolvido foi aplicado com sucesso na extração e quantificação de corantes em amostras de alimentos. Sendo este eficiente na eliminação do efeito de matriz e na pré-concentração dos corantes, bem como adequado para atender a legislação brasileira.

Tabela 7

Comparação entre métodos analíticos para a determinação de corantes alimentícios.

A	C	técnica	preparo da amostra	T / min	S	LD	FL / unidade	CV / %	Qtdd	Ref
bebida/ confeito	AB	Espectrofotometria	ponto nuvem	20	Triton X	0,03 mg L ⁻¹	0,16 – 130 mg L	4,6	-x-	[17]
	AC					0,06 mg L ⁻¹	25,0 – 130 mg L	3,4		
refrigerante	AB	HPLC-DAD	fase sólida	> 30	Álcool isopro- pílico/ metanol	0,003 mg L ⁻¹	0,075 – 0,3 mg L ⁻¹	-x-	33 mL	[11]
	AC					0,024 mg L ⁻¹	0,06 – 1,2 mg L			
	AT					ND	-x-			
confeito	AC	Eletroquímica	sensor	3600	Ácido sulfúrico	0,107 mg L ⁻¹	0,169 – 0,355 mg L	3,7	-x-	[13]
confeito	AB	Espectrofotometria	ponto nuvem	40	Triton X	0,007 mg L ⁻¹	0,02 - 4 mg L ⁻¹	3,4	4,8 g	[5]
	AC					0,009 mg L ⁻¹	0,02 – 4 mg L ⁻¹	3,5		
	V4 0					0,001 mg L ⁻¹	0,025 – 2,5 mg L ⁻¹	4,2		
confeito	AB	HPLC -MS/MS	fase sólida	>720	Aceto- nitrila/ metanol	5 mg L ⁻¹	10 – 70 mg L ⁻¹	-x-	2 g	[42]
	AC					2 mg L ⁻¹				
	AT					5 mg L ⁻¹				
repositor hidroeletró- lítico preparado em pó para refresco	AB	Espectrofotometria	SAB	13	-x-	0,0444 mg kg ⁻¹	0,135 – 4,62 mg kg ⁻¹	0,67	0,35 g	presente trabalho
	AC					0,0671 mg kg ⁻¹	0,203 – 14,8 mg kg ⁻¹	0,90	0,36 g	
	AT					0,120 mg kg ⁻¹	0,364 – 14,3 mg kg ⁻¹	0,31	0,40 g	
	V4 0					0,396 mg kg ⁻¹	1,20 – 13,3 mg kg ⁻¹	1,6	0,37g	

A: amostra; C: corante; T: tempo de preparo de amostra; S: solvente; LD: limite de detecção; FL: faixa linear; CV: coeficiente de variação; Qtdd: quantidade de amostra; Ref: referência.

4. Conclusões

Objetivou-se conhecer o comportamento de partição dos corantes AB, AC, AT e V40 nos SAB formados por L35 + eletrólitos de amônio + água em diferentes condições de CLA e pH. A partição dos corantes deu-se preferencialmente para a fase superior, com valores da K superiores à unidade, e variando de $22,70 \pm 1,14$ a 2397 ± 19 , $16,76 \pm 0,37$ a 2361 ± 85 ; $3,07 \pm 0,11$ a 1315 ± 26 e $44,00 \pm 0,86$ a $2,305 \times 10^5 \pm 0,0213 \times 10^5$ para os corantes AB, AC, AT e V40, respectivamente. Os resultados sugerem que o processo de partição deu-se principalmente por contribuição entálpica. Os valores da razão de partição foram pouco influenciados por variações de pH. Entretanto, a composição do SAB, bem como a natureza do eletrólito formador do SAB apresentam uma marcante influência na partição dos corantes. No SAB L35 + tartarato de amônio + água, CLA 48,11 % (m/m), pH 6,0 e 25 °C, a porcentagem de extração foi superior a 99 % para todos os corantes.

Foi desenvolvido um método espectrofotométrico utilizando o SAB L35 + tartarato de amônio + amostra para a extração, pré-concentração e determinação de corantes alimentícios em bebidas. Este método apresenta vantagens como simplicidade, baixo custo, rapidez e não utilização de solventes orgânicos. Para todos os corantes investigados, o método proposto apresentou limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e faixa linear adequado para aplicação analítica. Além disso, o método usa pequena quantidade de amostra e reagentes tornando-o economicamente e ambientalmente viável. Portanto, o método proposto pode ser aplicado para amostras autênticas para o controle da qualidade da indústria de bebidas.

5. Referências

[1] Brasil, Resolução n° 44, in: A.N.d.V.S. (ANVISA) (Ed.), Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1977.

- [2] K. Rovina, P.P. Prabakaran, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 85 (2016) 47-56.
- [3] A. Mittal, Use of hen feathers as potential adsorbent for the removal of a hazardous dye, Brilliant Blue FCF, from wastewater, *J. Hazard. Mater.*, 128 (2006) 233-239.
- [4] D. McCann, A. Barrett, A. Cooper, Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial, *Lancet*, 370 (2007) 1560-1567.
- [5] E. Heidarizadi, R. Tabaraki, Simultaneous spectrophotometric determination of synthetic dyes in food samples after cloud point extraction using multiple response optimizations, *Talanta*, 148 (2016) 237-246.
- [6] P. Amchova, H. Kotolova, J. Ruda-Kucerova, Health safety issues of synthetic food colorants, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 73 (2015) 914-922.
- [7] O. Zenebon, N.S. Pascuet, *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4 ed., Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2008.
- [8] J. König, 2 - Food colour additives of synthetic origin A2 - Scotter, Michael J, in: *Colour Additives for Foods and Beverages*, Woodhead Publishing, Oxford, 2015, pp. 35-60.
- [9] C.F. Tsai, C.H. Kuo, D.Y.C. Shih, Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Food Drug Anal.*, 23 (2015) 453-462.
- [10] Y.W. Yu, Z.F. Fan, Magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC for the determination of Allura Red in food and beverage samples, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.*, 33 (2016) 1527-1534.
- [11] F.I. de Andrade, M.I.F. Guedes, I.G.P. Vieira, F.N.P. Mendes, P.A.S. Rodrigues, C.S.C. Maia, M.M.M. Ávila, L.D. Ribeiro, Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC, *Food Chem.*, 157 (2014) 193-198.
- [12] J.Y. Shin, M.Y. Jung, Ultra-high-throughput analytical strategy based on UHPLC-DAD in combination with syringe filtration for the quantitation of nine synthetic colorants in beverages: impacts of syringe membrane types and sample pH on recovery, *J. Agric. Food Chem.*, 65 (2017) 9916-9922.
- [13] Z.Z. Yin, S.W. Cheng, L.B. Xu, H.Y. Liu, K. Huang, L. Li, Y.Y. Zhai, Y.B. Zeng, H.Q. Liu, Y. Shao, Z.L. Zhang, Y.X. Lu, Highly sensitive and selective sensor for sunset yellow based on molecularly imprinted polydopamine-coated multi-walled carbon nanotubes, *Biosens. Bioelectron.*, 100 (2018) 565-570.
- [14] K. Rovina, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Highly sensitive electrochemical determination of sunset yellow in commercial food products based on CHIT/GO/MWCNTs/AuNPs/GCE, *Food Control*, 82 (2017) 66-73.

- [15] P.S. Dorraji, F. Jalali, Electrochemical fabrication of a novel ZnO/cysteic acid nanocomposite modified electrode and its application to simultaneous determination of sunset yellow and tartrazine, *Food Chem.*, 227 (2017) 73-77.
- [16] X.H. Chen, J.H. Yin, C. Zhang, N. Lu, Z.D. Chen, Determination of brilliant blue FCF by a novel solid-state ECL quenching sensor of Ru(bpy)₃(2+)-poly(sulfosalicylic acid)/GCE, *Anal. Sci.*, 33 (2017) 1123-1128.
- [17] R. Heydari, M. Hosseini, M. Alimoradi, S. Zarabi, A simple method for simultaneous spectrophotometric determination of brilliant blue FCF and sunset yellow FCF in food samples after cloud point extraction, *J. Chem. Soc. Pak.*, 38 (2016) 438-445.
- [18] Y.J. Ai, P. Liang, Y.X. Wu, Q.M. Dong, J.B. Li, Y. Bai, B.J. Xu, Z. Yu, D.J. Ni, Rapid qualitative and quantitative determination of food colorants by both Raman spectra and Surface-enhanced Raman Scattering (SERS), *Food Chem.*, 241 (2018) 427-433.
- [19] K. Rovina, S. Siddiquee, S.M. Shaarani, Extraction, analytical and advanced methods for detection of allura red AC (E129) in food and beverages products, *Front. Microbiol.*, 7 (2016) 1-13.
- [20] E.J. Lenardão, R.A. Freitag, M.J. Dabdoub, A.C.F. Batista, C.C. Silveira, "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa, *Quim. Nova*, 26 (2003) 123-129.
- [21] L.H.M. Silva, W. Loh, Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas, *Quim. Nova*, 29 (2006) 1345-1351.
- [22] Z.L. Zhao, Q. Li, X.L. Ji, R. Dimova, R. Lipowsky, Y.G. Liu, Molar mass fractionation in aqueous two-phase polymer solutions of dextran and poly(ethylene glycol), *J. Chromatogr. A*, 1452 (2016) 107-115.
- [23] L.A. Ferreira, N.R. da Silva, S.R. Wlodarczyk, J.A. Loureiro, P.P. Madeira, J.A. Teixeira, V.N. Uversky, B.Y. Zaslavsky, Interrelationship between partition behavior of organic compounds and proteins in aqueous dextran-polyethylene glycol and polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase systems, *J. Chromatogr. A*, 1443 (2016) 21-25.
- [24] J.C. Quintão, P.R. Patricio, A.C.G. Veloso, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C. Hespanhol, Liquid-liquid equilibrium of the ternary ammonium salt + poly(propylene glycol) + water system, *Fluid Phase Equilib.*, 442 (2017) 96-103.
- [25] S.C. Silvério, J. Gracia, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, Polyethylene glycol 8000+ citrate salts aqueous two-phase systems: relative hydrophobicity of the equilibrium phases, *Fluid Phase Equilib.*, 407 (2016) 298-303.
- [26] L. Muruchi, H.R. Galleguillos, Y.P. Jimenez, Aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) 4000 and ferrous sulfate at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 412 (2016) 29-38.

- [27] A.C.G. Veloso, P.R. Patrício, J.C. Quintão, R.M.M. de Carvalho, L.H.M. da Silva, M.C. Hespanhol, Phase equilibrium of aqueous two-phase systems composed by L35 triblock copolymer + organic and inorganic ammonium electrolytes + water at 298.2 and 313.2 K, *Fluid Phase Equilib.*, 469 (2018) 26-32.
- [28] C. Sheng, J. Han, Y. Wang, B. Chen, Y. Liu, G. Zhang, Y. Yan, X. Zhao, Liquid-liquid equilibria of ionic liquid 1-(2-methoxyethyl)-3-methylimidazolium bromide + potassium carbonate, potassium phosphate, dipotassium phosphate + water aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 364 (2014) 55-61.
- [29] X. Tang, J. Han, Y.J. Hu, Y. Wang, Y. Lu, T. Chen, L. Ni, The study of phase behavior of aqueous two-phase system containing $[C_n\text{mim}]\text{BF}_4$ ($n = 2,3,4$) + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + H_2O at different temperatures, *Fluid Phase Equilib.*, 383 (2014) 100-107.
- [30] M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paglioli, J.S. Coimbra, L.A. Minim, Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons, *Quim. Nova*, 29 (2006) 1332-1339.
- [31] A.B. Mageste, T.D.A. Senra, M.C.H. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.H.M. da Silva, Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts, *Sep. Purif. Technol.*, 98 (2012) 69-77.
- [32] Brasil, Resolução de diretoria colegiada- RDC nº5, de 15 de janeiro de 2007, in: ANVISA (Ed.), *Diário Oficial da União*, Brasília, 2007.
- [33] R.D. Rogers, A.H. Bond, C.B. Bauer, J. Zhang, M.L. Jezl, D.M. Roden, S.D. Reins, R.R. Chomko, *Aqueous biphasic separations: biomolecules to metal ion*, Plenum Press, London, 1995.
- [34] D.M. Alan, W. Andrew, *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations*, Second edition ed., Blackwell Science, Malden, MA, 1997.
- [35] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: an efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7623-7629.
- [36] J.M. de Alvarenga, R.A. Fideles, M.V. da Silva, G.F. Murari, J.G. Taylor, L.R. de Lemos, G.D. Rodrigues, A.B. Mageste, Partition study of textile dye Remazol Yellow Gold RNL in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 391 (2015) 1-8.
- [37] G.A. Borges, L.P. Silva, J.A. Penido, L.R. de Lemos, A.B. Mageste, G.D. Rodrigues, A method for dye extraction using an aqueous two-phase system: effect of co-occurrence of contaminants in textile industry wastewater, *J. Environ. Manage.*, 183 (2016) 196-203.
- [38] H.O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, C.A. Haynes, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 711 (1998) 3-17.

- [39] P.J. Flory, Thermodynamics of high polymer solutions, *J. Phys. Chem.*, 10 (1942) 51-61.
- [40] M.L. Huggins, Some properties of solutions of long-chain compounds, *J. Phys. Chem.*, 46 (1942) 151-158.
- [41] E.C. Vidotti, W.F. Costa, C.C. Oliveira, Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples, *Talanta*, 68 (2006) 516-521.
- [42] M. Perez-Urquiza, J.L. Beltran, Determination of the dissociation constants of sulfonated azo dyes by capillary zone electrophoresis and spectrophotometry methods, *J. Chromatogr. A*, 917 (2001) 331-336.
- [43] L.H.M. Da Silva, W. Loh, Calorimetric investigation of the formation of aqueous two-phase systems in ternary mixtures of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran), *J. Phys. Chem. B*, 104 (2000) 10069-10073.
- [44] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim. Nova*, 27 (2004) 771-780.

CONCLUSÕES GERAIS

O desenvolvimento deste trabalho viabilizou a obtenção de novos sistemas aquosos bifásicos (SAB) formados por L35 + eletrólitos de amônio + água, contribuindo para a literatura, ainda escassa, acerca de SAB formados por copolímero tribloco, bem como um melhor entendimento das forças que regem a formação de SAB. Foi realizado um estudo sobre o comportamento de partição dos corantes azul brilhante (AB), amarelo crepúsculo (AC), amarelo tartrazina (AT) e vermelho 40 (V40) nos novos SAB propostos, verificando a influência de parâmetros como pH, CLA e ânions formadores do sistema no processo de partição. Foi proposto um novo método rápido, fácil, eficiente, de baixo custo e ambientalmente correto, baseado em SAB com determinação espectrofotométrica para a determinação dos corantes AB, AC, AT e V40 em amostras alimentícias autênticas. Em face do trabalho desenvolvido, pode-se comprovar a grande aplicabilidade dos SAB na extração e pré-concentração de analitos em matrizes complexas, viabilizando a utilização de SAB na etapa de preparo de amostras.