

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**TERMODINÂMICA DE PARTIÇÃO DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO
EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Luciana de Oliveira Reis Leite

Doctor Scientiae

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL**

2015

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

T

L533t
2015
Leite, Luciana de Oliveira Reis, 1985-
Termodinâmica de partição de clorofilina cúprica de
sódio em sistemas aquosos bifásicos / Luciana de Oliveira
Reis Leite. - Viçosa, MG, 2015.
xiii, 94f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. Corantes. 2. Produtos naturais. 3. Extração
(Química). 4. Clorofilina cúprica de sódio. 5. Sistemas
aquosos bifásicos. 6. Termodinâmica. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 543.55

LUCIANA DE OLIVEIRA REIS LEITE

**TERMODINÂMICA DE PARTIÇÃO DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO
EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

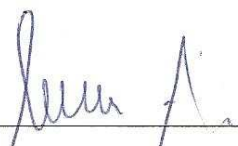
2015

LUCIANA DE OLIVEIRA REIS LEITE

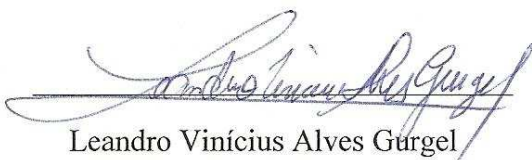
**TERMODINÂMICA DE PARTIÇÃO DE CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO
EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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*.

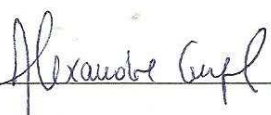
APROVADA: 13 de julho de 2015.



Paulo César Stringheta




Leandro Vinícius Alves Gurgel



Alexandre Gurgel



Luciano de Moura Guimarães



Luis Henrique Mendes da Silva

(Orientador)

Ao meu querido marido Daniel,

Dedico este trabalho.

*“Disciplina é a
ponte que liga
os nossos sonhos
às nossas realizações”*

Pat Tillman

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar ao meu lado e me sustentar durante toda a realização deste trabalho e em toda minha vida!

Aos meus pais, ao meu irmão e sobrinhas pelo constante apoio e carinho!

Ao meu querido marido Daniel, pelo amor diário e por me incentivar em todos os momentos!

Aos meus queridos primos Alessandra e Carlinhos, e à família do Tio Lucas, pelo apoio constante!

A minha amiga Andréa Koehler por sempre me acolher em Viçosa!

E aos amigos da Igreja Cristã Maranata pelas constantes orações!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Departamento de Química e Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade.

Ao meu orientador Luis Henrique pelos valiosos conselhos sem os quais não seria possível realizar este trabalho! E pelo exemplo de oratória impecável!

As minhas co-orientadoras Carminha e Ana Clarissa pelo constante apoio à realização deste trabalho!

A empresa Chr Hansen pela doação das amostras de clorofilina cúprica de sódio.

Aos colegas do grupo de pesquisa QUIVECOM, pela companhia ao longo dos anos! Aos “gêmeos” por realizarem as medidas microcalorimétricas. Em especial, a Pamela pela amizade, conversas e risadas diárias! Ao Jeanderson por trazer morangos colhidos do pé direto de Barbacena! Ao Juan pelas conversas em que a gente perde a noção do tempo! Aos colombianos: July, Dario, Andres e “Alvarito” pelas aulas de “portunhol”! E aos meus queridos amigos Igor Boggione, Roselaine e Aparecida, que deixaram saudades!

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	Ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO 1

1. Físico-química dos corantes.....	1
2. Corantes: Conceitos e Classificações.....	7
2.1. Classificação baseada na estrutura química.....	8
2.2. Classificação baseada na fonte de obtenção	9
2.3. Classificação segundo a ANVISA.....	9
3. Breve histórico da utilização de corantes: da antiguidade aos dias atuais.....	10
4. Corantes naturais verdes: clorofila e clorofilina cúprica de sódio.....	12
5. Sistemas Aquosos Bifásicos.....	24
5.1. Teoria de formação dos SABs.....	27
5.2. Teoria de partição de corantes em sistemas aquosos bifásicos (SABs).....	28
5.2.1. Teoria de Flory-Huggins para soluções poliméricas.....	30
5.2.2. Teoria de Johansson e Colaboradores.....	36
5.3. Sistemas aquosos bifásicos utilizados para partição de corantes.....	37
5.4. Técnicas utilizadas na partição e determinação dos parâmetros termodinâmicos da clorofilina.....	45
5.4.1. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta visível.....	45
5.4.2. Calorimetria de Titulação isotérmica.....	47
5.4.3. Aproximação de van't Hoff.....	51
6. Referências bibliográficas.....	54

CAPÍTULO II - Partitioning thermodynamic of sodium copper chlorophyllin in aqueous two-phase systems 61

Abstract.....	62
1. Introduction.....	63
2. Experimental.....	66
2.1. Materials.....	66
2.2. Preparation of aqueous two-phase systems and SCC partition.....	66
2.3. Determination of transfer thermodynamic parameters of the SCC partition.....	67
2.3.1. Transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G$)	67
2.3.2. Transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H$)	68
2.3.3. Transfer entropy change ($\Delta_{tr}S$)	69

3. Results and discussions.....	70
3.1.Partition study of SCC in ATPS.....	70
3.1.1. Effect of ATPS-forming electrolyte on SCC partition.....	75
3.1.2. Effect of polymer molar mass on SCC partitioning.....	77
3.1.3. Effect of macromolecule hydrophobicity on SCC partition.....	79
3.1.4. Temperature effect on SCC partitioning behavior.....	81
3.2. Transfer thermodynamic parameters of SCC in ATPSs.....	82
4. Conclusions.....	89
Acknowledgements.....	89
5. References.....	90

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TOM – Teoria dos Orbitais Moleculares

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada

CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

DMSO -Dimetilsulfóxido

SCD - Society of Dyers and Colourists

AATCC - Association of Textile Chemists and Colourists

TLC - Cromatografia de camada delgada

EM - Espectrometria de massas

IR - Espectroscopia de infra-vermelho

HOMO- orbital molecular ocupado de maior energia

LUMO - orbital molecular vazio de menor energia

EM - espectrometria de massas

IV - Espectroscopia no infravermelho

TLC - Cromatografia em camada delgada

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-MS- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa

SABs - Sistemas Aquosos Bifásicos

ELL - Extração líquido-líquido

FI - Fase inferior

FS -Fase superior

LB – Linha binodal

LA – Linha de amarração

CLA - Comprimento da linha de amarração

PEO - Poli(óxido de etileno)

EO - (óxido de etileno)

PPO -Poli(óxido de propileno)

K - Coeficiente de partição

E% - Eficiência de extração

ITC – Calorimetria de titulação isotérmica

ATPSs - Aqueous two-phase systems

ATPS – Aqueous two-phase system

SCC - Sodium copper chlorophyllin

K – Partition coefficient

ITC – Isothermal Titration Calorimetry

$\Delta_{tr}H^{\circ}$ - Enthalpy change of transfer

$\Delta_{tr}H^{\circ}_{VH}$ - Enthalpy change of transfer obtained using the van't Hoff approach

$\Delta_{tr}H^{\circ}_{ITC}$ - Enthalpy change of transfer obtained using ITC.

PEG - Poly(ethylene oxide)

PPG - Poly(propylene oxide)

L64 - Triblock copolymer (PEG)₁₃(PPG)₃₀(PEG)₁₃

$\Delta_{tr}G$ - Gibbs free energy change of transfer

$\Delta_{tr}S$ - Entropy change of transfer

TLL - Tie-line length

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Espectro eletromagnético.....	1
Figura 2. Estrutura química do Caroteno.....	4
Figura 3. Influência da adição de ligações duplas conjugadas nos valores de energia necessários para que a transição π - π^* ocorra. HOMO: orbital ocupado de maior energia. LUMO: orbital molecular vazio de energia mais baixa.....	5
Figura 4. Desenho esquemático da roda das cores.....	6
Figura 5. Estrutura química do índigo.....	11
Figura 6. Estrutura química da mauveína.....	11
Figura 7. Estrutura química das clorofilas a e b.....	16
Figura 8. Processo de extração da clorofila.....	18
Figura 9. Degradação da clorofila em meio ácido.....	19
Figura 10. Degradação da clorofila em meio básico ou na presença da clorofilase.....	19
Figura 11. Degradação da clorofilida em meio ácido.....	20
Figura 12. Estrutura química da clorofilina cúprica.....	21
Figura 13. Complexos planar e tetraédrico.....	23
Figura 14. Composições químicas associadas a um ponto de mistura do sistema: PEO 1500/fosfato de potássio/H ₂ O a 25°C e pH =7.....	25
Figura 15. Diagrama de fase em coordenadas retangulares.....	26
Figura 16. Modelo reticular de distribuição de uma solução ideal. As moléculas de um soluto (círculos pretos) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.....	31

Figura 17. Modelo reticular de distribuição de uma solução polimérica. As moléculas de um soluto (círculos pretos) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.....	33
Figura 18. Espectro de absorção da clorofila em um gráfico de absorbância em função do comprimento de onda em nanômetros.....	46
Figura 19. (a) Esquema interno do calorímetro e (b) torres e celas de amostra e referência.....	48
Figura 20. (a) Termograma da titulação de um agente tensioativo não iônico em água; (b) A integral da área dos picos (Figura 20a) fornece o valor de entalpia para cada injeção.....	49

CAPÍTULO II

Figure 1. Chemical structures of (a) sodium copper chlorophyllin (SCC) and (b) chlorophyll a (R = CH ₃) or chlorophyll b (R = CHO).....	63
Figure 2. Partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) for ATPS formed by PEG 10000 + lithium sulfate + water, at 298.15 K, and pH = 13,00.....	71
Figure 3. Partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) for aqueous ATPSs formed by PEO1500, salt, and water, at 298.2 K and pH = 13.00. The inset shows the magnification of the anion effect on the K values.....	76
Figure 4. PEO molar mass effect on partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) in ATPSs formed by sodium sulfate salt, at 298.2 K and pH = 13.00....	78
Figure 5. Effect of macromolecule hydrophobicity on SCC partition coefficient (K) as function of tie-line length (TLL) for ATPSs formed by sodium sulfate salt, at 298.15 K and pH = 13.00.....	79
Figure 6. SCC partition coefficient (K) versus temperature curves at different tie-line lengths of ATPS formed by PEO10000, sodium sulfate, and water, at pH 13.00.....	81
Fig. 7. (a) lnK versus 1/T and (b) SCC transfer enthalpy change obtained by the van't Hoff approach ($\Delta_r H^\circ_{VH}$) versus T curves for SCC partition at different tie-line lengths of ATPS formed by PEO10000, sodium sulfate, and water. The lines are the polynomial curves fitted to experimental data.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Classes químicas importantes dos corantes naturais.....	8
Tabela 2. Sistemas aquosos bifásicos que já foram utilizados para a partição de corantes naturais.....	39

CAPÍTULO II

Table 1. Differences in water concentrations between bottom and top phases of ATPS investigated for SCC partition, at 298.15 K.....	73
Table 2. Transfer thermodynamic parameters of SCC in different ATPSs studied for higher TLL value.....	84

RESUMO

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Termodinâmica de partição de clorofilina cúprica de sódio em sistemas aquosos bifásicos.** Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Coorientadoras: Maria do Carmo Hespanhol da Silva e Ana Clarissa dos Santos Pires.

Atualmente, devido a uma crescente conscientização da sociedade com questões de sustentabilidade, os produtos naturais e não tóxicos têm recebido um maior destaque na pesquisa. Nesse contexto, os corantes naturais reemergiram como uma alternativa viável em detrimento do uso de corantes sintéticos. Aliado a isso, faz-se necessário implantar novos métodos de extração que não utilizem solventes orgânicos, que não sejam dispendiosos ou caros e que estejam dentro dos princípios da química verde. Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) têm se mostrado uma excelente alternativa para extração/purificação desses corantes. Embora as partições de corantes em SABs sejam conhecidas há muitos anos, surpreendentemente estas não foram extensivamente exploradas. Portanto, este trabalho teve como propostas particionar o corante natural clorofilina cúprica de sódio em diferentes SABs e avaliar os parâmetros que afetam essa partição, como: efeito do eletrólito formador do SAB, efeito da massa molar do polímero e efeito da hidrofobicidade do polímero. Além disso, buscou-se determinar parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G^\circ$, $\Delta_{tr}H^\circ$, $\Delta_{tr}S^\circ$) e avaliar a natureza das forças (entrópica ou entálpica) que atuam sobre esse fenômeno. Compararam-se ainda valores de variação de entalpia obtidos de duas formas diferentes: uma pela utilização da equação de van't Hoff ($\Delta_{tr}H^\circ_{VH}$) e outra pela utilização da calorimetria de titulação isotérmica ($\Delta_{tr}H^\circ_{ITC}$). Os valores de coeficiente de partição (K) foram dependentes dos parâmetros avaliados e variaram entre 0,36 e 347. Para a maioria dos sistemas, a transferência da clorofilina cúprica de sódio da fase inferior para a fase superior foi exotérmica, com $\Delta_{tr}H^\circ_{ITC}$ atingindo valores de $-77.57 \text{ kJ mol}^{-1}$. Os valores de variação de entropia sugerem que os componentes do SAB (água e íons) são transferidos para a fase inferior, simultaneamente, a clorofilina cúprica de sódio se transfere para a fase superior.

ABSTRACT

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Partitioning thermodynamic of sodium copper chlorophyllin in aqueous two-phase systems.** Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Co-advisers: Maria do Carmo Hespanhol da Silva and Ana Clarissa dos Santos Pires.

Currently, due to a growing awareness of society with sustainability issues, natural and non-toxic products have attracted great attention in research. In this context, natural dyes re-emerged as a viable alternative over the use of synthetic dyes. Allied to this, it is necessary to implement new extraction methods that do not employ organic solvents that are inexpensive and comply with the principles of green chemistry. Aqueous two-phase systems (ATPSs) have proven to be an excellent alternative to extraction/purification of different dyes. Although dyes partition in SABs have been known for many years, surprisingly they have not been extensively exploited. Therefore, this work aimed to partition the natural dye sodium copper chlorophyllin in different ATPSs and to evaluate the effect of the tie-line length (TLL), ATPS-forming components nature and temperature on the SCC partition coefficient (K), and transfer thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^\circ$, $\Delta_{tr}H^\circ$, $\Delta_{tr}S^\circ$) were obtained. The $\Delta_{tr}H^\circ$ values were obtained by isothermal titration calorimetry ($\Delta_{tr}H^\circ_{ITC}$) and van't Hoff approach ($\Delta_{tr}H^\circ_{VH}$). The K values depended on the evaluated parameters and ranged between 0.36 and 347. For most systems, SCC transfer to the ATPS top phase was exothermic, with $\Delta_{tr}H^\circ_{ITC}$ attaining values up to $-77.57 \text{ kJ mol}^{-1}$. The transfer entropy change values suggested that ATPSs components are transferred to the bottom phase whilst SCC is simultaneously transferred to the top phase.

CAPÍTULO I –INTRODUÇÃO

1. Físico-química dos corantes

O estudo da interação da luz com a matéria sempre fascinou o ser humano, fenômenos como a cor surpreenderam as civilizações desde os primórdios. O fenômeno da cor é resultante da interação da luz com a matéria, a cor que uma substância apresenta tem como origem os processos de absorção e reflexão da luz por parte desta. Na química, a parte da molécula que é responsável pela sua cor característica é chamada de grupo cromóforo. Atualmente nossa sociedade utiliza substâncias que possuem cores características em diversos processos, como: tingimento de tecidos e coloração de alimentos. Essas substâncias que dão cor são chamadas de corantes ou pigmentos[1, 2].

Para entender o fenômeno da cor é necessário entender o que é a luz e como esta interage com as substâncias. A luz é uma onda eletromagnética, sendo que a luz visível corresponde a uma faixa do espectro eletromagnético (Figura 1) que apresenta comprimento de onda em um intervalo dentro do qual o olho humano é a ela sensível[2].

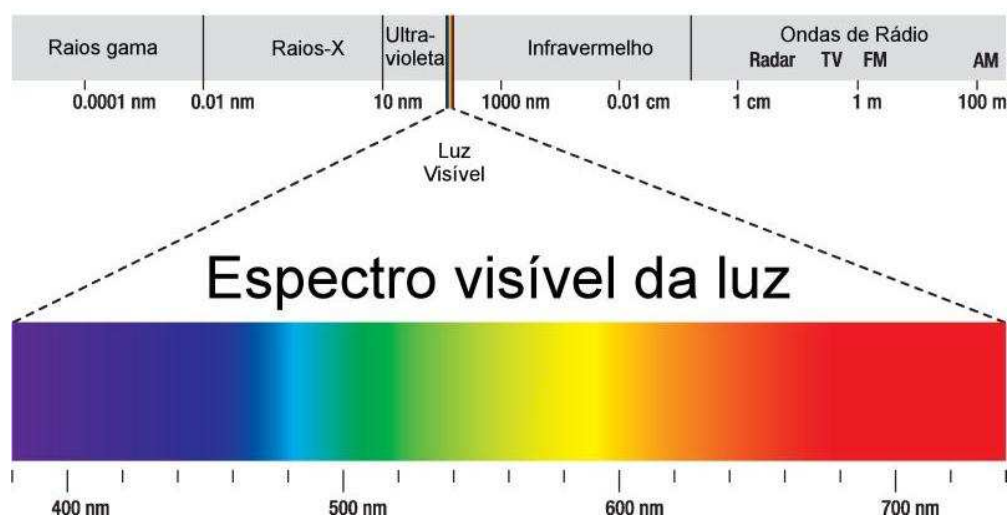


Figura 1. Espectro eletromagnético.

Como podemos observar na Figura 1 o espectro visível inicia em comprimento de onda em torno de 740 nm (vermelho), e termina em comprimento de onda em torno de 380nm (violeta), sendo estas as faixas de menor e maior energia respectivamente[1-3].

A frequência e o comprimento de onda são características fundamentais que descrevem as ondas eletromagnéticas. A energia de uma determinada onda eletromagnética (E) é dada pelo produto da sua frequência (f) pela constante de Planck (h) (Equação 1).

$$E = hf \quad (\text{Eq. 1})$$

Assim, vemos que a energia de uma onda depende de sua frequência, sendo energia e frequência grandezas diretamente proporcionais, de modo que, quanto maior sua frequência maior será a energia contida na onda.

Como citado anteriormente o comprimento de onda (λ) também é uma característica fundamental de uma onda eletromagnética, sendo que seu valor é dado pela divisão da velocidade da onda eletromagnética (v) por sua frequência (f) (Equação 2):

$$\lambda = \frac{v}{f} \quad (\text{Eq. 2})$$

A partir da equação 2 vemos que a frequência de uma onda é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda, quanto maior o comprimento de onda de uma onda eletromagnética menor será a sua frequência [1-4].

Quando a radiação eletromagnética incide em uma molécula, pode ocorrer excitação de elétrons de um orbital de menor energia para um orbital de maior energia. A radiação incidente de frequência (f) pode aumentar a energia da molécula em ΔE , em que (Equação 3):

$$\Delta E = hf \quad (\text{Eq. 3})$$

Um fóton pode possuir energia suficiente para excitar os elétrons de uma molécula, alterando sua configuração eletrônica. Se existir um orbital vazio na com energia apropriada, a radiação incidente pode excitar o elétron sendo, então, absorvida. O estudo da absorção da luz, portanto, dá informações sobre a estrutura eletrônica (e também vibracional) das moléculas. [2, 4].

Em moléculas orgânicas, os orbitais envolvidos nas transições eletrônicas, em geral, são os orbitais do tipo π (ligantes e antiligantes) e os orbitais do tipo n (não ligantes) enquanto que em moléculas inorgânicas além dos orbitais citados anteriormente estão também envolvidos nas transições eletrônicas os orbitais do tipo d. Para que uma molécula orgânica absorva energia na região do visível e apresente cor é necessário que esta apresente ligações duplas conjugadas em sua estrutura, na química diz que ligações duplas são conjugadas quando estas encontram-se separadas por uma única ligação simples. Sabe-se que a presença de ligações duplas conjugadas permite a ocorrência de deslocalização eletrônica, que ocorre quando os elétrons podem movimentar-se pelo sistema de ligações duplas conjugadas.

Segundo a teoria dos orbitais moleculares (TOM) uma ligação dupla ou tripla é formada a partir da sobreposição em paralelo de dois orbitais atômicos p, essa sobreposição dá origem a dois orbitais moleculares (orbitais π), sendo um ligante (denominado π) e outro antiligante (denominado π^*) [2, 3]. Quando ocorre a transição de um elétron de um orbital π ligante para um orbital π antiligante, temos uma transição que é conhecida como π - π^* . Como exemplo de transição do tipo π - π^* temos as transições que ocorrem em moléculas que apresentam como grupo cromóforo uma ligação dupla carbono-carbono (C=C). Essa transição eletrônica ocorre, em geral, na região do UV, quando a diferença de energia entre os orbitais ligantes e antiligantes é

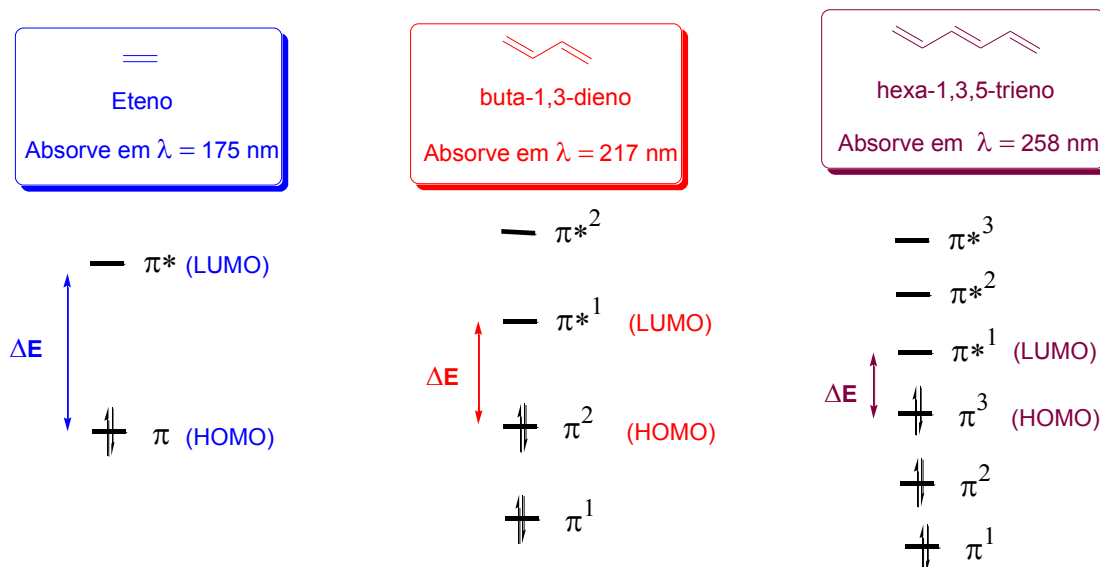


Figura 3. Influência da adição de ligações duplas conjugadas nos valores de energia necessários para que a transição π - π^* ocorra. HOMO: orbital ocupado de maior energia. LUMO: orbital molecular vazio de energia mais baixa. Adaptado[3].

Uma grande variedade de cores pode ser observada também para moléculas inorgânicas, em geral as transições eletrônicas que ocorrem em moléculas inorgânicas envolvem orbitais do tipo d, o que as diferencia das transições que ocorrem em moléculas orgânicas[3].

São conhecidos dois tipos de transições que envolvem os orbitais moleculares: a transição d-d e a transição de transferência de carga. Na primeira, um elétron é excitado de um orbital d com uma energia determinada, para um orbital d, com energia mais elevada. Como as diferenças de energia entre os orbitais d são pequenas, a luz visível tem energia suficiente para que essa transição ocorra. Na segunda, ocorre a migração de elétrons dos átomos ligados ao átomo central para o orbital d do metal ou vice-versa. Para que essa transferência ocorra é necessária uma absorção muito intensa

de energia, essa transição é responsável, por exemplo, pela forte coloração roxa dos íons permanganato, MnO_4^- [4].

A cor de uma substância resulta da soma das componentes da luz que a mesma não absorveu. Considerando que a substância absorva toda a radiação incidente, ou seja, absorva todos os comprimentos de onda, gera-se uma ausência de luz e a cor da substância será preta; caso a substância não absorva nenhuma radiação a cor da substância será branca. Uma substância apresenta cor verde se absorver todas as cores, exceto o verde. Levando em consideração as cores complementares, uma substância apresentará também apresentará cor verde se apenas a cor vermelha for absorvida. Pode-se dizer então que verde e vermelho são cores complementares. Quando uma substância absorve apenas o verde, a mesma apresenta a cor vermelha. Na Figura 4, é apresentada a roda das cores, o que possibilita a visualização das cores complementares que estão diametralmente opostas. O vermelho, o amarelo e o azul são cores primárias e a mistura delas produz a cor que na roda está entre elas[5].

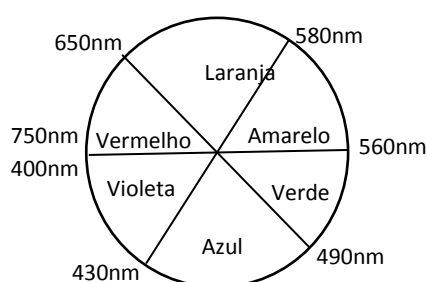


Figura 4. Desenho esquemático da roda das cores.

Atualmente o uso de substâncias que apresentam colorações características é indispensável em nossa sociedade. Nesse capítulo, abordaremos ainda as diferentes

definições para os corantes, a evolução histórica do uso destes compostos, as fontes de obtenção destas substâncias, bem como suas classificações.

2. Corantes: Conceitos e Classificações

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), corante é a substância ou a mistura de substâncias que possui a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimentos e bebidas[6].

De acordo com Solymosi e colaboradores, corantes possuem a propriedade de absorver a luz devido à presença de ligações duplas conjugadas em suas estruturas, e essa conjugação permite uma deslocalização de elétrons[7].

Já conforme a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), um cromóforo é a parte (átomo ou grupo de átomos) de uma molécula em que a transição eletrônica responsável por uma dada banda espectral está aproximadamente localizada. Este termo surgiu na indústria de tintas, referindo-se originalmente aos grupos presentes nas moléculas que são responsáveis pela cor do corante[8].

Existem milhares de corantes que são comercializados sob diferentes nomes, chegando a existir mais de 100 nomes para alguns. Dessa forma, se torna difícil reconhecer um corante específico de forma rápida e precisa. Vários sistemas de classificação para corantes são utilizados, entretanto os mais populares são aqueles baseados na estrutura química e na fonte de obtenção[9,10]. Além destas classificações, existe ainda a classificação dos corantes segundo a ANVISA que é a agência que regula o uso de corantes em alimentos no Brasil [6].

2.1. Classificação baseada na estrutura química

Dependendo da estrutura química dos corantes e da natureza dos cromóforos, os corantes podem ser classificados em 22 grupos. São eles: nitroso, nitro, monoazo, diazo, estilbeno, diarilmetano, triarilmetano, xanteno, acridina, quinolina, metina, tiazol, indamina, indofenol, azina, oxazina, tiazina, aminocetona, antraquinona, indigoide, fitalocianina e pigmentos inorgânicos[9].

Corantes naturais orgânicos pertencem a uma enorme variedade de classes químicas. São elas: indigoides, antraquinonas, naftoquinonas, flavonas, e carotenoides. Estas podem ser vistas na Tabela 1, com a respectiva fonte de obtenção do corante natural e a cor produzida.

Tabela 1. Classes químicas importantes dos corantes naturais. Adaptado [7].

Classes químicas	Fonte dos corantes naturais	Cor
Indigoides	Índigo (Indigoferatinctoria)	Azul
	Púrpura de Tiro (Purplehoemastroma/ Murexbrandaris)	Roxo azulado e roxo avermelhado
Antraquinonas	Garança (Rubia tinctorium)	Rosa, laranja, vermelho carmesim e marrom*
	Laca (Luccifer laca)	Vermelho, escarlate, carmesim e marrom*
	Kermes (Kermesvermilio)	Vermelho e roxo*
	Carmim de cochonilha (Coccusacti)	Carmesim, escarlate e rosa*
Naftoquinonas	Hena (Lawsoniainermis)	Amarelo ao marrom
Flavonas	Reseda(Resedaluteola)	Amarelo, laranja e verde oliva
Carotenoides	Annato (Bixaorellana)	Amarelo e laranja
	Saffron (Crocussativus)	Amarelo

*Indica cores diferentes com uso de diferentes mordentes.

2.2. Classificação baseada na fonte de obtenção

Existem duas fontes de corantes: uma natural e outra sintética. Corantes naturais são obtidos a partir de animais ou de qualquer parte de plantas como: raízes, cascas, frutos, folhas, madeira, fungos ou líquens. Já os corantes sintéticos são produzidos a partir de uma rota sintética[9].

Os corantes naturais podem ser divididos em duas classes diferentes dependendo da sua fonte de obtenção: aqueles que são obtidos a partir de fontes vegetais e os que são obtidos a partir de animais [11].

Corantes naturais obtidos a partir de fontes vegetais são oriundos de várias partes de plantas e ervas, os quais produzem diferentes tonalidades tanto no tingimento de fibras naturais quanto em fibras sintéticas. Ex: Açafrão e clorofila [11].

Corantes naturais obtidos a partir de animais são caracterizados pela formação de complexos metálicos. Constituem a classe dos corantes vermelhos mais importantes. Ex: Carmim de cochonilha e goma laca [11].

2.3. Classificação segundo a ANVISA

No Brasil, a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA, do Ministério da Saúde, com a RESOLUÇÃO CNNPA Nº 44, DE 1977, estabeleceu as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes utilizados na produção de alimentos e bebidas. Segundo essa resolução, os corantes são classificados como: corante orgânico natural, corante orgânico sintético (corante artificial e corante orgânico sintético idêntico ao natural) e corante inorgânico[6].

Corante orgânico natural é aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado. Ex:Curcumina, riboflavina e clorofila[6].

Corante orgânico sintético é aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado. Essa classe pode ser subdividida em: corante artificial e corante orgânico sintético idêntico ao natural[6].

Corante artificial é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais. Ex:tartrazina, vermelho 40 e eritrosina[6].

Corante orgânico sintético idêntico ao natural é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural. Ex: Betacaroteno, complexo cúprico de clorofilina e cataxanteno[6].

Já o corante inorgânico é aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.Ex: carbonato de cálcio e dióxido de titânio[6].

3. Breve histórico da utilização de corantes: da antiguidade aos dias atuais

A utilização dos corantes naturais é conhecida desde a antiguidade e eles desempenhavam um papel significativo em todas as civilizações. Eles eram usados para adorno pessoal, decoração de objetos, utensílios, pinturas e tingimento de têxteis[11-13].

Estima-se que o anil ou índigo (do lat. indicum), extraído da anileira, seja usado como corante há mais de 4000 anos, e alguns historiadores o consideram como o corante mais antigo [14]. Este possui cor azul e a sua molécula é formada por quatro

anéis encadeados que contêm, além de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, dois átomos de nitrogênio (Figura 5).

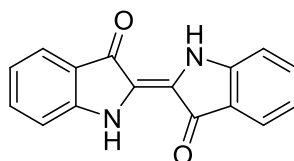


Figura 5. Estrutura química do índigo.

Durante muitos séculos empregaram-se exclusivamente corantes de origens naturais, até que um corante foi sintetizado pela primeira vez. Isso ocorreu em 1856, acidentalmente, quando William Henry Perkin obteve a mauveína (Figura 6), o primeiro corante sintético, quando fazia experimentos sobre a síntese da quinina, que é uma droga utilizada para combater a malária. Embora a mauveína tenha permanecido como um produto comercial por apenas alguns anos, iniciou-se então o desenvolvimento de uma nova e grande indústria, a indústria dos corantes sintéticos, em especial na Europa, um domínio que durou quase até o final do século XX. Desde essa descoberta, houve uma queda acentuada no uso de corantes naturais, porque aqueles que já estavam disponíveis no mercado não cumpriam as exigências advindas do mercado consumidor[11-13, 15].

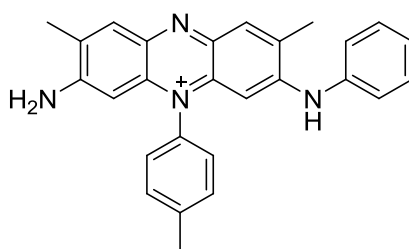


Figura 6. Estrutura química da mauveína.

Os corantes sintéticos são obtidos por síntese química em instalações industriais e têm a sua principal aplicação na indústria têxtil. Certas substâncias químicas utilizadas na síntese dos corantes sintéticos estão associadas a efeitos prejudiciais ao ambiente e a

repostas alérgicas, tóxicas, carcinogênicas e nocivas. Então, baseado no “EC Control of Substances Hazardous to Health Act”, em 1989, foram banidos alguns compostos químicos nos Estados Unidos e Europa, e, como resultado disso, tem ocorrido um renascimento do uso de corantes naturais[11].

Atualmente, devido à maior conscientização e preocupação da sociedade com questões relacionadas ao meio-ambiente e à saúde, os produtos ambientalmente benignos e não tóxicos têm recebido um maior destaque na pesquisa, produção e aplicação. Neste contexto, os corantes naturais ambientalmente seguros e não tóxicos reemergiram como uma alternativa viável da química verde em detrimento ao uso dos corantes sintéticos. Corantes naturais são obtidos a partir de fontes naturais como: plantas, insetos e animais gerando um pequeno impacto ambiental e são amplamente utilizados desde a antiguidade[11, 16].

Mesmo com esse ressurgimento do uso dos corantes naturais, estima-se que seu consumo mundial seja de 10 toneladas [17]. Em relação à tendência de mercado de corantes existe uma estimativa de uma escala global que movimentará \$ 940 milhões. Essa quantia total pode ser dividida entre: corantes sintéticos (\$400 milhões), corantes naturais (\$250 milhões), corantes idênticos aos naturais (\$189 milhões) e corantes caramelo (\$100 milhões)[18].

4. Corantes naturais verdes: clorofila e clorofilina cúprica de sódio

Corantes naturais podem ser definidos como corantes obtidos a partir de matéria vegetal ou animal que não tenha processamento químico envolvido.

Geralmente os corantes naturais são produzidos por extração por solvente e subsequente purificação a partir de fontes naturais. Existem três condições para um corante ser considerado natural: existir na natureza, a matéria-prima ser natural, e o

processo de extração não ser químico. As plantas, os insetos, as algas, os fungos e as bactérias são as principais fontes de obtenção de corantes naturais[7]. Além disso, os corantes naturais são produtos renováveis, sustentáveis, com o mínimo de impacto ambiental[16].

A utilização dos corantes naturais é feita desde a antiguidade, porém o desenvolvimento tecnológico tem possibilitado novos usos principalmente na indústria têxtil. Eles têm sido utilizados de forma bastante diversificada em acabamento funcional dos tecidos como: proteção antimicrobiana, proteção UV e ação repelente. Ademais, são amplamente empregados em alimentos, fármacos e cosméticos, como indicador de pH, em células solares e coloração histológica[16].

Corantes naturais verdes se resumem a clorofila e seus derivados. A clorofila é o principal pigmento vegetal responsável pela captura de luz solar, produção de oxigênio e açúcares através da fotossíntese. Essas propriedades a tornam de grande importância em meio aos pigmentos vegetais. Encontra-se clorofilanos tecidos vegetais vivos, especificamente nos cloroplastos em suspensão coloidal, estando a clorofila em sua maioria associada a proteínas e/ou carboidratos. Em geral, as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química[19-21]. A produção natural total de clorofilas na biosfera é estimada em $1,2 \times 10^9$ toneladas por ano (ton/a)[7, 11].

A clorofila tem atraído a atenção de muitos cientistas desde o passado. Em 1818, Pelletier e Caventou deram o nome à molécula. Em 1839, foi feita a primeira investigação química sistemática por Berzelius. Em 1859 foi postulada a relação entre a molécula da clorofilina e do pigmento do sangue (hemoglobina), e até 1891 acreditava-se que existia ferro na molécula da clorofila. A clorofila foi estudada

espectrofotometricamente por Stokes em 1864, que concluiu que existia a mistura de dois diferentes pigmentos. Estes pigmentos foram isolados por Sorby em 1873, através da partição em solventes (metanol e dissulfeto de carbono). Em 1906, Willstatter publicou vários trabalhos com métodos detalhados que poderiam isolar e particionar clorofilas a e b. A estrutura da clorofila a só foi completamente elucidada em 1960, sendo a síntese total realizada por Woodward e a determinação da configuração estereoquímica absoluta realizada por Fleming [19, 20].

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o Mg (magnésio). Este composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica muito insaturada constituída por quatro anéis de pirrol. Esses anéis numeram-se de 1 a 4 ou de “a” a “d” de acordo com o sistema de numeração de Fischer [22].

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. Existem cinco estruturas químicas diferentes que são caracterizadas como clorofilas (Chl), são elas: as clorofilas a, b, c, d e f. Interessantemente, as Chla, b e c foram descobertas no século 19, a Chld foi reportada em 1943, e a Chlf foi descoberta somente em 2010. A Chla está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. As bactérias fotossintetizantes não possuem a Chla e, em seu lugar, possuem a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A Chla é o pigmento utilizado para realizar a etapa fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), a Chlb é encontrada em muitas plantas e algas verdes, a Chlc é encontrada em diatomáceas, dinoflagelados e algas marrons, aChld é encontrada apenas em algas vermelhas, e a Chlf é encontrada em cianobactérias isoladas de estromatólitos na Austrália Ocidental. Os pigmentos c, d e f auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de

pigmentos acessórios. É muito difícil preparar a clorofila pura quimicamente e o produto comercial contém uma mistura de clorofilas a e b (razão 3:1). As demais clorofilas (c, d e f) não serão discutidas detalhadamente, pois não são utilizadas como corantes para alimentos [7, 11, 21-23].

As clorofilas a e b (Figura 7) são encontradas na maioria dos casos em conjunto. A fórmula molecular da clorofila a é $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$. Na clorofila b, no átomo de carbono 7 está presente o grupo funcional aldeído. Já na clorofila a, está presente o grupo metila. Sendo esta a única diferença estrutural entre elas.

A molécula de clorofila representada na Figura 7 é composta por uma parte hidrofílica cíclica, e por uma parte hidrofóbica, a cadeia fitol. Os segmentos mais hidrofílicos da macromolécula são o anel ciclopentenona e o grupo éster propiônico na posição 17 [21]. As clorofilas absorvem principalmente nas regiões azul e vermelha do espectro visível, e refletem em verde. Os fótons são absorvidos pelo sistema de duplas conjugadas do “macrocicloporfirínico” [7].

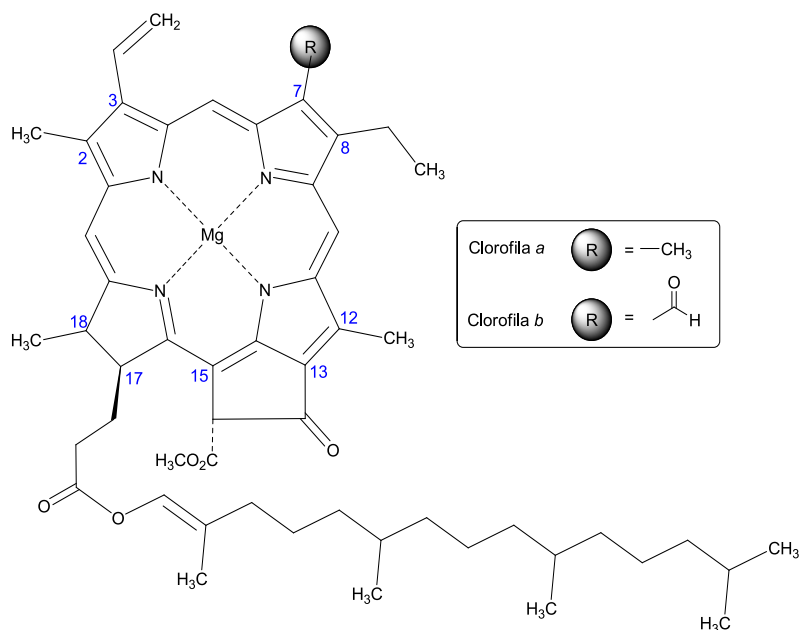


Figura 7. Estrutura química das clorofilas a e b.

Do ponto de vista estrutural, há uma relação muito próxima entre as clorofilas e as porfirinas: são ciclos tetrapirrólicos complexados com o íon magnésio. Dentro da classificação dos derivados porfirínicos, a clorofila pertence à classe das clorinas. Outra característica estrutural das clorofilas é a presença de um quinto anel, anexo aomacrocicloporfirínico. Este anel de cinco membros contém um grupo carbonílico de cetona e a presença deste grupo é suficiente para caracterizar o composto como clorofila, independentemente de suas cadeias laterais ou estados de oxidação[24].

Os métodos de extração da clorofila, originárias de plantas e algas, são considerados processos ineficientes ou dispendiosos. Apesar de serem conhecidos protocolos de síntese total desde 1960, para aplicações alimentícias, as clorofilas são extraídas a partir de urtiga, espinafre, alface e alfafa. As folhas de alfafa secas são a fonte primária da produção do corante alimentar, pois fornecem uma boa quantidade de clorofila de maneira economicamente viável. Recentemente, métodos e técnicas de

extração têm sido desenvolvidos com o uso de novas fontes como microalgas e cianobactérias [7, 25].

A extração do conteúdo de pigmentos foliares pode ser de caráter destrutivo ou não. O método destrutivo é o mais comum, utilizando solventes orgânicos, como a acetona 80% e o éter de petróleo. Adicionalmente, a natureza hidrofílica/hidrofóbica de uma substância influencia na escolha direta do melhor solvente para a sua extração. Na extração da clorofila, os solventes polares mais eficazes são acetona, metanol, etanol, acetato de etila e piridina, e os solventes apolares menos eficazes são hexano e éter de petróleo [19, 20, 22].

A utilização do solvente DMSO (dimetilsulfóxido) ao invés de acetona na extração de clorofila a e b em algas verdes têm sido mais eficazes. O método que emprega acetona é trabalhoso, sendo necessário fazer a maceração e a centrifugação. Por outro lado, o solvente DMSO requer apenas imersão do material foliar em um volume conhecido, sem etapas subsequentes [26].

A Figura 8 ilustra um processo geral de extração que é realizado em cinco etapas. Primeiramente a clorofila é extraída com solventes (acetona ou metanol), posteriormente é resfriada com nitrogênio líquido, refluxada e filtrada para separação do material de partida. Essas duas últimas etapas são repetidas inúmeras vezes. A purificação é feita em coluna cromatográfica de polietileno, as frações obtidas são repurificadas em colunas cromatográficas de açúcar e finalmente cristalizadas na presença de iso-octano [19, 20].



Figura 8. Processo de extração da clorofila.

A molécula de clorofila apresenta em sua estrutura diversos sítios passíveis de sofrerem reações químicas quando na presença de ácidos, bases ou enzimas. Os compostos formados quando a clorofila sofre tais reações apresentam características diferentes da clorofila, como por exemplo: solubilidade e cor. Essas reações são conhecidas como processos de degradação da clorofila e levam a formação de diferentes derivados dependendo das condições de reação[27].

Quando na presença de ácidos fracos ocorre uma reação do tipo ácido-base na qual os átomos de nitrogênio (sítios básicos) da clorofila são protonados com consequente remoção do átomo de magnésio, o produto dessa reação é a feotitina, um derivado de coloração verde-oliva, que apresenta baixa solubilidade em água (Figura 9).

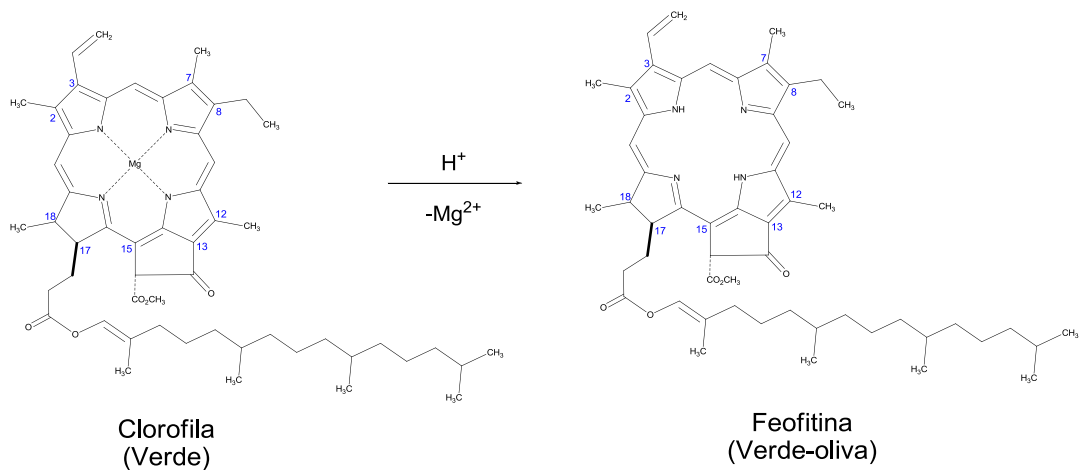


Figura 9. Degradação da clorofila em meio ácido.

Em meio básico ou na presença da enzima clorofilase o grupo éster da molécula de clorofila sofre uma reação de hidrólise na qual a cadeia fitol é removida, obtém-se ao final deste processo o derivado conhecido como clorofilida, de cor verde e mais solúvel em água que a clorofila (Figura 10).

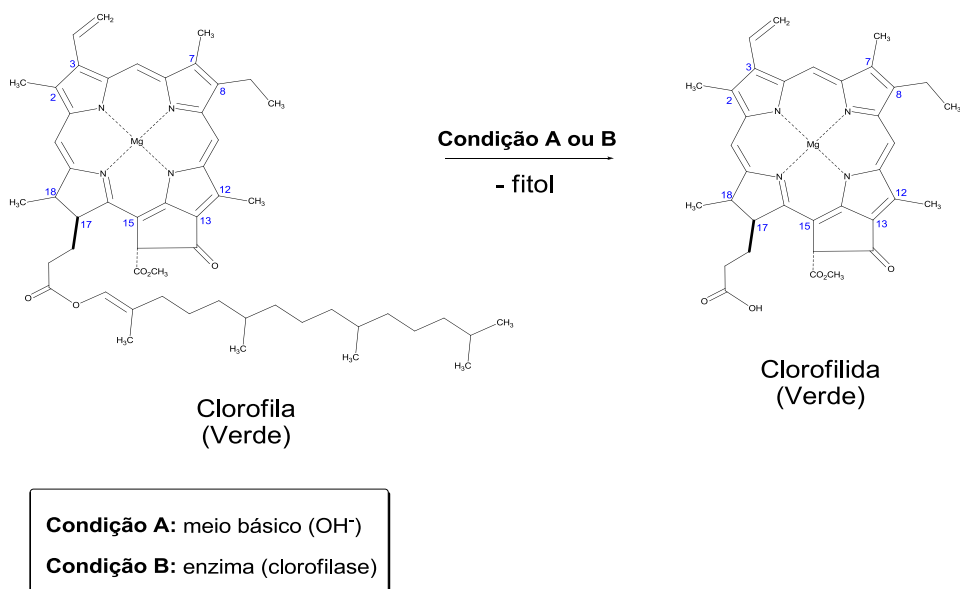


Figura 10. Degradação da clorofila em meio básico ou na presença da clorofilase.

A clorofilida quando em meio ácido pode sofrer ainda a perda do átomo de magnésio após protonação dos átomos de nitrogênio, resultando no derivado conhecido como feoforbídeo (Figura 11), que apresenta cor verde acastanhado e maior solubilidade em água que a clorofila.

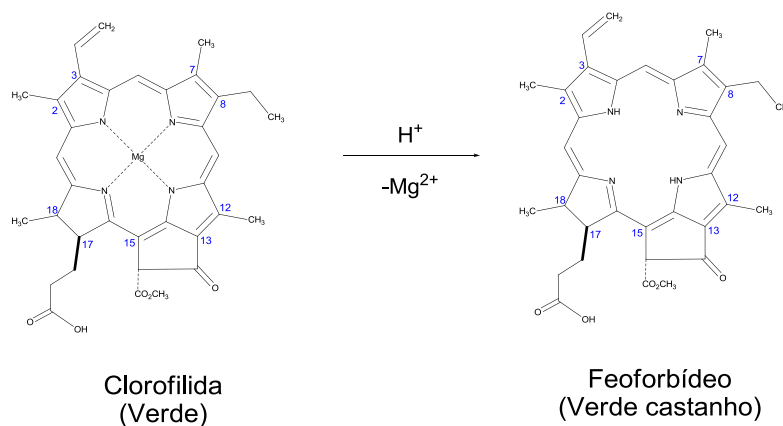


Figura 11. Degradação da clorofilida em meio ácido.

As clorofilas e as feofitinas são lipossolúveis, em decorrência de sua porção fitol, enquanto as clorofilidas e os feoforbídeos (sem fitol) são hidrofílicos[27].

As clorofilas podem ser decompostas pela alteração do valor do pH dos tecidos vegetais. O pH alcalino (9,0) torna a clorofila mais estável ao calor do que o pH ácido (3,0). Os íons positivos minimizam a permeabilidade da membrana, que entra em equilíbrio com as cargas negativas diminuindo, dessa forma, a degradação das clorofilas. Essa instabilidade da molécula pode alterar a sua cor, o valor comercial e as qualidades nutritivas[22].

Diversas vantagens tecnológicas são conseguidas através da substituição do átomo de magnésio na parte central da molécula de clorofila pelo átomo de cobre originando um derivado: a clorofilina cúprica como pode ser visto na Figura 12. São

elas: maior hidrofiliçidade, maior poder tintorial além de mais estabilidade frente à exposição à luz e a acidez[25].

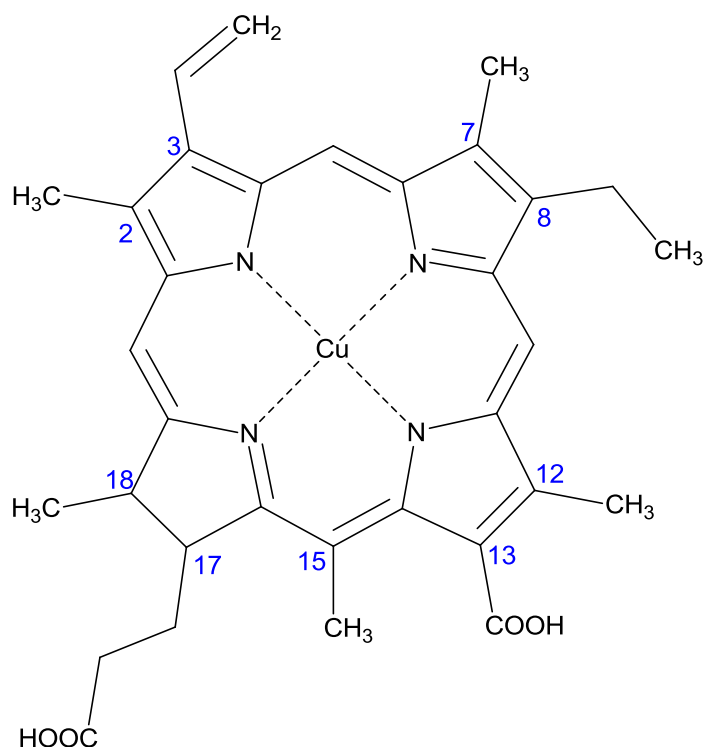


Figura 12. Estrutura química da clorofilina cúprica.

A obtenção da clorofilina cúprica é feita pela saponificação da molécula de clorofila em meio alcalino contendo hidróxido de sódio dissolvido em metanol, levando a abertura do anel ciclopentenona e remoção do grupo fitol. O magnésio é removido e substituído pelo cobre usando sulfato de cobre em meio ácido, aumentando assim a estabilidade da clorofilina[20, 25].

As moléculas de clorofila (Figura 6) e da clorofilina (Figura 12) são complexos. Na química definem-se os complexos como espécies que são formadas quando um ligante se une a um átomo central de metal. A clorofila e a clorofilina se diferenciam por possuírem como átomo central magnésio e cobre, respectivamente, mas possuem o mesmo ligante: o núcleo porfírico[4].

A maior estabilidade observada para a clorofilina do que para a clorofila, é decorrente da diferença de estabilidade entre os dois complexos que são formados por esses núcleos metálicos e o ligante[28].

Com auxílio de uma tabela periódica podemos ver que o átomo de magnésio se encontra no grupo 2 e o átomo de cobre no grupo 9. Os elementos do grupo 2, possuem distribuição eletrônica terminada no orbital s, enquanto que os elementos que estão contidos nos grupos de 3 a 11 são chamados metais de transição e possuem distribuição eletrônica terminadas no orbital d[4].

Em geral, átomos que possuem configurações eletrônicas terminadas em s como o magnésio apresentam tendência em formar complexos tetraédricos, que são complexos em que quatro ligantes ficam nos vértices de um tetraedro regular com um átomo de metal no centro conforme mostra a Figura 13 (à direita). Já átomos que possuem configuração eletrônica terminada em d, como o cobre, tem a tendência em formar geometrias planares que são complexos nos quaisos quatro ligantes estão nos vértices de um quadrado com o átomo de metal no centro conforme pode ser visto também na Figura 13 (à esquerda). Por outro lado, o núcleo porfirínico (ligante) tem uma estrutura rígida que contém 4 átomos de nitrogênio, doadores de elétrons, no mesmo plano e tende a formar complexos planares. Assim a formação de ligações tetraédricas pelo magnésio na clorofila com o núcleo porfirínico, leva a uma “condição de tensão” pois o átomo central e os ligantes possuem tendência a formar complexos com geometrias diferentes. Já na clorofilina, vemos que a condição de tensão é desfeita, ou seja, o átomo central de cobre e o núcleo porfirínico têm a tendência de formar complexos com geometrias iguais (planares)[28].



Figura 13. Complexo planar (à esquerda) e complexo tetraédrico (à direita).

A facilidade de preparação das clorofilinas cúpricas e das clorofilinas solúveis em água em valores de pH acima de 6,5 fazem destes pigmentos bons substitutos de corantes artificiais verdes[29].

Os produtos industrializados clorofila-Mg (E 140) e clorofila-Cu (E141) são ambos permitidos como aditivos de alimentos, embora a substância E141 tenha se mostrado mais estável do que a substância E140, levando-se em consideração a exposição a luz, oxigênio, temperatura, bissulfito de sódio, peróxido de benzoila e ácidos[22].

A separação e identificação dos componentes da clorofilina cúprica foram realizadas por diversas técnicas, como cromatografia de camada delgada (TLC), espectrometria de massas (EM), espectroscopia de infravermelho (IR), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS)[25].

A clorofilina cúprica de sódio tem sido associada a propriedades bioativas. Vários estudos foram compilados em uma revisão que avaliou a relação deste corante com possíveis benefícios a saúde. Sugere-se que este corante tenha atividades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas. Entretanto os mecanismos de ação não são conhecidos e a divergência na composição das clorofilinas comerciais faz com que esse assunto seja controverso e seja necessária a realização de maiores estudos[25].

Devido à importância da clorofilina como corante e da grande utilização de solventes orgânicos através dos métodos de extração tradicionais, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos verdes e neste contexto, os Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) despontam como um método promissor para extração e purificação deste corante.

5. Sistemas aquosos bifásicos

Em 1896 foi descoberta a formação de sistemas aquosos bifásicos (SABs) quando Beijerick misturou soluções aquosas de gelatina e ágar ou amido solúvel. Inicialmente formaram-se misturas turvas que após um tempo em repouso se tornaram duas fases líquidas límpidas. Apesar disso, apenas em 1950 foi reconhecido o grande potencial dos SABs para a aplicação à partição e purificação de materiais biológicos, moléculas orgânicas e inorgânicas. Somente em 1980 os SABs começaram a ser utilizados para a partição de íons[30].

Os SABs apresentam vantagens frente à extração líquido-líquido convencional (ELL). Uma vez que as técnicas de ELL fazem uso de solventes orgânicos, tóxicos e inflamáveis[30].

A utilização de SABs como técnica de extração é econômica e pode ser usada em larga escala para a extração e purificação de diversos analitos. Sua simplicidade técnica, facilidade de escalonamento, possibilidade de reutilização de reagentes, pequeno tempo de separação de fases e não toxicidade são atrativos para aplicações industriais e ambientais[31].

Os SABs podem ser formados por dois polímeros de estruturas químicas distintas, ou por um polímero/copolímero e um sal orgânico/inorgânico, ou por dois

surfactantes[32], ou por uma proteína e um polissacarídeo[33] ou até mesmo por um líquido iônico e um sal[34].

Dentre as possíveis constituições de um SAB, a forma mais comumente empregada é a formada por um polímero e um sal. A partir de uma determinada composição global, em porcentagem mássica (m/m%), um SAB é produzido. Na composição de ambas as fases formadas predominam água. Geralmente, a fase superior (FS) é rica em polímero e a fase inferior (FI), rica em sal, como mostra a Figura 14.

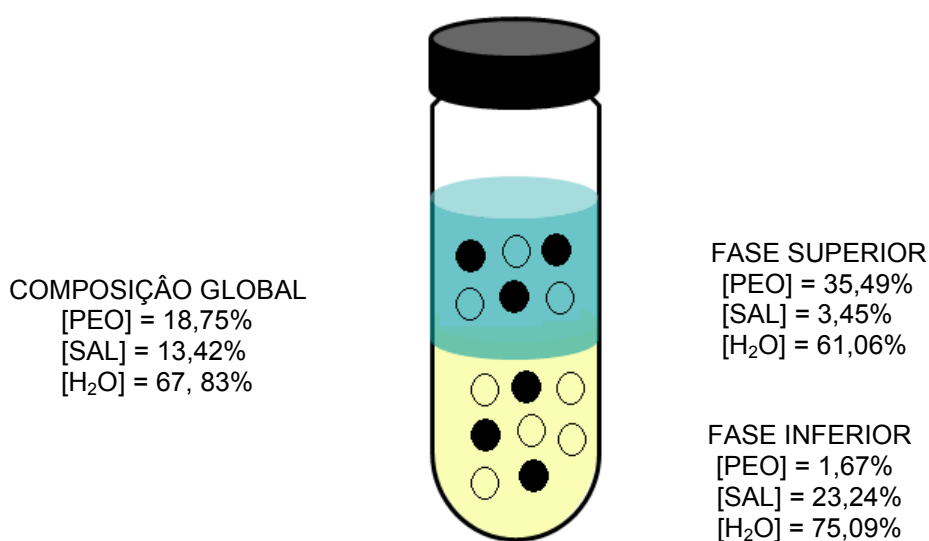


Figura 14. Composições químicas associadas a um ponto de mistura do sistema: PEO 1500/fosfato de potássio/H₂O a 25°C e pH =7.

A composição química das duas fases que se encontram em equilíbrio termodinâmico é geralmente representada em um diagrama de fase de coordenadas retangulares. Esta representação gráfica (Figura 15) é de grande importância para estudos de partição, pois é utilizada como ferramenta inicial para o desenvolvimento do processo de extração. Os dados estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema. O eixo das abscissas representa a concentração de sal e o eixo das ordenadas, a concentração de polímero, ambas em porcentagem mássica % (m/m). O

diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo ou heterogêneo [30, 35].

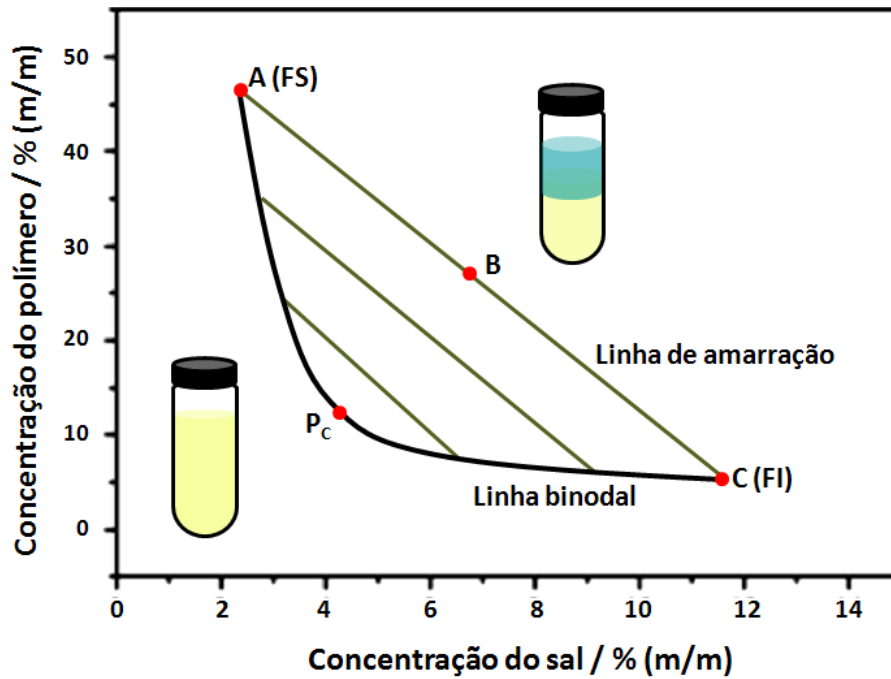


Figura 15. Diagrama de fase em coordenadas retangulares.

A Linha Binodal (LB) separa essas duas regiões. Na região abaixo dessa linha, o sistema é monofásico, já na região acima o sistema é bifásico. Apresentam-se também as linhas de amarração (LA) [30]. Essas linhas fornecem a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio (FS e FI) para uma determinada composição global (A) do sistema. O comprimento da linha de amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico que é utilizado para medir a diferença das propriedades intensivas entre as fases em equilíbrio [11]. É calculado em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase (Equação 4).

$$CLA = \sqrt{(C_p^{FS} - C_p^{FI})^2 + (C_s^{FS} - C_s^{FI})^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

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

Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases e aumentará a extração e/ou partição de soluto de interesse no SAB[35].

5.1. Teoria de formação dos SABs

Em 2000, da Silva e Loh propuseram um modelo qualitativo em nível molecular de formação dos SABs sempre diferenciando os fatores entrópicos dos entálpicos através do acompanhamento das mudanças de propriedades termodinâmicas do sistema (entalpia de solução, entalpia de diluição, raio hidrodinâmico e tensão superficial) até ocorrer à separação de fases[36].

Segundo este modelo, à medida que se acrescenta solução aquosa de sal (sulfato de lítio, por exemplo) em uma solução polimérica de poli(óxido) de etileno (PEO), a entropia do sistema aumenta devido à liberação de moléculas de água que estavam solvatando as unidades EO (óxido de etileno) da macromolécula e os íons, ocasionando a interação entre os cátions e a macromolécula, contribuindo assim para a homogeneidade do sistema. Então, ao redor de toda a macromolécula existe uma densidade de carga positiva, denominada pseudo-polication. Este por sua vez atrai eletrostaticamente os ânions. Essa interação ocorre até o momento em que os sítios da macromolécula se encontram energeticamente saturados. Caso essa interação continuasse a ocorrer apareceriam forças de repulsão de curto alcance (aproximação de cargas de mesmo sinal ou mudanças na conformação da macromolécula) desestabilizando o sistema. Então, a adição de mais solução aquosa de sal obriga os íons

a se concentrarem distantes da macromolécula, fazendo com que as moléculas de água retornem a solvatar a cadeia polimérica. Não existindo a possibilidade de ocorrer o ganho entrópico explicado anteriormente, estabelece-se uma situação de instabilidade termodinâmica. Então, o sistema não consegue manter-se homogêneo e ao mesmo tempo diminuir a energia livre de Gibbs, portanto acontecerá separação de fases. Nesse novo estado, o polímero é concentrado na fase superior e o sal na fase inferior, aumentando assim as interações polímero-polímero e sal-sal. Ocorre então a liberação das moléculas de água que estavam hidratando a macromolécula e o sal para regiões na solução que estão livres dessa influência, ocasionando mais uma vez um aumento de entropia[36].

No caso de formação de SABs constituídos por PEO e sulfato de sódio, o mecanismo é o mesmo. No entanto, existe também uma contribuição entálpica, já que a entalpia de transferência desse processo continua negativa depois da separação das fases sugerindo que esses íons (Na^+ e SO_4^{2-}) interagem mais entre si na presença de PEO do que em água devido a uma maior concentração local dos mesmos[36].

5.2. Teoria de partição de corantes em sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Suponhamos que as soluções de polímero e sal sejam parcialmente miscíveis à temperatura T formando as fases: FS (solução diluída de sal em água) e FI (uma solução diluída de polímero em água), quando agitados a T. Se adicionarmos clorofilina cúprica de sódio ao sistema, ele se distribuirá entre as fases FS e FI de modo a satisfazer: $\mu_c^{FS} = \mu_c^{FI}$. Considerando a escala de concentração, temos a Equação 5[37]:

$$\mu_c^{o,FS} + RT \ln \gamma_c^{FS} c_c^{FS} / c^o = \mu_c^{o,FI} + RT \ln \gamma_c^{FI} c_c^{FI} / c^o \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que $\mu_c^{o,FS}$ $\mu_c^{o,FI}$ são os potenciais químicos padrões da clorofilina nas fases superior e inferior, R é a constante universal dos gases, T é a temperatura, γ_c^{FS} γ_c^{FI} são os coeficientes de atividade da clorofilina nas fases superior e inferior, c_c^{FS} c_c^{FI} são as concentrações de clorofilina na fase superior e inferior e c^o é a concentração inicial da clorofilina.

Rearranjando a Equação 5, temos a Equação 6:

$$\ln(\gamma_c^{FS} c_c^{FS} / \gamma_c^{FI} c_c^{FI}) = -(\mu_c^{o,FS} - \mu_c^{o,FI}) / RT \quad (\text{Eq. 6})$$

A partir da Equação 6, obtemos a Equação 7:

$$K_c \equiv \frac{c_c^{FS}}{c_c^{FI}} = \frac{\gamma_c^{FI}}{\gamma_c^{FS}} \exp[-(\mu_c^{o,FS} - \mu_c^{o,FI}) / RT] \quad (\text{Eq. 7})$$

A grandeza $K_c \equiv c_c^{FS} / c_c^{FI}$ é o coeficiente de partição (ou coeficiente de distribuição) para a clorofilina no SAB. K_c não é exatamente igual à razão entre as solubilidades da clorofilina em solução polimérica e solução de sal porque as fases FS e FI e não são polímero puro e sal puro. A exponencial na Equação 7 é a relação $\Delta G^\circ = -RT \ln K^\circ$ para o processo de transferência da clorofilina entre as fases[37].

Quando as quantidades de clorofilina nas FS e FI mudam, também muda a razão entre os coeficientes de atividade na Equação 7, e as concentrações de sal na fase superior e inferior também mudam. Portanto, K_c depende de quanta clorofilina foi adicionada ao sistema e não é uma constante verdadeira a T e P constantes, a menos que FS e FI sejam soluções diluídas ideais. O valor de K é o valor correspondente a soluções muito diluídas de clorofilina em FS e FI, onde os coeficientes de atividade são muito

próximos de 1 e a composição das fases FS e FI são muito próximos do que seriam na ausência da clorofilina[37].

A distribuição desigual do corante entre as fases é resultante de interações entre o corante e as outras espécies (polímeros/copolímeros, água e sais) presentes nas fases em equilíbrio[35].

Diversas propriedades físico-químicas do sistema e do corante determinam o valor de K. Os fatores associados aos corantes que afetam essa distribuição são: o tamanho, estrutura química, a presença de carga elétrica e a hidrofobicidade. Já os fatores associados ao sistema são: a natureza química dos componentes formadores dos SABs, a massa molar dos polímeros, o pH e a temperatura [35].

Tendo como base a teoria de Flory-Huggins, Johansson e colaboradores desenvolveram uma série de equações usadas para identificar a força motriz que rege a partição de solutos nos SABs, ou seja, o transporte de matéria entre as fases do sistema[35, 38-40]. Nos próximos tópicos serão discutidos os fundamentos da teoria de Flory-Huggins e o modelo de Johansson e colaboradores.

5.2.1. Teoria de Flory-Huggins para soluções poliméricas

A teoria de Flory-Huggins é uma teoria que descreve o comportamento de soluções poliméricas. Em uma solução polimérica, o soluto é um polímero que apresenta uma massa molar muito maior do que a massa molar do solvente, portanto soluções poliméricas apresentam um grande desvio de comportamento quando comparadas a soluções ideais. Desta maneira, para entendermos os fundamentos da teoria de Flory-Huggins é necessário entendermos as propriedades de uma solução ideal[41].

A teoria das soluções ideais é um modelo de estudo de soluções que despreza as interações entre as diferentes moléculas presentes em uma solução. Para o cálculo da entropia de mistura ($\Delta_{mix} S$) de uma solução ideal considera-se que as dimensões das moléculas que compõem a solução são similares e a distribuição das mesmas, em solução, ocorre de uma forma aleatória, em que o soluto se distribui pelo solvente obedecendo a um modelo reticular (Figura 16).

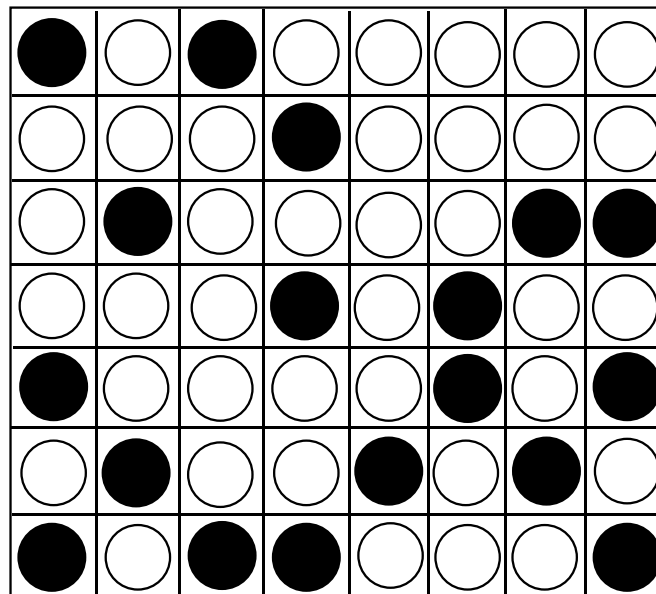


Figura 16. Modelo reticular de distribuição de uma solução ideal. As moléculas de um soluto (círculos pretos) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.

Para uma solução ideal como a descrita na Figura 16, as moléculas que compõem a solução podem ser trocadas de posição livremente, e o número de configurações possíveis para o sistema (Ω) é dado pela Equação 8:

$$\Omega = \frac{n_0!}{n_1! n_2!} \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que n_0 é o número de sítios do sistema, n_1 é o número de partículas do soluto e n_2 é o número de partículas do solvente.

O valor da entropia de mistura ($\Delta_{mix} S$) para uma solução ideal pode ser então obtido através da relação de Boltzman, que é dada na Equação 9:

$$\Delta_{mix} S = k \ln \Omega \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que k é a constante de Boltzman e Ω como definido anteriormente é o número de configurações possíveis para o sistema.

A Equação 9 pode ser reescrita empregando a aproximação de Stirling para a qual temos que $\ln(n!) = n \ln(n) - n$. Ao utilizarmos essa aproximação, temos que a entropia de mistura para uma solução ideal pode ser dada pela Equação 10:

$$\Delta_{mix} S = k[(n_1 + n_2) \ln(n_1 + n_2) - n_1 \ln(n_1) - n_2 \ln(n_2)] \quad (\text{Eq. 10})$$

Manipulando a equação Equação 10 obtemos a seguinte equação (Equação 11):

$$\Delta_{mix} S = -k(n_1 \ln(X_1) + n_2 \ln(X_2)) \quad (\text{Eq. 11})$$

Em que $\Delta_{mix} S$ corresponde a variação de entropia de mistura para uma solução ideal, k é a constante de Boltzman, n_1 e n_2 representam o número de moléculas de soluto e solvente, respectivamente, e X_1 e X_2 , as respectivas frações molares do soluto e do solvente.

Entretanto quando o soluto é um polímero, como os utilizados em SABs, o comportamento de uma solução se difere muito de uma solução ideal, e o modelo discutido acima não pode ser empregado. Para contornar essa diferença de comportamento entre uma solução polimérica e uma solução ideal foi desenvolvida em

1941 pelos cientistas P. L. Flory e M. L. Huggins a teoria que é conhecida como teoria de rede de Flory-Huggins[38, 41].

A teoria de Flory-Huggins considera uma macromolécula linear e flexível constituída de uma sequência de segmentos idênticos. Considerando que a macromolécula esteja em solução, a distribuição dos seus segmentos é feita numa rede tridimensional descrita pelo modelo de rede[38-40]. Cada segmento da macromolécula e cada molécula de solvente ocupam sítios da rede, ou seja, o volume do segmento da macromolécula é do mesmo tamanho do volume do solvente já que cada quadrado da rede possui o mesmo tamanho. Em uma solução polimérica, vários sítios adjacentes da rede são ocupados pela molécula polimérica, uma vez que esta é composta pela união de vários segmentos (Figura 17).

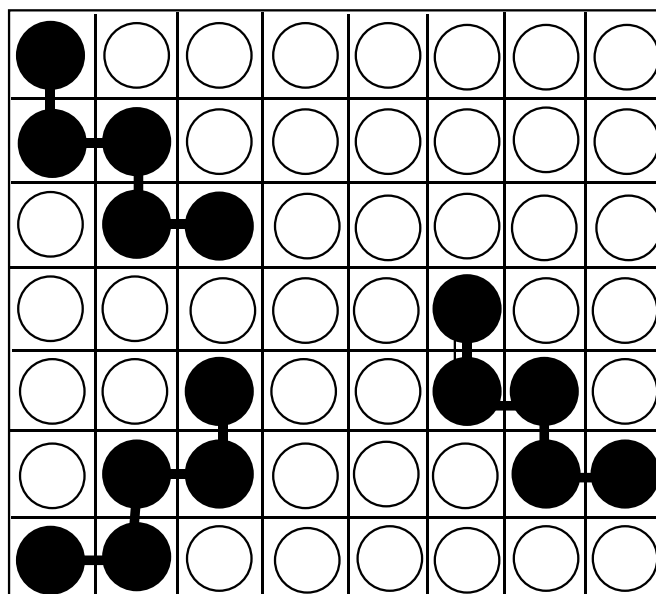


Figura 17. Modelo reticular de distribuição de uma solução polimérica. As moléculas de um soluto (círculos pretos) e de um solvente (círculos brancos) se distribuem segundo uma rede.

Relaciona-se esse formalismo com a dedução de uma equação matemática (Equação 12) que coloca a variação da entropia de mistura ($\Delta_{mix}S$) em função das frações volumétricas dos componentes da mistura:

$$\Delta_{mix} S = -k(n_1 \ln(\Phi_1) + n_2 \ln(\Phi_2)) \quad (\text{Eq. 12})$$

Em que k é a constante de Boltzman, e Φ_1 e Φ_2 são as frações volumétricas do solvente e do polímero respectivamente. Quando comparamos esta equação com a Equação 11 podemos observar que em uma solução polimérica não se deve usar as frações molares dos componentes para o cálculo da entropia de mistura, em seu lugar devem ser empregadas as frações volumétricas dos componentes[38, 39].

As frações volumétricas do solvente(Φ_1)e do polímero (Φ_2) podem ser calculadas pelas seguintes equações(Equação 13 e 14):

$$\Phi_1 = \left(\frac{n_1}{n_1 + n_2 m} \right) \quad (\text{Eq. 13})$$

$$\Phi_2 = \left(\frac{n_2 m}{n_1 + n_2 m} \right) \quad (\text{Eq. 14})$$

Em que n_1 e n_2 são o número de moléculas do solvente e do polímero, respectivamente, e m é o número de segmentos presentes na macromolécula.

A teoria de Flory-Huggins também faz previsões sobre a contribuição entálpica, sendo que, segundo esta teoria a entalpia é relacionada com as interações intermoleculares existentes entre os constituintes da solução polimérica e ocorre por formação ou quebra de pares potenciais[35, 39].

Segundo a teoria de Flory-Huggins a entalpia de mistura ($\Delta_{mix} H$) pode ser determinada pela seguinte equação (equação 15):

$$\Delta_{mix} H = z\Delta w_{12}y n_1 \Phi_2 \quad (\text{Eq. 15})$$

Em que Δw_{12} é a energia de contato associada a mistura do polímero com solvente, y é coeficiente de volume, obtido a partir da divisão do volume de uma molécula de polímero pelo volume de uma molécula de solvente e z é o número de coordenação, n_1 é o número de moléculas do solvente e Φ_1 é a fração volumétricas do solvente..

A partir da equação 15 Flory-Huggins definiram o parâmetro χ denominado parâmetro de interação de Flory-Huggins, este parâmetro pode ser calculado a partir da Equação 16, e seu valor corresponde a uma quantidade adimensional que caracteriza a energia de interações entre moléculas de polímero e solvente.

$$\chi = \frac{z\Delta w_{12}y}{kT} \quad (\text{Eq. 16})$$

Com a introdução do parâmetro de Flory-Huggins na Equação 17, temos que a entropia de mistura para uma solução polimérica será dada pela seguinte equação:

$$\Delta_{mix} H = kT\chi n_1 \Phi_2 \quad (\text{Eq. 17})$$

A partir das Equações 12 e 15, para o cálculo de $\Delta_{mix} S$ e $\Delta_{mix} H$, podemos obter então, o valor da energia livre de Gibbs de mistura ($\Delta_{mix} G$).

O valor de $\Delta_{mix} G$ é dado pela Equação 18.

$$\Delta_{mix} G = \Delta_{mix} H - T\Delta_{mix} S \quad (\text{Eq. 18})$$

E assim, quando substituimos as equações 12 e 15 na equação 18, concluímos que para uma solução polimérica o valor de $\Delta_{mix} G$ é dado por(Equação 19):

$$\Delta_{mix} G = kT[\chi n_1 \Phi_2 + n_1 \ln(\Phi_1) + n_2 \ln(\Phi_2)] \quad (\text{Eq. 19})$$

Os fundamentos da teoria de Flory-Huggins foram utilizados como base, para o desenvolvimento do modelo de Johansson e colaboradores que é utilizado para discutir quais forças motrizes levam um soluto a se particionar entre as fases dos SABs[35, 40].

5.2.2. Teoria de Johansson e Colaboradores

Johansson e colaboradores desenvolveram uma série de equações que são usadas para determinar quais parâmetros termodinâmicos regem o processo de transferência de matéria entre as fases dosSABs, ou seja, neste modelo são reconhecidas duas forças motrizes (contribuições) que podem levar um soluto a se particionar em um SAB: uma contribuição entrópica e uma entálpica[40, 42-44].

A contribuição entrópica é dada pela Equação 20, sendo que M_C é a massa molar do corante particionado, ρ é o número de sítios por unidade de volume, e n^{FS} ou n^{FI} é o número total de moléculas na fase superior ou inferior, que, quando dividido pelo volume V^{FS} ou V^{FI} , informa a densidade numérica da fase, respectivamente.

$$\ln K = \frac{M_C}{\rho} \left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}} \right) \quad (\text{Eq. 20})$$

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

A contribuição entálpica é dada pela Equação 21, sendo que Φ_i^{FS} e Φ_j^{FI} é a fração volumétrica de cada componente do SAB (i,j) na fase superior e inferior,

respectivamente; W_{is} é a energia potencial absorvida ou liberada quando um par corante-água, ou corante-polímero, ou corante-cátion, ou corante-ânion é formado. E W_{ij} é o valor da energia do par potencial formado pelos componentes (i,j) do SAB na ausência do corante.

$$\ln K = -\frac{M_C}{RT} \left[\sum_{i=1(i \neq C)}^3 (\Phi_i^{FS} - \Phi_i^{FI}) w_{iC} - \sum_{i=1(i \neq C)}^2 \sum_{j=i+1(j \neq C)}^3 (\Phi_i^{FS} \Phi_j^{FS} - \Phi_i^{FI} \Phi_j^{FI}) w_{ij} \right] \quad (\text{Eq. 21})$$

O primeiro termo da Equação 21 representa a diferença em todas as interações entre o corante e cada componente do sistema presente nas fases superior e inferior.

O segundo termo da Equação 21 representa a auto-energia das fases. Então, quando uma molécula de corante é transferida da FI para a FS, forma-se uma cavidade na fase que ela deixou e forma-se uma cavidade na fase em que ela entrará. Esse termo leva em consideração as interações intermoleculares rompidas e formadas entre os componentes do SAB. Em estudos anteriores, realizados com moléculas de mesmotamanho, foram obtidos valores de K muito diferentes, mostrando que esse termo não contribuiu muito para a partição[42-45].

5.3. Sistemas aquosos bifásicos utilizados para partição de corantes

Surpreendentemente as partições de corantes em sistemas aquosos bifásicos (SABs), apesar de possuírem um longo histórico, não foram extensivamente exploradas da forma como a partição e extração de íons metálicos e biomoléculas (proteínas e enzimas) tem sido exploradas[30]. A seguir encontra-se uma descrição cronológica da partição de corantes em SABs.

A partição do primeiro material pigmentado é conhecida desde 1954, quando Albertsson particionou cloroplastos em poli(óxido) de etileno. Desde as décadas de 1970 e 1980, moléculas que não são pigmentos e que também possuem “anéis

conjugados” em sua estrutura, que é uma característica comum aos corantes, foram particionadas em SABs e se concentraram na fase superior[46].Um resumo dos constituintes dos SABs que já foram utilizados somente para a partição de corantes naturais pode servisto na Tabela 2.

Tabela 2. Sistemas aquosos bifásicos que já foram utilizados para a partição de corantes naturais.

Corantes	Sistemas Aquosos Bifásicos		Referências
	Polímero	Sal	
Geniposídeo	PE 62 ^a	MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ NaHSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄	[47]
Betaláina	PEO 1500 ^b PEO 4000 ^b PEO 6000 ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄	[48]
C-ficocianina	PEO 1500 ^b PEO 4000 ^b PEO 6000 ^b	(NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ K ₃ PO ₄ Na ₂ SO ₄ C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	[49]
	PEO 20000 ^b	K ₃ PO ₄	
Carmim	PEO 1500 ^b PEO 6000 ^b PEO 10000 ^b PEO 35000 ^b L35 ^c	Na ₂ SO ₄	[42]
	PEO 1500 ^b PEO 6000 ^b PEO 35000 ^b	Li ₂ SO ₄	
Urucum	PEO 1500 ^b PEO 4000 ^b PPO 400 ^c L35 ^d	C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	[43]
	PEO 1500 ^b	C ₄ H ₄ O ₄ Na ₂	

^aPE62: 0,20 (fração mássica) óxido de etileno (EO); 0,80 (fração mássica) poli(óxido propileno)(PPO); ^bPEO: poli(óxido de etileno); ^cPPO: poli(óxido de propileno); ^dL35: copolímero tribloco (PEO)₁₁(PPO)₁₆(PEO)₁₁.

Na década de 1990, a partição de diversos corantes como: índigo carmim, amaranto, ácido carmínico, eritrosina, tartrazina e amarelo de quinoleína foram estudados em SABs formados por PEO 2000- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Valores dos coeficientes de partição (K) encontrados para todos os corantes foram muitos semelhantes, variando entre 1,4 e 2,46, portanto não se estabeleceu uma relação com as respectivas estruturas moleculares[46].

Durante esta mesma década, ainda foram extraídas porfirinas e corantes orgânicos em SABs formados por dois surfactantes, brometo de dodeciltrimetil amônio (catiônico) e dodecil sulfato de sódio (aniônico), em dois trabalhos distintos que se complementam[32, 50]. No primeiro trabalho, Tong e colaboradores deram um enfoque à aplicação deste novo sistema na extração das moléculas de antraquinona, vermelho de metila, azul de metileno, hematoporfirina, uroporfirina e metaloporfirina. A eficiência de extração (%E) foi de 100% para antraquinona e vermelho de metila, que são moléculas mais hidrofóbicas, e de 50% para azul de metileno, devido às cargas presentes e sua maior dissolução em água. Para as porfirinas a eficiência de extração variou de 33,8% a 95,7% devido à interação hidrofóbica do anel porfirínico com as micelas bem como a atração das cargas dos grupos carboxílicos dissociados com o excesso de carga positiva do brometo de dodecil trimetilamônio (C_{12}NE). Os principais fatores que governaram a extração foram as interações hidrofóbicas e eletrostáticas do soluto com as micelas presentes nas duas fases dos sistemas[32]. Já no segundo, Akama e colaboradores estudaram um mecanismo de partição das moléculas de clorofilina cúprica de sódio, hematoporfirina, vitamina B12, alaranjado de metila e violeta de metila. A eficiência de extração na fase superior variou de 40,6 a 99,9%. A clorofilina cúprica de sódio, a hematoporfirina e o violeta de metila foram extraídos para a fase superior. Já o alaranjado de metila é dependente do pH pois se concentra na fase superior em $\text{pH} > 7$ e

se distribui nas duas fases uniformemente em $\text{pH} < 3$. A vitamina B12 também se distribui nas duas fases quase uniformemente. Finalmente, os fatores que influenciaram a partição de uma substância em SABs foram a hidrofobicidade, pH e a carga da molécula particionada[50].

Em 2002, Pan e colaboradores elaboraram um processo de extração utilizando SABs para obtenção de geniposídeo a partir do fruto da gardênia. Foram analisados vários fatores incluindo a concentração de copolímero, concentração de sal e a adição de etanol. As melhores condições de extração (5% PE62, 7,5% KH_2PO_4 , 10% etanol) foram testadas em larga escala. Os valores de K variaram de 0,91 a 1,78. Este processo foi combinado com um tratamento simples com etanol para remoção do excesso de sal inorgânico[47].

Em 2001, Rito-Palomares e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a extração e purificação de ficocianinas que acoplou a ultrafiltração aos SABs. Neste trabalho os SABs eram formados por poli (óxido) de etileno PEO ($\text{MM} = 1000$ ou 1450 g mol^{-1}) com sulfato de sódio ou fosfato de potássio. As células foram submetidas a centrifugação, e o sobrenadante continha a ficocianina (extrato bruto). Este extrato passou por duas etapas de extração consecutivas nos SABs concentrando-se na fase superior, e as demais impurezas se concentraram na fase inferior. Um aumento no valor da CLA levou a um aumento na pureza do composto. O extrato foi submetido a uma etapa adicional de purificação utilizando uma membrana (3-kDa) para remoção do polímero PEO. O produto obtido foi submetido a uma precipitação com sulfato de amônio a 0°C [51, 52].

Em 2007, Patil e colaboradores elaboraram uma metodologia para partição e purificação de c-ficocianinas. Neste trabalho, foram analisados vários fatores que

influenciaram a partição, tais como a natureza e a concentração do polímero e do sal formador do SAB, o efeito do aumento da massa molar do polímero, o efeito do pH do sistema e o efeito da razão do volume de fase. Foi avaliado também o efeito de extrações sucessivas e sua influência na purificação das c-ficocianinas. Em SAB formado por PEG 4000/fosfato de potássio (pH 6), o aumento da CLA levou a um aumento na partição das c-ficocianinas, com o valor de K variando entre 15,23 a 780,29, indicando que elas se concentram na fase superior e as impurezas se concentram na fase inferior. Após as extrações foram feitas a ultrafiltração e a liofilização para obtenção da c-ficocianina em pó[49].

Também em 2007, Chetana e colaboradores utilizaram os SABs para purificação e concentração de betalaínas extraídas a partir da beterraba. Os açúcares aceleram a degradação das betalaínas, portanto os SABs são uma boa alternativa, pois removem também os açúcares sem etapas adicionais, já que a betalaína se concentra na fase superior e os açúcares na fase inferior. Foram avaliados diferentes efeitos como comprimento da linha de amarração, razão de volume de fase e concentração dos componentes dos SAB sobre o coeficiente de partição das betalaínas. Os valores de K variaram de 2,07 a 8,94. Adicionalmente, foram testadas extrações sucessivas em SABs (3 vezes). Os componentes individuais das betalaínas foram identificados, após a extração, por HPLC. As betalaínas foram separadas do polímero através de uma extração orgânica aquosa (água/clorofórmio), liofilizadas e armazenadas na forma de pó para uso posterior. Através de análise espectrofotométrica foi confirmado que o clorofórmio não trouxe nenhum dano ao pigmento[48].

Os trabalhos de Rito-Palomares, Ragaravao e Chetana e colaboradores foram os pioneiros em empregar esta etapa final de separação do corante dos demais componentes dos SABs[48, 49, 51, 52].

Em 2008, uma metodologia espectrofotométrica nova, simples e mais sensível foi desenvolvida para determinação de azul brilhante (FCF) em amostras de água e alimentos (confeitos de chocolate, doce de frutas, geleia de morango) utilizando SABs. Segundo Shiri e colaboradores foram avaliados os efeitos que afetam a eficiência de extração do FCF, como efeito do pH, efeito da massa molar do polímero, efeito da natureza do sal formador do SAB da temperatura e do tempo de centrifugação. É comum os dados de partição serem mostrados em função do comprimento da linha de amarração do SAB para cada efeito avaliado univariadamente, contudo foi mostrado apenas como o valor da absorbância varia para cada efeito [53].

Em 2010, Antelo e colaboradores purificaram também c-ficocianinas em SABs formados por poli(óxido) de etileno PEO (MM= 1500, 4000 e 6000 g mol⁻¹) e o sal fosfato de potássio, em valores de pH 6 e 7. Os valores do coeficiente de partição não puderam ser determinados, uma vez que a concentração da c-ficocianina na fase inferior estava abaixo do limite de detecção (10⁻⁵ mg mL⁻¹) [31].

Em 2009, e posteriormente em 2012, houve uma grande contribuição para a partição de corantes naturais. Mageste e colaboradores particionaram carmim e urucum, em diversos SABs convencionais formados por polímero/copolímero e sais orgânicos e inorgânicos [42, 43]. A partição de ambos os corantes foi explicada através da utilização do modelo de Johansson e colaboradores [40]. Os valores de K variaram de 10 a 300 para o carmim e de 15 a 140 para o urucum, mostrando o potencial de aplicação dos SABs para purificação destes corantes. Além disso, a otimização das variáveis do processo de transferência dos corantes em SABs foram feitas através do uso de quimiometria. Pela primeira vez, a entalpia de transferência para o urucum foi calculada utilizando a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), sendo também calculados os

demais parâmetros termodinâmicos ($\Delta_{tr}G$ e $\Delta_{tr}S$) do processo de transferência das moléculas do urucum da fase inferior para a fase superior dos SABs[43].

Em 2013, Han e colaboradores propuseram um método de extração e saponificação da clorofila a partir do excremento do bicho da seda. No estudo em questão a reação de saponificação da clorofila e a extração em um sistema bifásico formado por etanol e hidróxido de sódio foram realizadas simultaneamente. Para fins de comparação, as etapas de saponificação e extração do processo foram realizadas separadamente. O resultado obtido para o processo simultâneo se mostrou superior [54].

Em 2014, foram publicados os primeiros trabalhos de extração de corantes em sistemas aquosos bifásicos formados por líquido iônico (IL)-(ATPS) e sal[55, 56]. Sheikhan e colaboradores particionaram vermelho reativo 120, 4-(2-piridilazo)-resorcinol e alaranjado de metila embrometo de 1-butil-3metil-imidazol [C_4mim][Br] e fosfato de potássio. Os fatores que alteraram o processo de partição foram pH, temperatura e composição dos SABs. O líquido iônico utilizado foi reciclado utilizando-se um líquido iônico hidrofóbico hexafluorofosfato de 1-butil-3metil-imidazol [C_4mim][PF₆]. Os valores de K obtidos variaram de 3,2 a $4,6 \times 10^4$. Também foram calculados os parâmetros termodinâmicos da transferência destes corantes, embora os valores obtidos não tenham sido discutidos [55].

Uma nova proposta para remoção de corantes têxteis (cloranil, sudan III e índigo) de descargas aquosas usando (LI)-(SABs) formados por líquidos iônicos (fosfônio ouimidazol) e sais (sulfato de alumínio ou citrato de potássio) foi proposta por Ferreira e colaboradores. Avaliou-se a estrutura química do líquido iônico, natureza do sal e o pH. Foram determinados o coeficiente de partição e a eficiência de extração, com

valores em sua grande maioria tendendo a ∞ e 100% respectivamente. Também foi proposto um processo para reutilização do líquido iônico[56].

Em 2015, Alvarenga e colaboradores particionaram o corante têxtil amarelo ouro remazolRNL (AOR) em diferentes SABs convencionais formados por polímeros e sais e também em SAB formado por líquido iônico e sal. Foram avaliados alguns efeitos que alteram o valor do coeficiente de partição do AOR, tais como: efeito do cátion do sal formador do SAB, efeito da massa molar do polímero e efeito do ânion. Determinaram-se os coeficientes de partição, as variações da energia livre de Gibbs, e também a eficiência de extração do AOR em SABs. Interessantemente, em SABs convencionais o AOR se concentrou nas fases superiores dos sistemas; já em SABs formados por líquidos iônicos, o AOR se concentrou nas fases inferiores dos SABs. Utilizou-se efluente têxtil como solvente para a preparação do SAB com aproximadamente 100% de eficiência de extração do corante mostrando o potencial desse sistema para uso no tratamento de efluentes[44].

Até o presente momento são pouco conhecidos os fatores que levam a partição de corantes para fase superior dos SABs. Diante disso, devido à infinidade de corantes que existem no mercado e na natureza, e a particularidade do comportamento de cada um deles em SABs, este fenômeno da partição de corantes ainda precisa ser fortemente estudado.

5.4. Técnicas utilizadas na partição e determinação dos parâmetros termodinâmicos da clorofilina

5.4.1. Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta visível

Para determinação dos valores de coeficiente de partição (K) da clorofilina entre as fases dos sistemas aquosos bifásicos, é necessário determinar qual concentração de clorofilina está presente nas diferentes fases do sistema após o processo de partição. Neste trabalho empregou-se para tal propósito a técnica de espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível.

A espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta visível está baseada na medida de transmitância (T) ou absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes. A concentração de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância conforme a Lei de Lambert-Beer representada pela Equação 22. A Equação 22 é uma representação matemática desta lei[2].

$$A = -\log T = \epsilon bc \quad (\text{Eq. 22})$$

Em que A é a absorbância da solução, T é a transmitância da solução, ϵ é a absorvidade molar do analito, b é o caminho da radiação e c é a concentração do analito.

Através do uso de um espectrofotômetro de absorção obtêm-se espectros de absorção no visível e ultravioleta (UV). O espectro possibilita a avaliação quantitativa da absorção e analisa-se a capacidade de absorção da energia de uma molécula. A Figura 18 mostra um espectro típico de absorção para a molécula da clorofila. Neste espectro, observa-se que a clorofila absorve luz vermelha e azul, e reflete a luz verde presente na luz branca[4].

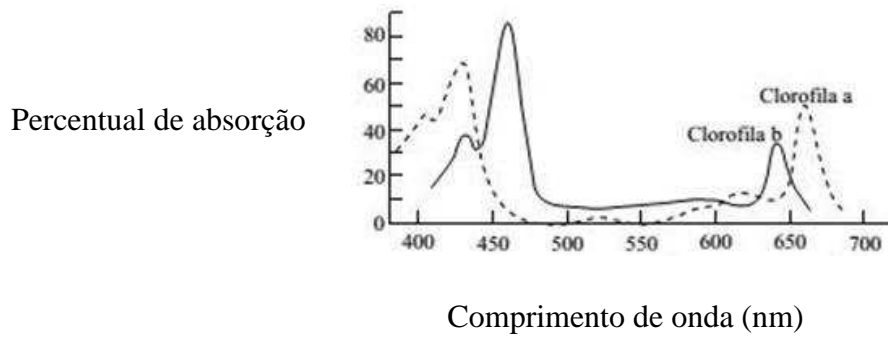


Figura 18. Espectro de absorção da clorofila a e b em um gráfico de percentual de absorção em função do comprimento de onda em nanômetros.

Neste trabalho foram medidas as absorbâncias das fases superiores e inferiores dos SABs e estes valores puderam ser relacionados às concentrações de clorofila nas fases do sistema.

O valor do coeficiente de partição da clorofila (K_c) é dado pela Equação 7 (pág 29).

$$K_c = \frac{c_c^{FS}}{c_c^{FI}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que c_c^{FS} e c_c^{FI} são as concentrações de clorofila na fase superior e inferior, respectivamente. Reescrevendo a Equação 22 obtemos a Equação 23.

$$c = \frac{A}{\epsilon b} \quad (\text{Eq. 23})$$

Substituindo a Equação 23 na Equação 7 obtemos a Equação 24:

$$K_c = \frac{A_c^{FS}}{A_c^{FI}} \times \frac{\epsilon_c^{FI} b^{FI}}{\epsilon_c^{FS} b^{FS}} \quad (\text{Eq. 24})$$

Essa equação pode ser simplificada a Equação 25, uma vez que a absorvidade molar da clorofilina nas fases superior (ϵ_c^{FS}) e inferior (ϵ_c^{FI}), bem como os valores do caminho da radiação nas fases superior (b^{FS}) e inferior (b^{FI}) são iguais. A partir da Equação 25, temos que os valores de coeficiente de partição de clorofilina (K_c) podem ser calculados diretamente a partir da razão das absorvâncias da fase superior e inferior do sistema de partição.

$$K_c = \frac{A_c^{FS}}{A_c^{FI}} \quad (\text{Eq. 25})$$

A Equação 25 foi a equação utilizada para determinar os valores de coeficiente de partição dos SABs estudados no presente trabalho.

5.4.2. Calorimetria de Titulação isotérmica

Nos últimos anos a calorimetria isotérmica de titulação (ITC) tem despontado como a técnica mais bem-sucedida para o estudo de interações. O princípio da ITC baseia-se nas técnicas de titulação e compensação de potência, e emprega os princípios da termoquímica em aplicações analíticas, sendo que esta mede a variação de entalpia de um sistema quando ocorrem alterações em sua composição[57].

O calorímetro ITC é isotérmico, sendo que este mede o calor a partir da energia elétrica necessária para manter uma diferença de temperatura constante entre as células de amostra e referência. Os valores de entalpia (ΔH) são medidos durante um processo de titulação em que a solução titulante é adicionada a solução titulada[57].

Um esquema típico de um calorímetro de titulação isotérmica é visto na Figura 19.

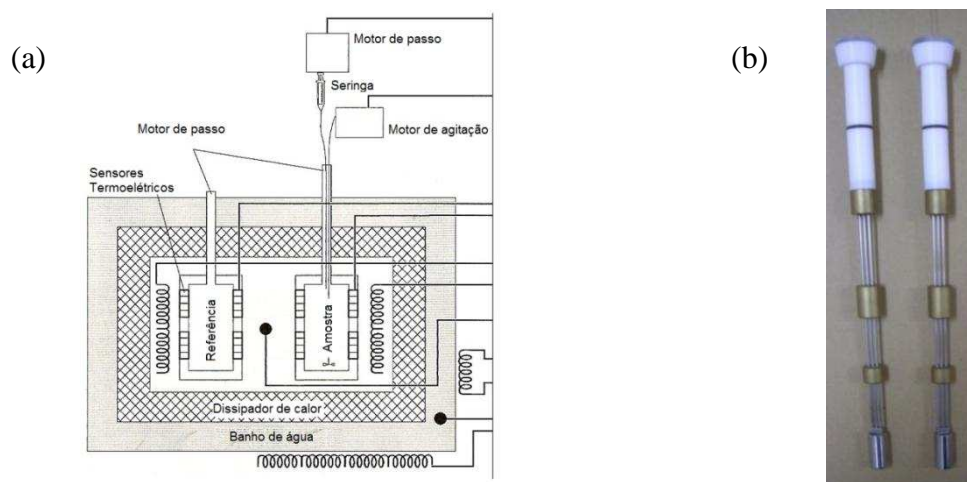


Figura 19. (a) Esquema interno do calorímetro e (b) torres e celas de amostra e referência.

Este equipamento possui uma cela de referência e uma cela de amostra de aproximadamente 1,8 mL e as celas são isoladas por uma parede adiabática e um banho termostático. A titulação é efetuada através da injeção de solução de titulante (em alíquotas que podem variar de 0,1-250 μ l) com auxílio de uma seringa de injeção para a cela de amostra preenchida com uma concentração conhecida de uma de amostra a ser titulada. Existe um motor de passo que controla as injeções e um agitador para assegurar a eficiência de mistura contínua a 350 rpm. Uma programação de injeção é realizada automaticamente usando um software interativo que permite configurar o número, o volume e o tempo das injeções. Os erros dos dados obtidos por ITC têm valor máximo de 5%.

Na Figura 20a, a título de exemplo, é apresentado os resultados obtidos no processo de titulação de um agente tensoativo não iônico em água (termograma), a

integração das áreas abaixo dos picos (Figura 20a) produz um perfil de entalpia mostrado na Figura 20b.

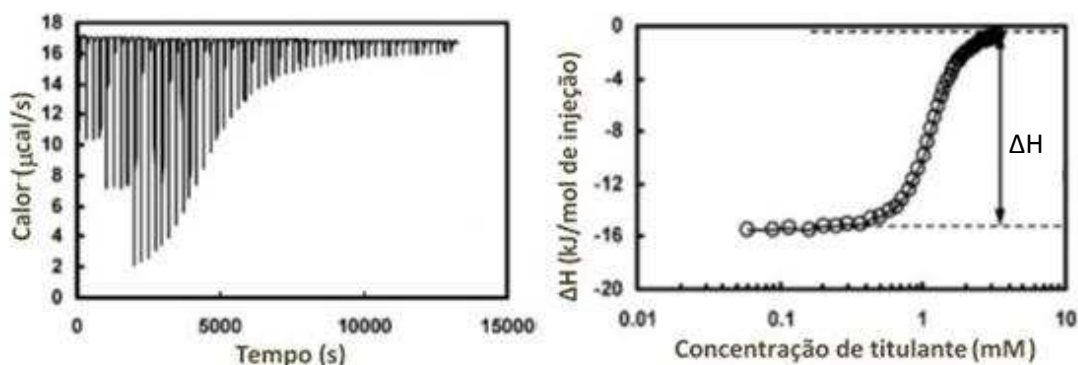


Figura 20. (a) Termogramada titulação de um agente tensoativo não iônico em água; (b) A integral da área dos picos (Figura 20a) fornece o valor de entalpia para cada injeção. Adaptado [57].

A diferença entre as duas partes horizontais da curva em forma de S (Figura 20b) tal como indicada é igual a ΔH [57].

O calorímetro ITC trabalha a T e P constante nessas condições, podemos considerar que a variação de entalpia é numericamente igual ao calor medido pelo calorímetro [37]. Essa relação matemática pode ser obtida a partir da primeira lei da termodinâmica ($dU = dq - PdV$), como pode ser visto a partir do desenvolvimento de equações mostrado abaixo:

$$\int_{U_i}^{U_f} dU = \int dq - \int_{V_i}^{V_f} PdV$$

$$\Delta U = q - P(V_f - V_i)$$

$$U_f - U_i = P(V_f - V_i)$$

$$(U_f + PV_f) - (U_i + PV_i) = q$$

Substituindo a relação $H = U + PV$ obtemos a equação desejada (Equação 26):

$$H_f - H_i = \Delta H = q \quad (\text{Eq. 26})$$

Em resumo, a técnica de ITC é versátil, extremamente sensível, a única exigência é que haja uma variação de entalpia durante o processo estudado. A técnica ITC comercial foi construída inicialmente para estudar as interações que ocorrem entre macromoléculas que estão presentes em sistemas biológicos. Por outro lado, o desenvolvimento da técnica ITC tem contribuído significativamente para a compreensão de diversos aspectos de interações em soluções poliméricas[57]. A técnica de ITC já foi utilizada para a compreensão das interações do fenômeno de partição do corante urucum em SABs, sendo que este trabalho serve como base para o estudo do processo de partição de clorofilina em SABs, objetivo do presente trabalho[43].

A variação de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H^o$) é uma grandeza termodinâmica fundamental que descreve a quantidade de energia na forma de calor liberada ou absorvida durante o processo de transferência da clorofilina da fase inferior para a fase superior[43]. Este parâmetro termodinâmico, em geral, pode ser determinado de duas formas[58]. A primeira forma é conhecida como aproximação de van'tHoff (VH), sendo que esta corresponde a uma medida indireta, em que a entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H_{VH}^o$) é obtida graficamente avaliando-se a dependência da constante de equilíbrio (K) em relação à temperatura (T). A segunda forma ser obtida através do emprego uma técnica calorimétrica, como por exemplo, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), o valor de entalpia de transferência ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$) é então determinado através de uma medida direta.

Embora ambos os métodos possam ser usados para determinar $\Delta_{tr}H^{\circ}$, a equivalência dos valores determinados calorimetricamente e pela aproximação de van'tHoff tem sido questionadas[59, 60].

Neste trabalho avaliamos os valores de entalpia de transferência da clorofilina cúprica de sódio entre as fases dos SABs, sendo que a título de comparação foram empregadas a aproximação de van'tHoff e calorimetria de titulação isotérmica.

5.4.3. Aproximação de van'tHoff

A aproximação de van'tHoff baseia-se na relação de dependência existente entre a temperatura T e a constante de equilíbrio K. Em um sistema quando a condição de equilíbrio termodinâmica é alcançada (quando $\Delta_{tr}G = 0$), temos que $\Delta_{tr}G^{\circ}$ relaciona-se com a constante de equilíbrio segundo a seguinte relação clássica da termodinâmica (Equação 26)[37, 61]:

$$\Delta_{tr}G^{\circ}(T) = -RT \ln K \quad (\text{Eq. 26})$$

Onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta em Kelvin e K é a constante de equilíbrio do sistema.

O valor de $\Delta_{tr}G^{\circ}(T)$ também pode ser escrito em função das contribuições entálpicas e entrópicas do sistema, conforme a Equação 18(página 35).

$$\Delta_{tr}G^{\circ}(T) = \Delta_{tr}H^{\circ}(T) - T\Delta_{tr}S^{\circ}(T) \quad (\text{Eq. 18})$$

onde $\Delta_{tr}H^{\circ}$ e $\Delta_{tr}S^{\circ}$ são as variações de entalpia e de entropia, respectivamente.

Ao igualarmos as equações 18 e 26 e isolamos o termo $\ln K$ encontramos a Equação 27.

$$\ln K(T) = \left(\frac{-\Delta_{tr}H^{\circ}(T)}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta_{tr}S^{\circ}(T)}{T}$$

Quando derivamos a Equação 27 em relação à $(1/T)$ obtemos a Equação 28, denominada aproximação de van'tHoff:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} \right) = \frac{-\Delta_{tr}H^{\circ}(T)}{R} \quad (\text{Eq. 27})$$

Vemos que pela aproximação de van'tHoff, o valor de $\Delta_{tr}H^{\circ}$ pode ser obtido graficamente, para tal um gráfico de $\ln K$ versus $1/T$ deve ser construído, e o valor de $\Delta_{tr}H^{\circ}$ em um determinado ponto é dado pelo produto da derivada da curva neste ponto pela constante universal dos gases R [59].

O curva de $\ln K$ versus $1/T$, fornece uma relação linear quando o valor $\Delta_{tr}H^{\circ}$ é independente da temperatura. No entanto, Boysen e colaboradores[62] mostraram que quando a entalpia e entropia são dependentes da temperatura, a curva de $\ln K$ versus $1/T$ fornece uma relação não linear que pode ser aproximada por um polinômio de segundo grau de acordo com a expressão:

$$\ln K = a + b \left(\frac{1}{T} \right) + c \left(\frac{1}{T} \right)^2 + d \left(\frac{1}{T} \right)^3 + \dots \quad (\text{Eq. 28})$$

onde T é a temperatura absoluta e a, b, c, d são parâmetros empíricos.

Quando derivamos a Equação 28 em relação a $1/T$ obtemos a Equação 29:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} \right) = b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + 3d \left(\frac{1}{T} \right)^2 + \dots \quad (\text{Eq. 29})$$

Igualando as Equações 27 e 29 temos a Equação 30, que é utilizada para calcular os valores de $\Delta_{tr}H_{VH}^{\circ}$ quando o gráfico de $\ln K$ versus $1/T$ apresenta uma relação não linear.

$$(\text{Eq. 30})$$

$$\Delta_{tr}H_{VH}^o = -R \left[b + 2c \left(\frac{1}{T} \right) + 3d \left(\frac{1}{T} \right)^2 \right] + \dots$$

A aproximação de van'tHoff baseia-se em um modelo de equilíbrio simples em que ocorre apenas um tipo de processo. Para sistemas em que estão presentes vários tipos de processos, as diferenças observadas na entalpia determinada calorimetricamente e por van'tHoff tem sido interpretadas indicando que o estudo é mais complicado do que um modelo em que o processo de transferência ocorre em apenas uma etapa. Em sistemas como os SABS, ocorrem múltiplos processos de transferência como: transferência de moléculas de água e de contra-íons entre as fases. Além disso podem ocorrer processos de solvatação e mudanças conformacionais. Uma vez que a ITC mede diretamente o valor de $\Delta_{tr}H^o$ detecta toda diferença no fluxo de energia na forma de calor proveniente de todas essas mudanças[57, 58].

6. Referências bibliográficas

- [1] M.J.M. J . Seixas de Melo , Ana Claro As moléculas da cor na arte e na natureza, Sociedade Portuguesa de Química, Série II Vol. 101 (2006) 44-55.
- [2] D.A.F.J.H.T.A.N. Skoog, Princípios de Análise Instrumental, Bookman, 2002.
- [3] G.B.C.S. Martins, R. R.; Suarez, P. A. Z., A Química e as Cores, in: Revista Virtual de Química, <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/download/1152/608>>, pp. 1508-1534.
- [4] P. Atkins, L. Jones, Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente, Bookman, Porto Alegre, 2006.
- [5] H.L.C. Barros, Química Inorgânica; uma introdução, SEGRAC, 1992.
- [6] ANVISA, RESOLUÇÃO - CNNPA N° 44, DE 1977, in, <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/29906780474588e892cdd63fbc4c6735/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf?MOD=AJPERES>.
- [7] K. Solymosi, N. Latruffe, A. Morant-Manceau, B. Schoefs, 1 - Food colour additives of natural origin, in: M.J. Scotter (Ed.) Colour Additives for Foods and Beverages, Woodhead Publishing, Oxford, 2015, pp. 3-34.
- [8] IUPAC GOLD BOOK, in, <<http://goldbook.iupac.org>>.
- [9] S. Nikfar, M. Jaberidoost, Dyes and Colorants, in: P. Wexler (Ed.) Encyclopedia of Toxicology (Third Edition), Academic Press, Oxford, 2014, pp. 252-261.
- [10] Colour Index in, <<http://www.colour-index.com>>.
- [11] B.H. Patel, 11 - Natural dyes, in: M. Clark (Ed.) Handbook of Textile and Industrial Dyeing, Woodhead Publishing, 2011, pp. 395-424.
- [12] M.E.M. Araújo, Corantes naturais para têxteis – da Antiguidade aos tempos modernos, in: Conservar Patrimônio,

<http://moodle.ciencias.ulisboa.pt/pluginfile.php/83484/mod_resource/content/1/4_corantes.pdf>, 2006/2007, pp. 37-49.

[13] A. Abel, 16 - The history of dyes and pigments: from natural dyes to high performance pigments, in: J. Best (Ed.) Colour Design, Woodhead Publishing, 2012, pp. 433-470.

[14] S. Har Bhajan, K.A. Bharati, 2 - History of natural dyes, in: H.B. Singh, K.A. Bharati (Eds.) Handbook of Natural Dyes and Pigments, Woodhead Publishing India, 2014, pp. 4-8.

[15] A.R.M.d. Oliveira, D. Szczerbowski, Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento, Química Nova, 32 (2009) 1971-1974.

[16] M. Shahid, I. Shahid ul, F. Mohammad, Recent advancements in natural dye applications: a review, Journal of Cleaner Production, 53 (2013) 310-331.

[17] V. Sivakumar, J. Vijaeeswarri, J.L. Anna, Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound, Industrial Crops and Products, 33 (2011) 116-122.

[18] A.D.P. Collins, Colouring our foods in the last and next millennium, International Journal of Food Science and Technology, 35 (2000) 5-22.

[19] A.P.J. Maestrin, C.R. Neri, K.T. de Oliveira, O.A. Serra, Y. Iamamoto, Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química, Química Nova, 32 (2009) 1670-1672.

[20] A.M. Humphrey, Chlorophyll, Food Chemistry, 5 (1980) 57-67.

[21] B.t. Schoefs, Determination of pigments in vegetables, Journal of Chromatography A, 1054 (2004) 217-226.

[22] N.M. Streit, L.P. Canterle, M.W.d. Canto, L.H.H. Hecktheuer, As clorofilas, Ciência Rural, 35 (2005) 748-755.

- [23] M. Chen, Y. Li, D. Birch, R.D. Willows, A cyanobacterium that contains chlorophyll f – a red-absorbing photopigment, *FEBS Letters*, 586 (2012) 3249-3254.
- [24] R.R.d.S. Soares, Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica, in: *Química, Universidade Estadual de Maringá*, 2006, pp. 81f.
- [25] T. Tumolo, U.M. Lanfer-Marquez, Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?, *Food Research International*, 46 (2012) 451-459.
- [26] A.C.F.S. Cruz, R. P.; Iarema, L.; Fernandes, K. R. G.; Kuki, K. N.; Araújo, R. F.; Otoni, W. C.; Métodos Comparativos na Extração de Pigmentos Foliares de Três Híbridos de *Bixa orellana* L., *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2007) 777-779.
- [27] M.Z. Miranda, NOTA DE ESCLARECIMENTO SOBRE SUCO OBTIDO A PARTIR DE FOLHAS JOVENS DE TRIGO, in, Embrapa, <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do15.htm>, 2002.
- [28] G. Raj, *Advanced Inorganic Chemistry*, Krishna Educational 2014.
- [29] D.E.F. Magalhães, Estudo de aplicação de corantes naturais (norbixina, curcumina e clorofila cúprica) para produção de papéis. , in: *Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa*, 2003, pp. 166f.
- [30] M.d.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons, *Química Nova*, 29 (2006) 1332-1339.
- [31] F.S. Antelo, A. Anschau, J.A.V. Costa, S. Kalil, Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* unconventional and integrated aqueous two-Phase systems, *Brazilian Chemical Society*, 21 (2010) 921-926.
- [32] A. Tong, Y. Wu, S. Tan, L. Li, Y. Akama, S. Tanaka, Aqueous two-phase system of cationic and anionic surfactant mixture and its application to the extraction of porphyrins and metalloporphyrins, *Analytica Chimica Acta*, 369 (1998) 11-16.

- [33] F. Jara, A.M.R. Pilosof, Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 374-380.
- [34] M.G. Freire, A.F.M. Claudio, J.M.M. Araujo, J.A.P. Coutinho, I.M. Marrucho, J.N.C. Lopes, L.P.N. Rebelo, Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 4966-4995.
- [35] L.H.M. da Silva, W. Loh, Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas, *Química Nova*, 29 (2006) 1345-1351.
- [36] 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), *The Journal of Physical Chemistry B*, 104 (2000) 10069-10073.
- [37] I.N. Levine, *Físico-Química*, Sexta Edição ed., LTC, Rio de Janeiro, 2012.
- [38] E.M.M. N., La Teoría de Flory–Huggins en la Ingeniería de Soluciones y Mezclas de Polímeros., *ContactoS* 68 (2008) 54–62.
- [39] G.M.d. Brito, Termodinâmica de partição do ânion $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ em sistemas aquosos bifásicos, in, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007, pp. 70
- [40] H.-O. Johansson, G. Karlström, F. Tjerneld, C.A. Haynes, Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1998) 3-17.
- [41] P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press, 1953.
- [42] A.B. Mageste, L.R. de Lemos, G.M.D. Ferreira, M.d.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, R.C.F. Bonomo, L.A. Minim, Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7623-7629.

- [43] 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, *Separation and Purification Technology*, 98 (2012) 69-77.
- [44] 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.
- [45] L.H.M. da Silva, M.C. Hespanhol 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, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 23540-23546.
- [46] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, K.R. Boaz, R.D. Rogers, Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 711 (1998) 237-244.
- [47] I.H. Pan, H.-H. Chiu, C.-H. Lu, L.-T. Lee, Y.-K. Li, Aqueous two-phase extraction as an effective tool for isolation of geniposide from gardenia fruit, *Journal of Chromatography A*, 977 (2002) 239-246.
- [48] S. Chethana, C.A. Nayak, K.S.M.S. Raghavarao, Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains, *Journal of Food Engineering*, 81 (2007) 679-687.
- [49] G. Patil, K.S.M.S. Raghavarao, Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin, *Biochemical Engineering Journal*, 34 (2007) 156-164.

- [50] Y. Akama, A. Tong, M. Ito, S. Tanaka, The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system, *Talanta*, 48 (1999) 1133-1137.
- [51] M. Rito-Palomares, L. Nuñez, D. Amador, Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76 (2001) 1273-1280.
- [52] K.S.M.S. Raghavarao, T.V. Ranganathan, N.D. Srinivas, R.S. Barhate, Aqueous two phase extraction—an environmentally benign technique, *Clean Techn Environ Policy*, 5 (2003) 136-141.
- [53] S. Shiri, T. Khezeli, S. Lotfi, S. Shiri, Aqueous Two-Phase Systems: A New Approach for the Determination of Brilliant Blue FCF in Water and Food Samples, *Journal of Chemistry*, 2013 (2013) 6.
- [54] J. Han, Y. Wang, J. Ma, Y. Wu, Y. Hu, L. Ni, Y. Li, Simultaneous aqueous two-phase extraction and saponification reaction of chlorophyll from silkworm excrement, *Separation and Purification Technology*, 115 (2013) 51-56.
- [55] L. Sheikhan, M. Akhond, G. Absalan, Partitioning of reactive red-120, 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, and methyl orange in ionic liquid-based aqueous biphasic systems, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2 (2014) 137-142.
- [56] A.M. Ferreira, J.A.P. Coutinho, A.M. Fernandes, M.G. Freire, Complete removal of textile dyes from aqueous media using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Separation and Purification Technology*, 128 (2014) 58-66.
- [57] K.C. Tam, E. Wyn-Jones, Insights on polymer surfactant complex structures during the binding of surfactants to polymers as measured by equilibrium and structural techniques, *Chemical Society Reviews*, 35 (2006) 693-709.

- [58] L.S. Mizoue, J. Tellinghuisen, Calorimetric vs. van't Hoff binding enthalpies from isothermal titration calorimetry: Ba²⁺-crown ether complexation, *Biophysical Chemistry*, 110 (2004) 15-24.
- [59] J. Tellinghuisen, Van't Hoff analysis of $K^\circ(T)$: How good...or bad?, *Biophysical Chemistry*, 120 (2006) 114-120.
- [60] J.R. Horn, D. Russell, E.A. Lewis, K.P. Murphy, van't Hoff and Calorimetric Enthalpies from Isothermal Titration Calorimetry: Are There Significant Discrepancies?†, *Biochemistry*, 40 (2001) 1774-1778.
- [61] J.W.C.M. G. Bruylants, Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2005) 2011-2020.
- [62] R. I. Boysen, Y. Wang, H. H. Keah, M. T. W. Hearn, Observations on the origin of the non-linear van't Hoff behaviour of polypeptides in hydrophobic environments, *Biophysical Chemistry*, 77 (1999) 79-97.

CAPÍTULO II

Partitioning thermodynamic of sodium copper chlorophyllin in aqueous two-phase systems

Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Av. PH. Rolfs, 36570-000, Viçosa - MG, Brasil.

*Corresponding author:

Phone: +55 31 38993052; Fax: +55 31 38993065. E-mail: luhen@ufv.br (L.H.M. da Silva)

Abstract

Aqueous two-phase systems (ATPSs) are an efficient, green, and safe methodology for the extraction and purification of natural dyes. However, the studies elucidating the interactions that govern the dye partitioning in these systems have been insufficient. Therefore, the driving forces governing the partition of sodium copper chlorophyllin (SCC) in ATPSs formed by polymer and salt were studied. The effects of the tie-line length, nature of the ATPS-forming components (polymer, salt and water), the temperature on the SCC partition coefficient (K) were evaluated, and the transfer thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H^o$, and $\Delta_{tr}S^o$) were obtained. The $\Delta_{tr}H^o$ values were obtained using isothermal titration calorimetry ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$) and the van't Hoff approach ($\Delta_{tr}H_{VH}^o$). The K values depended on the evaluated parameters and ranged between 0.36 and 347. For most systems, the SCC transfer to the ATPS top phase was exothermic, with $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ attaining values of up to $-77.57 \text{ kJ mol}^{-1}$. The transfer entropy change values suggested that the ATPS-forming components were simultaneously transferred to the bottom phase with the SCC transfer to the top phase.

Keywords: aqueous two-phase system, dye extraction, sodium copper chlorophyllin, microcalorimetry, transfer thermodynamic parameters

1. Introduction

The rare occurrence of natural dyes that are stable to light, pH, and temperature changes is a problem in the food, cosmetics, and textile industries because of the increasing consumer demand for natural products [1-4]. To overcome this problem, these industries have preferred to utilize semi-synthetic dyes as substitutes for synthetic dyes that have been found to be hazardous to human health [5, 6]. Sodium copper chlorophyllin (SCC) (Fig. 1a) is a stable semi-synthetic dye that is widely used as a green colorant and is a derivative of chlorophyll, which is a natural pigment abundantly found in all photosynthetic organisms, mainly in the form of chlorophyll a and chlorophyll b (Fig. 1b) [7].

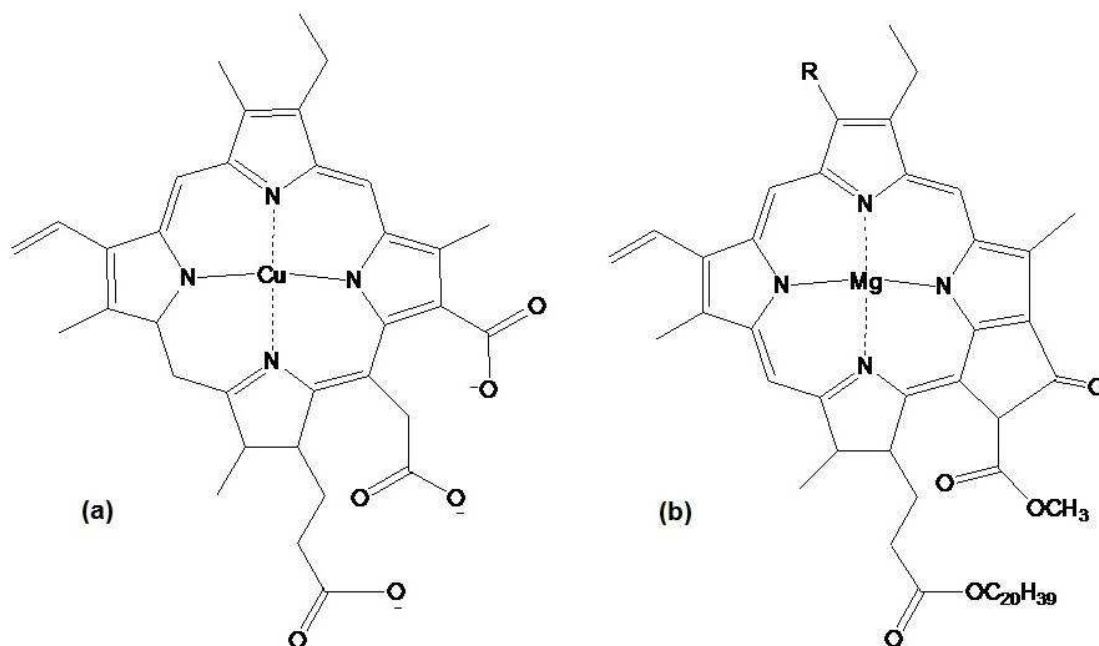


Fig. 1. Chemical structures of (a) sodium copper chlorophyllin (SCC) and (b) chlorophyll a (R = CH₃) or chlorophyll b (R = CHO).

The chlorophyll to SCC conversion increases the dye's tinctorial power, water solubility, and light stability, and improves its antimicrobial activity [7]. The SCC is obtained by the saponification of chlorophyll in an alkaline medium in the presence of a sodium copper salt. The magnesium atom naturally coordinated with the porphyrin ring in chlorophyll is replaced by a copper atom, and the long carbon chain of chlorophyll is simultaneously disrupted [8]. Despite the high yield of the chlorophyll to SCC conversion, the extraction methods for the dye are considered to be complex and inefficient and employ traditional liquid-liquid extraction that uses organic solvents [8, 9]. Thus, the development of efficient, environmentally safe, and nontoxic methodologies for SCC purification is required.

Liquid-liquid extraction based on an aqueous two-phase system (ATPS) arises as an alternative for new SCC purification methods. ATPSs are systems formed primarily of water (65%–90% in mass), along with two chemicals, which can be (i) two chemically distinct polymers [10, 11], (ii) a polymer and an electrolyte [12, 13], or two different electrolytes [14]. Under specific thermodynamic conditions, the mixture of these components generates two immiscible phases whose thermodynamic properties can be modulated to extract several chemicals. For example, ATPSs have been proposed for the purification and extraction of metal ions [15], biomolecules [16], antioxidants [17], and dyes [18-21].

The asymmetric distribution of dyes between the top and bottom phases of an ATPS has been known for at least twenty-five years, with dyes being used as affinity ligands for protein extraction [22]. However, the first studies investigating the potential use of ATPSs for the extraction of dyes emerged only in the beginning of the 21st century. The application of these systems to the extraction and purification of betalains from beetroot was demonstrated by Chethana et al. [18]. Using systems formed of poly(ethylene

oxide) and ammonium sulfate, the authors evaluated the effects of the tie-line length, phase volume ratio, addition of neutral salt to the ATPS, and pH on the partitioning behavior of betalains, obtaining up to 75% dye recuperation. Mageste et al. [19] confirmed the efficiency of ATPSs formed of poly(ethylene oxide) and inorganic salts in the extraction of dyes by obtaining partition coefficients for carmine dye as high as 300. In addition, for the first time, these authors applied ATPSs of block copolymers and inorganic salts to the extraction of a natural dye. The same research group [20] evaluated the partition/extraction of norbixin in similar ATPSs, and has been the only group until now to determine the driving forces responsible for the spontaneous transference of the dye. Recently, Han et al. [9] proposed a simultaneous aqueous two-phase extraction and saponification reaction method for chlorophyll from silkworm excrement for the preparation of SCC using an ATPS formed of ethanol, NaOH, and water. However, no study has investigated the use of an ATPS formed of polymers/copolymers and salt to extract SCC.

Because the determination of thermodynamic parameters associated with the dye transfer process in an ATPS is strategic to the optimization of its application in dye purification/extraction, the SCC partitioning thermodynamic behavior was determined. The dye partition coefficients in several ATPSs formed of polymer/copolymer and salt were measured, and the effects of different ATPS parameters (tie-line length, salt nature, macromolecular size, macromolecule hydrophobic/hydrophilic balance, and temperature) on the dye partition were investigated. The driving forces responsible for the SCC transfer process to the ATPS top phase were determined by obtaining the transfer thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H^o$, and $\Delta_{tr}S^o$). The $\Delta_{tr}H^o$ values were obtained using isothermal titration calorimetry ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$) and the van't Hoff approach ($\Delta_{tr}H_{VH}^o$) and compared.

2. Experimental

2.1. Materials

Poly(ethylene oxide) (PEO) with molar masses equal to 10000 and 35000 g mol⁻¹ and poly(propylene oxide) (PPO) with a molar mass of 400 g mol⁻¹ were purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA). PEO with a molar mass of 1500 g mol⁻¹ was supplied by Synth (São Paulo, SP, Brazil). L64 copolymer with a molar mass of 2900 g mol⁻¹ and a nominal composition of (PEO)₁₃(PPO)₃₀(PEO)₁₃ was purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium sulfate (Na₂SO₄, 99%), monohydrate lithium sulfate (Li₂SO₄·H₂O, 99%), sodium tartrate (C₄H₄O₆Na₂·2H₂O; 99%), and sodium hydroxide (NaOH; 97%) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). SCC [10% (m/m)] was a courtesy of Hansen Ind. Com. Ltda. (Valinhos, SP, Brazil). All chemicals were used without further purification. Distilled water was used in all experiments.

2.2. Preparation of aqueous two-phase systems and SCC partition

ATPSs were prepared in 50-mL falcon tubes by mixing stock aqueous solutions of a polymer (or copolymer) and salt. The stock solution concentrations were adequately chosen to obtain a global composition in accordance with the corresponding phase diagrams reported in the literature [12, 23-27]. At least four different global compositions were chosen from each phase diagram. Water with its pH adjusted to 13.00 was used to prepare all solutions. ATPSs were allowed to separate into two phases at (298.2±0.1) K for at least 24 h in a temperature-controlled bath (Microquímica, MQBTC 99-20, Brazil). For the PEO10000/Na₂SO₄/H₂O ATPS, the experiments were also performed at 303.2, 313.2, and 323.2 K.

For the partition experiments, after the ATPS had reached thermodynamic equilibrium, the top and bottom phases were separately collected, and 2.50-g aliquots of each phase were added to 10-mL glass tubes containing 5.00 μ L of 10% (m/m) SCC. Aluminum foil sheets protected all the tubes to prevent the photodecomposition of the dye. Systems without dye were utilized as blanks. The obtained systems were mixed using a vortex mixer (Certomat MV) and left in the temperature-controlled bath at (298.2 \pm 0.1) K (or 303.2, 313.2, and 323.2 K when the ATPS was PEO10000/Na₂SO₄/H₂O) for a minimum of 24 h to reach thermodynamic equilibrium. Aliquots of the top and bottom phases were collected and adequately diluted for a spectrophotometric analysis at 626 nm using a Shimadzu digital double beam spectrometer (UV-2550).

The SCC partition coefficient (K) was calculated using equation 1:

$$K = \frac{Abs^{TP} \cdot f^{TP}}{Abs^{BP} \cdot f^{BP}} \quad (1)$$

where Abs^{TP} and Abs^{BP} are the absorbances of the diluted aliquots of the top and bottom phases, respectively, discounting the absorbances of the correspondent blanks; f^{TP} and f^{BP} are the dilution factors of the top and bottom phases, respectively. Experiments were carried out in duplicate, and the standard deviations were lower than 10 %.

2.3. Determination of transfer thermodynamic parameters of SCC partition

2.3.1. Transfer Gibbs free energy change

The transfer Gibbs free energy change ($\Delta_{tr}G^o$), which was defined as the molar Gibbs free energy change associated with the SCC transfer process from the bottom phase to the top phase, was calculated in accordance with equation 2:

$$\Delta_{tr}G^{\circ} = -RT \ln K \quad (2)$$

where T is the absolute temperature, R is the universal gas constant, and K is the SCC partition coefficient.

2.3.2. Transfer enthalpy change

The enthalpy change associated with the transfer of the SCC from the bottom phase to the top phase was obtained using isothermal titration calorimetry (ITC) and the van't Hoff approach. In the first method, measurements were conducted in a microcalorimeter (CSC-4200, Science Corp. Calorimeter) controlled by ITCRun software and equipped with two reaction cells, one for a reference and the other for the sample, with a volume of 1.80 mL. These cells were filled with 0.90 mL of the bottom phase and 0.90 mL of the top phase and the mixture in the sample cell was titrated by six consecutive 25- μ L injections of the SCC solution [0.60% (m/m)] prepared in the bottom phase. The time interval between two consecutive injections was equal to 40 min, and a gastight Hamilton syringe (250 μ L) controlled by an instrument was utilized for the injections. A stirrer helix in the sample cell, stirring at 300 rpm, was used throughout the experiment. The raw data were recorded as power versus time curves, which were integrated to obtain the heat flow associated with the SCC transfer. Blank experiments involving the addition of the bottom phase without the dye were also performed, and they did not present a significant thermal effect. All experiments were conducted at (25.000 ± 0.001) °C.

The transfer enthalpy change in SCC was obtained from equation 3:

$$\Delta_{tr}H_{ITC}^o = \frac{\sum_{i=1}^6 q_{SCC,i}}{n_{SCC}} \quad (3)$$

where $q_{SCC,i}$ is the energy absorbed or released in the sample cell at the i th injection of the dye solution, and n_{SCC} is the amount of SCC transferred from the bottom to top phase. The subscript “ITC” refers to the $\Delta_{tr}H^o$ values determined by ITC.

The van't Hoff approach was used to determine the transfer enthalpy change in SCC in the PEO10000/Na₂SO₄/H₂O ATPS. The dependence of $\ln K$ on $1/T$ was fitted by a polynomial curve, as described on equation 4:

$$\ln K = a + b\left(\frac{1}{T}\right) + c\left(\frac{1}{T}\right)^2 + d\left(\frac{1}{T}\right)^3 + \dots \quad (4)$$

where T is the absolute temperature, and a, b, c, \dots are constants. Then, the $\Delta_{tr}H^o$ values were calculated by applying the non-linear van't Hoff equation:

$$\Delta_{tr}H_{VH}^o = -R \left[b + 2c\left(\frac{1}{T}\right) + 3d\left(\frac{1}{T}\right)^2 \right] + \dots \quad (5)$$

where the subscript “VH” refers to $\Delta_{tr}H^o$ values determined by the van't Hoff approach.

2.3.3. Transfer entropy change

After calculating $\Delta_{tr}G^o$ and $\Delta_{tr}H^o$, the SCC transfer entropy changes in the studied ATPS were determined using the following classic thermodynamics relation:

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

3. Results and discussions

3.1. Partition study of SCC in ATPS

All of the ATPSs evaluated here were previously reported, and their phase diagrams can be found in the literature. Regarding the ATPSs formed by macromolecules (polymer or copolymer), salt, and water, after mixing the three compounds under specific thermodynamic conditions, the systems spontaneously separate into two isotropic phases. Both phases have water as their primary component. However, whereas the bottom phase is rich in salt, the top phase is rich in the macromolecule, indicating the mutual exclusion between the salt and the macromolecule, and their high affinity for water, according to the model proposed by da Silva and Loh [28]. This distinct property of ATPSs makes them an alternative for the extraction and purification of SCC.

The preferential partition of a solute to a particular phase of an ATPS results from (i) the energetic balance of enthalpic intermolecular interactions between the solute and the different components present in each phase and (ii) the entropic change promoted by the solute partitioning process. Both enthalpic and entropic contributions depend on the thermodynamic parameter called the tie-line length (TLL), which can be calculated with equation 7:

$$TLL = \sqrt{(C_M^T - C_M^B)^2 + (C_S^T - C_S^B)^2} \quad (7)$$

where C_M and C_S are the macromolecule and salt concentrations, as percentages (m/m), respectively, and the T and B superscripts refer to the top and bottom phases, respectively.

Fig. 2 shows the SCC partition coefficient (K) as a function of the tie-line length (TLL) in an ATPS formed by PEO10000 and lithium sulfate, at 298.2 K.

The K values increase linearly as TLL increases ($K = -422.2 + 20.9(TLL)$; $R = 0.986$) in the TLL range evaluated. In addition, the SCC dye concentrates preferentially in the macromolecule-rich phase, with K attaining values of 10 a 350.

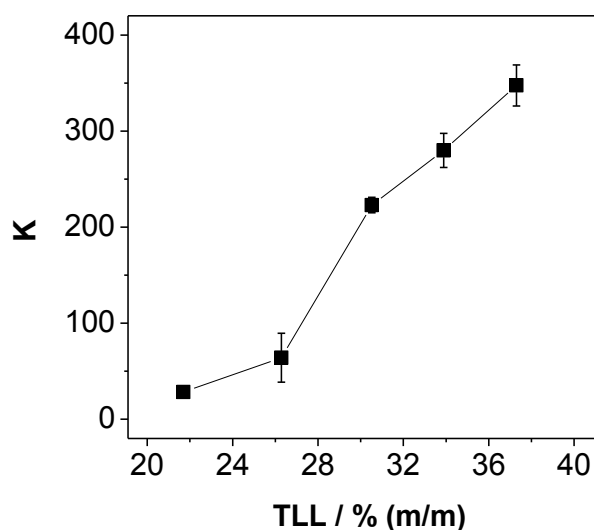


Fig. 2. Partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) for ATPS formed by PEO10000 + lithium sulfate + water, at 298.2 K and pH = 13.00.

The extraction of some dyes in ATPSs formed mainly by PEO macromolecules and different inorganic salts (Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , K_3PO_4) has been reported. For example, for betalains [18], the K values range from 2.07 to 8.94, showing the moderate efficiency of the ATPS for the purification of this natural dye. On the other hand, for carmine [19] and norbixin [20], the ATPSs show great purification efficiencies, with K values ranging from 10 to 300 for carmine and from 15 to 140 for norbixin. Our results compared with those demonstrate that PEO10000/ Li_2SO_4 / H_2O ATPS is also a strategic system for purifying SCC dye.

To understand the SCC partitioning behavior in the ATPS, we initially used a semi-quantitative model derived from the Flory–Huggins theory and developed by Johansson et al. [29]. Johansson’s model consists of simple analytical equations that express the partition coefficient as a contribution of two terms: one enthalpic and the other entropic. The contribution of entropy to the SCC partition is given by equation 8:

$$\ln K = \frac{M_{SCC}}{\rho} \left(\frac{n^{TP}}{V^{TP}} - \frac{n^{BP}}{V^{BP}} \right) \quad (8)$$

where M_{SCC} is the SCC molecular mass; n^{TP} and n^{BP} are the total numbers of particles in the top and bottom phases, respectively, which are divided by V^{TP} and V^{BP} , the volumes of the phases, to give the number densities of each phase; and ρ is the total number density of the system determined as the ratio between the total number of particles and the total volume of the system.

Equation 8 shows that the K values and consequently the system’s entropy will be highest when the SCC molecules concentrate in the phase with the highest number density, i.e., the phase with the largest number of configurations. All of the ATPSs investigated in this work had a bottom phase number density that was higher than the top phase number density, mainly due to the higher water content in the electrolyte-rich phase, as listed in Table 1. Thus, for the ATPSs studied here, the SCC concentration in the bottom phase is entropically favorable. However, the SCC partition in PEO10000/Li₂SO₄/H₂O ATPSs (Fig. 2) occurs spontaneously from the bottom to top phase ($K > 1$), that is, to the phase with the lower number of configurations, leading to a decrease in the system’s entropy. Thus, the SCC concentration in the macromolecule-rich phase is driven by an enthalpic factor.

Table 1. Differences in water concentrations between bottom and top phases of ATPSs investigated for SCC partition, at 298.15 K.

ATPS	$\Delta[\text{H}_2\text{O}] = [\text{H}_2\text{O}]_{\text{bottomphase}} - [\text{H}_2\text{O}]_{\text{top phase}} / \% \text{ (m/m)}$				
	TLL 1	TLL 2	TLL 3	TLL 4	TLL 5
PEO1500/ Na_2SO_4	17.10	16.78	18.58	22.13	23.32
PEO10000/ Na_2SO_4	13.35	17.49	21.27	22.42	23.97
PEO35000/ Na_2SO_4	13.75	15.77	19.51	20.56	21.62
L64/ Na_2SO_4	27.61	33.80	38.33	39.24	42.44
PPO400/ Na_2SO_4	24.72	37.34	45.81	52.35	54.14
PEO1500/ Li_2SO_4	17.35	19.88	22.42	24.65	27.69
PEO10000/ Li_2SO_4	16.69	18.07	18.45	19.18	18.53
PEO35000/ Li_2SO_4	23.64	25.60	28.64	30.92	31.85
L64/ Li_2SO_4	18.43	26.61	29.71	34.57	-
PEO1500/ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$	13.40	15.19	16.95	18.25	18.54
L64/ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$	23.30	29.33	31.48	35.95	37.28
PPO400/ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$	38.44	42.41	45.98	49.25	51.54

The enthalpic contribution to the SCC partition, in according with Johansson's model, is given by equation 9.

$$\ln K = -\frac{M_{SCC}}{RT} \left[\sum_{\substack{i=1 \\ (i \neq SCC)}}^3 (\Phi_i^{TP} - \Phi_i^{BP}) w_{iSCC} - \sum_{\substack{i=1 \\ (i \neq SCC)}}^2 \sum_{\substack{j=i+1 \\ (j \neq SCC)}}^3 (\Phi_i^{TP} \Phi_j^{TP} - \Phi_i^{BP} \Phi_j^{BP}) w_{ij} \right] \quad (9)$$

where ϕ_i^{TP} and ϕ_i^{BP} are the volume fractions of the ATPS-forming compounds (either water, salt, or polymer) in the top and bottom phases, respectively, and w_{ij} is the effective pair-wise interchange energy defined as follows:

$$w_{ij} = z \left[\varepsilon_{ij} - (1/2)(\varepsilon_{ii} + \varepsilon_{jj}) \right] \quad (10)$$

where z is the number of nearest neighbors, and ε_{ij} is the potential energy of an i - j pair.

According to equation 9, the enthalpic force that drives the SCC partitioning can be divided into two contributions. The first is associated with the term $\sum_{i=1}^3 (i \neq SCC) (\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}) w_{iSCC}$, which represents the difference between the SCC-ATPS's components intermolecular interaction energies in the top phase and the SCC-ATPS's components intermolecular interaction energies in the bottom phase, for all components. To decrease the system's enthalpy, the SCC molecules should concentrate in the phase enriched in component "i," which interacts more strongly with them (w_{iSCC} is more negative). Because our results showed that the SCC molecules are concentrated in the macromolecular-rich phase ($K > 1$), the SCC partitioning behavior in PEO10000/Li₂SO₄/H₂O ATPS is attributed to a specific enthalpic interaction between the SCC and the macromolecule. This specific enthalpic interaction explains the increase in the K values when TLL increases (Fig. 2), with a higher TLL value associated with a higher macromolecule concentration in the top phase, i.e., a higher concentration of the component that interacts more favorably with the SCC.

In addition, in accordance with Johansson's model, the SCC partitioning also depends on the energy needed to create a cavity where the dye will be allocated, and this energy is different for each phase, as expressed by the double summation in equation 9. In this one, the term $\sum_{i=1}^2 (i \neq C) \sum_{j=i+1}^3 (j \neq C) (\phi_i^P \phi_j^P) w_{ij}$ is the self-energy of the phase and expresses the total energy necessary to generate a cavity into which the

dye fits divided by the number of lattice sites in the phase. This energy will be higher with a higher molar volume for the solute. However, da Silva et al. [30] showed that the phase self-energy does not contribute to the partitioning behaviors of different solutes with same molar volume. Consequently, the behavior of the SCC partition can only be attributed to a specific enthalpic interaction between the SCC and macromolecule segments.

3.1.1. Effect of ATPS-forming electrolyte on SCC partition

Previous results have demonstrated that the electrolyte nature has a strong effect on the partitioning of several solutes in ATPSs [21, 27], including natural dyes [19]. In order to evaluate the cation and anion effect on the SCC partitioning, the dye extraction behavior was investigated in ATPSs formed by different electrolytes. Fig. 3 shows the SCC partitioning in PEO1500/Na₂SO₄/H₂O, PEO1500/Li₂SO₄/H₂O, and PEO1500/C₄H₄O₆Na₂/H₂O ATPSs.

In the ATPSs formed by the sulfate anion, the *K* values are higher for systems containing the Li⁺ cation compared with systems containing the Na⁺ cation. When the sulfate is changed to the tartrate anion in the systems formed by Na⁺, the *K* values decrease. Additionally, as TLL increases, the SCC partition coefficient increases, except when TLL increases from 46.36% to 51.67% (m/m) in the system formed by Li₂SO₄, for which the partition coefficient decreases.

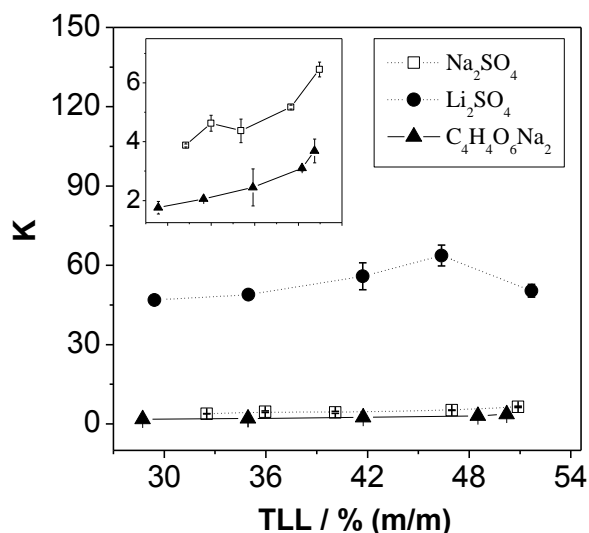


Fig. 3. Partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) for aqueous ATPSs formed by PEO1500, salt, and water, at 298.2 K and pH = 13.00. The inset shows the magnification of the anion effect on the K values.

The greater efficiency of the ATPS formed by the Li^+ cation at promoting the solute transfer from the bottom to the top phase was also observed in other studies. For example, the partition coefficients of the pentacyanonitrosylferrate(II) anion [27] and carmine dye [19] in aPEO1500/ Li_2SO_4 / H_2O ATPS were approximately ten times larger than K for the same solutes in a PEO1500/ Na_2SO_4 / H_2O ATPS. According to da Silva et al. [28], when PEO and sulfate salts are mixed with water to form an ATPS, cations interact with the ethylene oxide segments of the polymer, generating a positively charged macromolecular species called pseudopolycation. Because the Li^+ cations interact more strongly with the PEO compared with Na^+ cations, the Li^+ cations generate a more positively charged pseudopolycation. Thus, the stronger electrostatic attraction between the pseudopolycation (concentrated in the top phase) and the negatively charged dye when the cation is Li^+ favors the SCC transfer to the top phase.

The K values decrease in a system containing tartrate, which suggests a change in the balance of enthalpic interactions mainly between the SCC and the components of the salt-rich phase. The SCC-anion interaction is probably stronger for tartrate compared with the sulfate anion.

The K decrease when TLL increases (observed at higher TLL) in the system formed by PEO1500/Li₂SO₄/H₂O can be explained by the change in the entropic/enthalpic balance acting on the partition process of the SCC. When the TLL increases, the salt and water concentrations in the top phase (Table 1) diminish by a sufficient amount to cause, on average, a decrease in the positive charge density of the pseudopolycation, implying a reduction in the intensity of the EO-Li⁺/SCC interactions. At the same time, according to Johansson's model, we can expect that the entropic force that drives the SCC partition to the bottom phase (the phase with the higher number of particles) increases as a result of the increase in $\Delta[\text{H}_2\text{O}]$ (Table 1).

3.1.2. Effect of polymer molar mass on SCC partitioning

To verify the contribution of the polymer configurational entropy caused by different macromolecular sizes on the preferential transfer of SCC in ATPSs, the effect of the PEO molar mass was investigated. Fig. 4 shows the influence of the PEO molar mass on the partition coefficient of SCC for systems formed of PEO/Na₂SO₄/H₂O with polymeric molar masses equal to 1500, 10000, and 35000 at 298.2 K. The effect of the polymer molar mass on the SCC partitioning was also evaluated in an ATPS formed by Li₂SO₄ salt, and similar results were obtained.

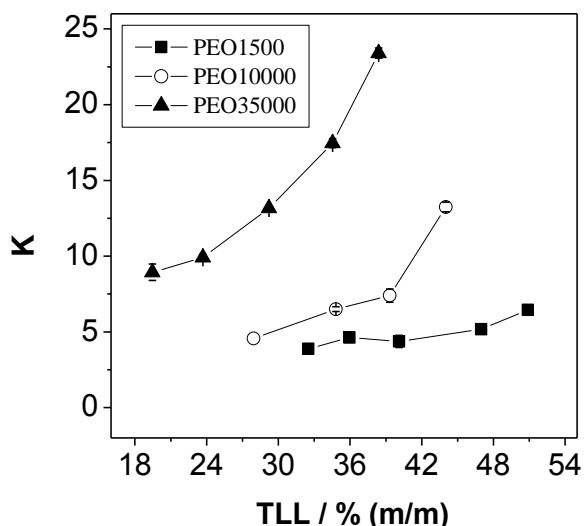


Fig. 4. PEO molar mass effect on partition coefficient (K) of SCC versus tie-line length (TLL) in ATPSs formed by sodium sulfate salt, at 298.2 K and pH = 13.00.

For all the macromolecular sizes, the TLL increase promotes an increase in the K values. Additionally, the partition coefficient of SCC increases in the following order:

$$K_{PEG1500} < K_{PEG10000} < K_{PEG35000}.$$

In general, the polymer molar mass increase promotes a decrease in the preferential transfer of a solute from the bottom phase to the top phase [31, 32] because the covalent binding of a large number of macromolecular segments decreases the number of different possible configurations for the macromolecules in the system, mainly in the macromolecule-rich phase. Thus, there is an entropic loss caused by the solute concentration in that phase. Despite this unusual behavior, some results in the literature corroborate our data by showing an increase in the K values as the macromolecular size increases [17].

Because Johansson's model cannot explain the macromolecular size effect on the SCC partition behavior, thermodynamic parameter measurements are needed for better comprehension. The transfer thermodynamic parameters are presented and discussed in section 3.2.

3.1.3. Effect of macromolecule hydrophobicity on SCC partition

The specific interaction between the SCC and polymer segments has contributions from the van der Waals, electrostatic, and hydrophobic interactions. To determine the hydrophobic contribution to the SCC partition, the dye partition behavior in the PEO1500/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ATPS was compared with those in the PPO400/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ and L64/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ ATPSs. The SCC partitioning in the systems PEO1500/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, PPO400/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$, and L64/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ is shown in Fig. 5.

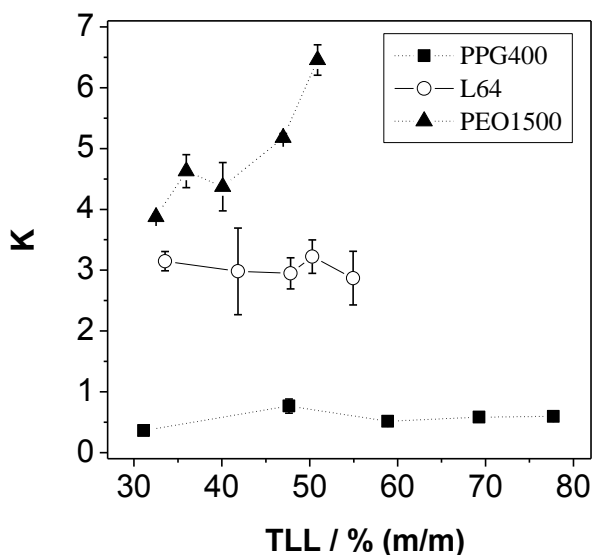


Fig. 5. Effect of macromolecule hydrophobicity on SCC partition coefficient (K) as function of tie-line length (TLL) for ATPSs formed by sodium sulfate salt, at 298.15 K and $\text{pH} = 13.00$.

The K values decrease when the hydrophobicity of the macromolecular-rich phase increases, i.e., $K_{\text{PEG1500}} > K_{\text{L64}} > K_{\text{PPG400}}$. In addition, in the PPO400/ $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ system, SCC concentrates preferentially in the bottom phase ($K < 1$), showing the strong effect of the macromolecule hydrophobicity on the SCC

partition. A preferential concentration of SCC in the ATPS bottom phase was also observed in systems formed by PPO and $C_4H_4O_6Na_2$ (data not showed). Finally, in the ATPS formed by PEO1500, the K values increase with the TLL, whereas in systems formed by L64 and PPO400, the K values remain almost constant for all values of TLL.

The hydrophobic effect on the SCC partitioning can be expressed by the difference in hydrophobicity among the macromolecule-rich phases. The PEO-rich phase is more hydrophilic than the L64-rich phase, which is less hydrophobic than the PPO-rich phase. This is attributed to the different compositions of the macromolecules: PEO is only composed of ethylene oxide units ($-CH_2CH_2O-$; EO); PPO consists of propylene oxide units ($-CH_2(CH_3)CH_2O-$; PO); and the L64 triblock copolymer is composed of 60% (m/m) PO units and 40% (m/m) EO units. The PO segments interact weakly with water molecules, rendering the macromolecules composed of these units more hydrophobic than macromolecules formed by EO units, which interact favorably with water molecules [28]. The presence of both EO and PO units in the L64 macromolecules render them amphiphilic molecules, with the ability to form spherical micelles with a hydrophobic core (formed by PO blocks) and a hydrophilic corona (formed by EO blocks) [33], which are able to solubilize hydrophobic solutes in their hydrophobic core.

The smaller partition coefficients of SCC observed in the ATPS formed by L64 compared with those obtained in the ATPS formed by PEO1500 indicate that the SCC is not solubilized in the hydrophobic core of the L64 micelles. In the ATPS formed by PPO, the preferential concentration of SCC in the salt-rich phase shows that hydrophobic interactions do not contribute to the SCC partition behavior. All these results confirm that SCC interacts specifically with the EO units of the macromolecule.

3.1.4. Temperature effect on SCC partitioning behavior

To evaluate the ATPS potential for SCC purification/extraction, the effect of temperature on the K values should also be known. Fig. 6 shows the SCC partition coefficient versus temperature curves for systems formed by PEO10000 and sodium sulfate at TLL values equal to 34.82% and 44.01% (m/m).

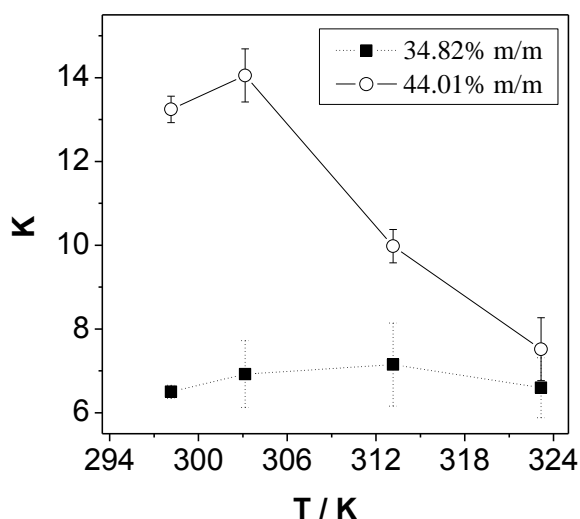


Fig. 6. SCC partition coefficient (K) versus temperature curves at different tie-line lengths of ATPS formed by PEO10000, sodium sulfate, and water, at pH 13.00.

The profile of the K versus temperature curves depends on the TLL values. For a smaller TLL [34.82% (m/m)], there is very little change in the K value with temperature. On the other hand, for a TLL equal to 44.01% (m/m), when the temperature increases from 298.2 to 303.2 K, the K value increases slightly, reaching a maximum of 14.05. A further increase in temperature promotes a decrease in the SCC concentration in the top

phase. From these results, the temperature increase from 298.2 K does not improve the SCC extraction to the ATPS top phase.

3.2. Transfer thermodynamic parameters of SCC in ATPSs

To enhance the potential application of ATPSs to the extraction and purification of SCC, we should determine the driving forces governing the SCC transfer from the bottom phase to the top phase in different systems. For this purpose, the transfer thermodynamic parameters associated with SCC partitioning were obtained in the different ATPSs studied here.

The van't Hoff approach was used to calculate the enthalpic contribution to SCC partitioning in the system formed by PEO10000 and sodium sulfate. Fig. 7a presents the natural logarithm of K versus the inverse of the absolute temperature ($1/T$) for two different TLLs of that system. The obtained curves were fitted by a second order polynomial equation, and the $\Delta_{tr}H_{VH}^0$ values were determined using equation 5 for different temperatures (Fig. 7b).

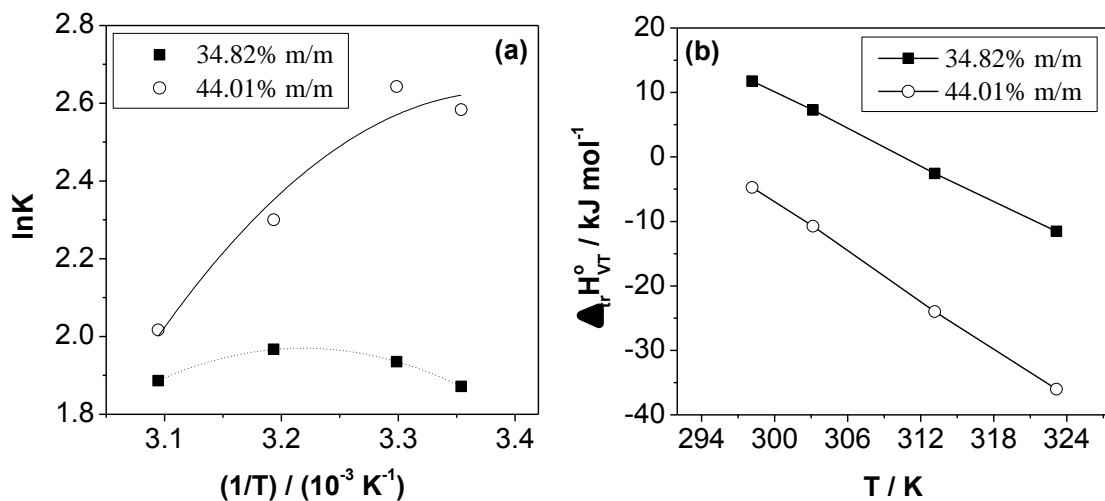


Fig. 7. (a) $\ln K$ versus $1/T$ and (b) SCC transfer enthalpy change obtained by van't Hoff approach ($\Delta_{tr}H_{VH}^0$) versus T curves for SCC partition at different tie-line lengths of

ATPS formed by PEO10000, sodium sulfate, and water. The lines are the polynomial curves fitted to experimental data.

The $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ values decrease linearly with the temperature increase for both TLLs. In addition, the $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ values are higher for the smaller TLL. For the TLL equal to 34.82% (m/m), $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ changes from positive to negative when the temperature increases, but $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ is always negative for the TLL equal to 44.01% (m/m), indicating that the temperature affects the delicate balance of interactions among the ATPS-forming components and the SCC.

Comparing $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ and the transfer enthalpy change obtained by using ITC ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$) can provide more complete thermodynamic information about the transfer process of the SCC dye [34, 35]. Therefore, the $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ values in an ATPS formed by PEO10000 and sodium sulfate with TLL values of 34.82% and 44.01% (m/m) were determined using ITC at 298.2 K. For the TLL equal to 34.82% (m/m), $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ and $\Delta_{tr}H_{VH}^o$ were -0.31 and 7.27 kJ mol⁻¹, respectively. For the TLL equal to 44.01% (m/m), these values changed to -1.18 and -10.77 kJ mol⁻¹, respectively.

The $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ values were very different from those obtained by the van't Hoff approach. Generally, when the values of the transfer enthalpy change obtained directly by ITC are equal to those obtained by the van't Hoff approach ($\Delta_{tr}H_{VH}^o = \Delta_{tr}H_{ITC}^o$), the process under investigation occurs between two states only. However, when those parameters are different ($\Delta_{tr}H_{VH}^o \neq \Delta_{tr}H_{ITC}^o$), the process is considered to be a multi-step process [36]. Thus, our results show that the SCC extraction involves other molecular changes (a multi-step process) such as a macromolecular conformation change and water and ion transfers between the top and bottom phases.

Because ITC is a powerful technique that makes it possible to directly determine the energy absorbed or released in a specific thermodynamic process [20, 37, 38],

the SCC transfer enthalpy changes were determined for other ATPSs using this technique. The $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ values, as well as those of $\Delta_{tr}G^o$ (equation 2) and $T\Delta_{tr}S^o$ (equation 6), are listed in Table 2. The transfer thermodynamic parameters were determined for the higher TLL value of some of the ATPSs studied here because under this thermodynamic condition, the differences between the intensive thermodynamic properties of the top and bottom phases are intensified. Consequently, the thermodynamically driven force governing the SCC partitioning behavior can be highlighted.

Table 2. Transfer thermodynamic parameters of SCC in different ATPSs studied for higher TLL value.

ATPS	TLL	$\Delta_{tr}G^o$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta_{tr}S^o$ (kJ mol ⁻¹)
PEO1500/Na ₂ SO ₄	50.89	-4.62 ± 0.10	-2.14 ± 0.14	2.48 ± 0.17
PEO1500/Li ₂ SO ₄	51.67	-9.72 ± 0.12	-68.93 ± 0.97	-59.21 ± 0.98
PEO1500/C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	50.21	-3.23 ± 0.17	38.16 ± 0.71	41.39 ± 0.72
PEO10000/Na ₂ SO ₄	44.01	-6.43 ± 0.06	-1.19 ± 0.16	5.25 ± 0.17
PEO10000/Li ₂ SO ₄	37.23	-14.50 ± 0.00	-3.11 ± 0.07	11.39 ± 0.01
L64/C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	49.41	-3.94 ± 0.04	-19.70 ± 0.31	-15.76 ± 0.31
PPO400/Na ₂ SO ₄	77.72	1.31 ± 0.29	-40.55 ± 0.81	-41.86 ± 0.3
PPO400/C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂	74.91	1.53 ± 1.38	-77.57 ± 0.52	-79.10 ± 1.47

The SCC transfer thermodynamic parameters ($\Delta_{tr}G^o$, $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$, and $T\Delta_{tr}S^o$) greatly depend on the ATPS-forming components. For the systems formed by PEO and L64, the $\Delta_{tr}G^o$ values are negative, which show that in the thermodynamic equilibrium, the SCC dye concentrates preferentially in the top phase. However, in the ATPSs

formed by PPO, the $\Delta_{tr}G^o$ values are positive and the SCC dye concentrates preferentially in the bottom phase.

The $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ values are negative for all systems, except that formed by PEO1500 and $C_4H_4O_6Na_2$. To understand this result, we should recognize that $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ is the contribution of different independent terms, as shown in equation 11:

$$\Delta_{tr}H_{ITC}^o = \Delta H_{SCC-W}^o + \Delta H_{M-W}^o + \Delta H_{SCC-S}^o + \Delta H_{S-W}^o + \Delta H_{SCC-M}^o + \Delta H_{M-S}^o \quad (11)$$

where ΔH_{i-j}^o is the entalpy change associated with the formation or disruption of the i-j interaction when the SCC dye moves from the bottom to top phase, and i and j can be water (W), salt (S), a macromolecule (M), or dye (SCC).

Whereas water is the most abundant component in both ATPS phases, the ΔH_{SCC-W}^o term in equation 11 contributes little to $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$. Additionally, because of the salt-macromolecule exclusion process, the main difference between the phase compositions is due to the salt and macromolecule, which are enriched in the top and bottom phases, respectively. Consequently, the ΔH_{M-S}^o term can be disregarded in that equation. Since ΔH_{SCC-S}^o and ΔH_{M-W}^o are positive (the absorbed energies to break the SCC-salt and macromolecule-water interactions in the top and bottom phases, respectively) and ΔH_{S-W}^o and ΔH_{SCC-M}^o are negative (the released energy to form the water-salt interaction in the bottom phase and the SCC-macromolecule in the top phase), $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ will be negative if $|\Delta H_{SCC-M}^o + \Delta H_{S-W}^o| > \Delta H_{SCC-S}^o + \Delta H_{M-W}^o$. Otherwise, $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ will be positive.

Regarding the $\Delta_{tr}S^o$ values, in the PEO1500/ Na_2SO_4 , PEO1500/ $C_4H_4O_6Na_2$, PEO10000/ Na_2SO_4 , and PEO10000/ Li_2SO_4 ATPSs, the dye partitioning from the bottom phase to top phase occurs with an increase in entropy, in disagreement with Johansson's

model conclusion. On the other hand, when the ATPSs are PEO1500/Li₂SO₄, L64/C₄H₄O₆Na₂, PPO400/C₄H₄O₆Na₂, and PPO400/Na₂SO₄, the $\Delta_{tr}S^o$ values are negative.

Johansson's model predicts that the SCC transfer to the macromolecule-rich phase occurs, decreasing the system's entropy, mainly due to a smaller number of water molecules in this phase compared with that in the bottom phase. Thus, to explain the entropic increase promoted by the SCC partitioning, we can consider the hypothesis that the dye transfer from the bottom phase to top phase (promoting an entropy decrease) occurs simultaneously with the transfer of other chemical species (specially water) from the top phase to bottom phase (promoting an entropy increase). Then, the $\Delta_{tr}S^o$ values are the contribution of two simultaneous molecular transfer processes between the top and bottom phases, as expressed in equation 12.

$$\Delta_{tr}S^o = \Delta_{tr}S_{SCC}^o + \Delta_{tr}S_i^o \quad (12)$$

where "i" refers to all the components of the ATPS, except the SCC, transferred from the top phase to the bottom phase when the dye partition occurs.

Consequently, positive $\Delta_{tr}S^o$ values result from a larger contribution of the $\Delta_{tr}S_i^o$ term in relation to the $\Delta_{tr}S_{SCC}^o$ term. In contrast, when the transfer of other chemical species from the top phase to the bottom phase is low, the $\Delta_{tr}S_i^o$ term contributes little, and $\Delta_{tr}S^o$ is negative.

In the ATPSs containing PEO1500, the exchange of sodium by lithium cations makes $\Delta_{tr}S^o$ change from positive to negative. Nevertheless, the $\Delta_{tr}G^o$ values become more negative as result of an increase in the enthalpic contribution to the dye transfer process to the top phase ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ is more negative). The SCC-pseudopolyacation specific

enthalpic interaction is more favorable in the ATPS formed by Li^+ compared with that formed by Na^+ . Thus, the $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ value associated with the SCC transfer to the top phase in the system formed by Li^+ is more negative because the process related with the ΔH_{SCC-M}^o term in equation 11 is more exothermic. Concerning the entropic contribution to the SCC partition, the change in the sign of $\Delta_{tr}S^o$ when lithium is replaced by the sodium cation results mainly from higher values of $\Delta[\text{H}_2\text{O}]$ for the PEO1500/ Li_2SO_4 ATPS compared to PEO1500/ Na_2SO_4 (Table 1), making the term $\Delta_{tr}S_{SCC}^o$ in equation 12 more negative for the first system, which also causes $\Delta_{tr}S^o$ to become negative.

When sulfate is replaced by the tartrate anion in the system formed by PEO1500 and Na^+ , $\Delta_{tr}G^o$ becomes less negative, with $\Delta_{tr}S^o$ becoming more positive and $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ changing from negative to positive. The SCC-tartrate interaction should be stronger than the SCC-sulfate interaction due to the hydrogen bonds that occur in the first system because of the hydroxyl groups present in the tartrate structure. Thus, the ΔH_{SCC-S}^o term in equation 11 increases when sulfate is replaced by tartrate, making $\Delta H_{SCC-S}^o + \Delta H_{M-W}^o > |\Delta H_{SCC-M}^o + \Delta H_{S-W}^o|$. Therefore, $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ changes from positive to negative. The more positive $\Delta_{tr}S^o$ in the PEO1500/ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ ATPS is again related to the term $\Delta_{tr}S_{SCC}^o$ in equation 12, which is less negative in the ATPS formed by tartrate because $\Delta[\text{H}_2\text{O}]$ is smaller for PEO1500/ $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ than for PEO1500/ Na_2SO_4 (Table 1).

In the systems formed by sodium tartrate, the increase in the hydrophobicity of the top phase makes $\Delta_{tr}S^o$ change from positive (in the system formed by PEO1500) to negative (in the system formed by L64 and PPO400). At the same time, the SCC transfer process changes from endothermic ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o = +38.16 \text{ kJ mol}^{-1}$ for PEO1500) to exothermic ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o = -19.70 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $\Delta_{tr}H_{ITC}^o = -77.57 \text{ kJ mol}^{-1}$ for L64 and PPO400, respectively). This change in the enthalpic/entropic balance associated with the SCC partition caused by the hydrophobicity increase in the ATPS top phase

suggests that the energy involved in the desolvation of the macromolecules containing hydrophobic PO segments is smaller than that for the macromolecules containing only hydrophilic EO segments. The difference in that energy results in more positive ΔH_{M-W}^o values (equation 11) when the macromolecule is PEO and $\Delta H_{SCC-S}^o + \Delta H_{M-W}^o > |\Delta H_{SCC-M}^o + \Delta H_{S-W}^o|$. In contrast, when the macromolecule is PPO400 or L64, the magnitude of the ΔH_{M-W}^o term decreases, and the $\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ values become negative.

When PEO1500 is exchanged by PEO10000, the SCC partition to the ATPS' top phase becomes more favorable ($\Delta_{tr}G^o$ changes from -4.62 to -6.43 kJ mol⁻¹ in the ATPS formed by Na₂SO₄ and from -9.72 to -14.50 kJ mol⁻¹ in the ATPS formed by Li₂SO₄), with a decrease in the transfer enthalpy change ($\Delta_{tr}H_{ITC}^o$ changes from -2.14 kJ mol⁻¹ to -1.19 kJ mol⁻¹ in the ATPS formed by Na₂SO₄ and from -68.93 to -3.11 kJ mol⁻¹ in the ATPS formed by Li₂SO₄), which is compensated by an increase in the $\Delta_{tr}S^o$ values. This result shows that the SCC concentration increase in the ATPS' top phase promoted by the macromolecular size increase is governed by entropy. To explain the increase in entropy when PEO1500 is replaced by PEO10000, we can consider that the number of water molecules released from the solvation shell of the interacting molecules (SCC and the macromolecule) and pushed from the top to bottom phase remains unchanged for both PEO1500 and PEO10000. Thus, the water molecules transferred to the salt-rich phase increase the bottom phase configurational entropy by the same extent but decreases the top phase configurational entropy distinctly for systems formed by macromolecules with different sizes. Since the entropy decrease in the top phase is higher for systems formed by macromolecules with small sizes, the $\Delta_{tr}S_i^o$ term in equation 12 is less positive for the system formed by PEO1500.

4. Conclusions

This study demonstrated that aqueous two-phase systems formed by polymers and salts present great potential for the development of an efficient methodology for SCC extraction. The partition coefficient attained values up to 347 in the system formed by PEO10000/Li₂SO₄/H₂O. Using ITC and the partition data, a detailed thermodynamic study showed that the driving force governing the SCC transfer depends on the molar mass and hydrophobicity of the macromolecule, as well as the nature of the salt. A transfer entropy change in SCC resulted from a change in the configurational entropy of the top and bottom phases due to the transfer of the SCC occurring simultaneously with the transfer of the system's components (ions, macromolecule, and/or water). The thermodynamic comprehension of the SCC partitioning in ATPSs improves the theoretical basis for applications of these systems in the extraction/purification of other dyes.

Acknowledgements

The authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas (INCTAA) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for their financial support. The authors are grateful to CHR Hansenby company for their donation of the SCC sample. L.O.R.L., G. M. D. F., and G. M. D. F. acknowledge the research fellowships provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. References

- [1] M. Shahid, Shahid-ul-Islam, F. Mohammad, Recent advancements in natural dye applications: A review, *J. Cleaner Prod.*, 53 (2013) 310-331.
- [2] P.D. Cipriano, L. Ekici, R.C. Barnes, C. Gomes, S.T. Talcott, Pre-heating and polyphenol oxidase inhibition impact on extraction of purple sweet potato anthocyanins, *Food Chem.*, 180 (2015) 227-234.
- [3] S. Baliarsingh, A.K. Panda, J. Jena, T. Das, N.B. Das, Exploring sustainable technique on natural dye extraction from native plants for textile: identification of colourants, colourimetric analysis of dyed yarns and their antimicrobial evaluation, *J. Cleaner Prod.*, 37 (2012) 257-264.
- [4] R.M. Selvam, G. Athinarayanan, A.U.R. Nanthini, A.J.A.R. Singh, K. Kalirajan, P.M. Selvakumar, Extraction of natural dyes from *Curcuma longa*, *Trigonella foenum graecum* and *Nerium oleander*, plants and their application in antimicrobial fabric, *Ind. Crops Prod.*, 70 (2015) 84-90.
- [5] Z.B. Wang, L.Y. Zhang, N. Li, L. Lei, M.Y. Shao, X. Yang, Y. Song, A.M. Yu, H.Q. Zhang, F.P. Qiu, Ionic liquid-based matrix solid-phase dispersion coupled with homogeneous liquid–liquid microextraction of synthetic dyes in condiments, *J. Chromatogr. A*, 1348 (2014) 52-62.
- [6] S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector, *Dyes Pigm.*, 99 (2013) 36-40.
- [7] T. Tumolo, U.M. Lanfer-Marquez, Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?, *Food Res. Int.*, 46 (2012) 451-459.
- [8] A. Mortensen, A. Geppel, HPLC–MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 8 (2007) 419-425.

- [9] J. Han, Y. Wang, J.J. Ma, Y.C. Wu, Y.T. Hu, L. Ni, Y.F. Li, Simultaneous aqueous two-phase extraction and saponification reaction of chlorophyll from silkworm excrement, *Sep. Purif. Technol.*, 115 (2013) 51-56.
- [10] F. Simonet, C. Garnier, J.L. Doublier, Partition of proteins in the aqueous guar/dextran two-phase system, *Food Hydrocolloids*, 14 (2000) 591-600.
- [11] P.P. Madeira, J.A. Teixeira, E.A. Macedo, L.M. Mikheeva, B.Y. Zaslavsky, "On the Collander equation": Protein partitioning in polymer/polymer aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. A*, 1190 (2008) 39-43.
- [12] J.P. Martins, C.D. Carvalho, L.H.M. da Silva, J.S.D. Coimbra, M.D.H. da Silva, G.D. Rodrigues, L.A. Minim, Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 238-241.
- [13] X. Liu, Z. Li, Y. Pei, H. Wang, J. Wang, (Liquid+liquid) equilibria for (cholinium-based ionic liquids+polymers) aqueous two-phase systems, *J. Chem. Thermodyn.*, 60 (2013) 1-8.
- [14] N.J. Bridges, K.E. Gutowski, R.D. Rogers, Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS), *Green Chem.*, 9 (2007) 177-183.
- [15] 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.
- [16] F. Jara, A.M.R. Pilosof, Partitioning of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 374-380.

- [17] M.R. Almeida, H. Passos, M.M. Pereira, A.S. Lima, J.A.P. Coutinho, M.G. Freire, Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.*, 128 (2014) 1-10.
- [18] S. Chethana, C.A. Nayak, K.S.M.S. Raghavarao, Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains, *J. Food Eng.*, 81 (2007) 679-687.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] K.A. Giuliano, Aqueous two-phase protein partitioning using textile dyes as affinity ligands, *Anal. Biochem.*, 197 (1991) 333-339.
- [23] G.D. Rodrigues, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, L.D. Teixeira, V.M. de Andrade, Liquid-liquid phase equilibrium of triblock copolymer L64, poly(ethylene oxide-b-propylene oxide-b-ethylene oxide), with sulfate salts from (278.15 to 298.15) K, *J. Chem. Eng. Data*, 54 (2009) 1894-1898.
- [24] M.T. Zafarani-Moattar, R. Sadeghi, Phase diagram data for several PPG + salt aqueous biphasic systems at 25 °C, *J. Chem. Eng. Data*, 50 (2005) 947-950.
- [25] 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, Chem. Eng. J., 171 (2011) 9-15.

[26] P.D. Patrício, 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.

[27] 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 [Fe(CN)₅NO](2-) anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts, J. Phys. Chem. B, 110 (2006) 23540-23546.

[28] 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.

[29] 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: Biomed. Sci. Appl., 711 (1998) 3-17.

[30] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, K.R. Francisco, M.V.C. Cardoso, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, PEO–[M(CN)₅NO](x-) (M = Fe, Mn, or Cr) interaction as a driving force in the partitioning of the pentacyanonitrosylmetallate anion in ATPS: Strong effect of the central atom, J. Phys. Chem. B, 112 (2008) 11669-11678.

[31] G. Patil, K.S.M.S. Raghavarao, Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin, Biochem. Eng. J., 34 (2007) 156-164.

[32] R.M.M. da Silva, J.S.D.R. Coimbra, C.A. da Silva, A.R. da Costa, R.A. da Rocha, A.R.M. Giménez, I.J.B. Santos, Green extraction by aqueous two-phase systems of

porcine pancreatic and snake venom phospholipase A(2), *Sep. Purif. Technol.*, 141 (2015) 25-30.

[33] A.M. Pragaswari, S.B. Chen, C.F. Chen, B.H. Chen, Micellization and gelation of PEO-PPO-PEO binary mixture with non-identical PPO block lengths in aqueous solution, *Polymer*, 55 (2014) 5284-5291.

[34] E. Shoghi, L. Romero, M. Reta, C. Rafols, E. Bosch, Enthalpies and constants of dissociation of several neutral and cationic acids in aqueous and methanol/water solutions at various temperatures, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49 (2009) 923-930.

[35] W.Y. Chen, H.M. Huang, C.C. Lin, F.Y. Lin, Y.C. Chan, Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: Studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation, *Langmuir*, 19 (2003) 9395-9403.

[36] A. Bakk, R. Metzler, Two states do not necessarily correspond to a two-state transition: van't Hoff enthalpy in the case of a small entropy difference between the states, *Chem. Phys. Lett.*, 398 (2004) 190-193.

[37] T. Blaschke, A. Werner, H. Hasse, Microcalorimetric study of the adsorption of native and mono-PEGylated bovine serum albumin on anion-exchangers, *J. Chromatogr. A*, 1277 (2013) 58-68.

[38] C. Brinatti, L.B. Mello, W. Loh, Thermodynamic study of the micellization of zwitterionic surfactants and their interaction with polymers in water by isothermal titration calorimetry, *Langmuir*, 30 (2014) 6002-6010.