

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

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

Luciana de Oliveira Reis Leite

*Magister Scientiae*

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LUCIANA DE OLIVEIRA REIS LEITE**

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

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

*Aos meus queridos pais,  
Dedico este trabalho.*

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

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

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

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

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

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

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

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

Aos colegas da MICROFLUIDICA. Em particular, ao Julio Cezar (Adrenalina) e Guilherme Milagres pelo acompanhamento durante os experimentos.

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

Ao meu amigo Julio Cesar (Julim) pelo abraço aconchegante nos momentos difíceis!

Ao tio Lucas e família pelo acolhimento nesta cidade.

Aos amigos da Igreja Cristã Maranata, pelas constantes orações!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>RESUMO</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. Introdução</b>	1
1.1. <i>Corante Natural Carmim de Cochonilha: Origem, Estrutura Química e História</i>	1
1.1.2 <i>Métodos de Extração do Carmim</i>	3
1.1.3 <i>Aplicações e Métodos de identificação, determinação e quantificação de Ácido Carmínico em diversas matrizes</i>	7
1.1.4 <i>Funcionalidade</i>	10
1.1.5 <i>Toxicidade e Reações Adversas</i>	11
1.1.6 <i>Legislação e Restrição de Uso</i>	12
<b>2. Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs)</b>	13
2.1 <i>Processos envolvidos na formação dos SABs</i>	15
2.2 <i>Teoria de Partição de solutos em SABs</i>	16
2.2.1 <i>SABs utilizados para a partição de corante</i>	17
<b>3. Objetivos</b>	19
3.1 <i>Objetivos Específicos</i>	19
<b>4. Materiais</b>	20

4.1 Reagentes -----	20
4.2 Experimentos de Partição -----	20
4.3 Determinação do coeficiente de partição ( $K_o$ ) -----	21
4.4 Medidas Calorimétricas -----	21
<b>5. Resultados</b> -----	<b>22</b>
5.1 Diagrama de Fase -----	22
5.2 Influência do Eletrólito formador do SAB na partição do carmim-----	25
5.2.1 Efeito do Ânion-----	26
5.2.2 Efeito do Cátion-----	29
5.3 Efeito do aumento da hidrofobicidade das macromoléculas sobre a partição do corante natural carmim-----	31
5.4 Parâmetros Termodinâmicos da partição do carmim-----	34
<b>6. Conclusões</b> -----	<b>38</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b> -----	<b>39</b>



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**SABs** – Sistemas Aquosos Bifasicos

**ELL**- Extração Líquido-Líquido

**AC**- Ácido Carmínico

**AC-AI**- Laca

**ESI-MS** – Espectrometria de Massas Eletrospray

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**MBs** - Molecular Beacons

**Cas-MB** – Sonda Molecular de ácido carmínico

**IDA** – Ingestão Diária Aceitável

**FAO** - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**LB** - Linha Binodal

**LA** - Linha de amarração

**FS** - Fase Superior

**FI** – Fase Inferior

**CLA** - Comprimento da Linha de Amarração

**PC** – Ponto Crítico

**K<sub>s</sub>** – Coeficiente de Partição de um soluto

**K<sub>c</sub>** – Coeficiente de Partição do Carmim

**Δ<sub>tr</sub>G** – Variação da Energia Livre de Gibbs de transferência

**Δ<sub>tr</sub>H** – Variação da Entalpia de transferência

$\Delta_{tr}S$  – Variação da Entropia de transferência

**CitNa** – Citrato de Sódio

**CitNH<sub>4</sub>** - Citrato de Amônio

**TartNa** – Tartarato de Sódio

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** - Carbonato de Sódio

**AcetNa** – Acetato de Sódio

**PEO** – Poli (óxido de etileno)

**L35** - Copolímero tribloco (EO)<sub>11</sub>(PO)<sub>16</sub>(EO)<sub>11</sub> massa molar média 1900 g mol<sup>-1</sup>

**L64** - Copolímero tribloco (EO)<sub>13</sub>(PO)<sub>30</sub>(EO)<sub>13</sub> massa molar média 2900 g mol<sup>-1</sup>

**F68** - Copolímero tribloco (EO)<sub>80</sub>(PO)<sub>30</sub>(EO)<sub>80</sub> massa molar média 8400 g.mol<sup>-1</sup>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fórmula estrutural do Ácido Carmínico -----	2
<b>Figura 2</b> – Fórmula Estrutural do Corante natural Carmim -----	2
<b>Figura 3</b> - Esquema das etapas do processo de extração do carmim a partir do inseto -----	4
<b>Figura 4</b> - Fluxograma do processo de produção de carmim de cochonilha utilizado no estudo de fatores significativos proposto por Carvalho -----	5
<b>Figura 5</b> - Fluxograma do processo estabelecido para a extração do corante de cochonilha proposto por Carvalho -----	6
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática da sonda de ácido carmínico (Cas-MB) eletroquimicamente inativa/ativa proposta por Wu e colaboradores-----	11
<b>Figura 7</b> - Diagrama de fase em coordenadas retangulares -----	13
<b>Figura 8</b> – Diagrama de Fase para o SAB formado por F68/Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> /H <sub>2</sub> O, a 25° -----	24
<b>Figura 9</b> – Coeficiente de Partição (K <sub>c</sub> ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de sais de sódio...com copolímero tribloco L35, a 25°C -----	26
<b>Figura 10</b> – Valores de $\Delta_{tr}G$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de diferentes sais de sódio (carbonato, citrato, tartarato e acetato) com copolímero tribloco L35, a 25°C -----	27
<b>Figura 11</b> – Coeficiente de Partição (K <sub>c</sub> ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco L35 com sais de citrato de Sódio e amônio, a 25°C -----	29
<b>Figura 12</b> – Valores de $\Delta_{tr}G$ do carmim em função do CLA dos SABs formados pela misturado copolímero tribloco com sais de citrato de sódio e amônio, a 25°C -----	30

**Figura 13** – Coeficiente de Partição ( $K_c$ ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas -----31

**Figura 14** – Valores de  $\Delta_{tr}G$  do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas -----32

**Figura 15** – Coeficiente de Partição ( $K_c$ ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas -----33

**Figura 16** – Valores de  $\Delta_{tr}G$  do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal citrato de sódio e diferentes macromoléculas -----33

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Limites máximos permitidos de uso do carmim em alimentos -----46

**Tabela 2** - Valores de CLA calculados para SABS formados por diferentes polímeros e o sal tartarato de sódio -----23

**Tabela 3** - Valores de CLA calculados para SABS formados por diferentes polímeros e o sal citrato de sódio -----23

**Tabela 4** - Valores de CLA calculados para SABS formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (carbonato e Acetato) e amônio (citrato)-----24

**Tabela 5** – Parâmetros termodinâmicos de transferência do corante carmim em SABS formados por diferentes macromoléculas e o sal tartarato de sódio ----36

## RESUMO

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, M. S., Univesidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Termodinâmica de partição do corante natural carmim de cochonilha em diferentes sistemas aquosos bifásicos**. Orientador: Luis Henrique Mendes da Silva. Conselheiros: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Maria do Carmo Hespagnol da Silva, Ana Clarissa Pires dos Santos e Jairo Tronto.

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

Esta pesquisa revelou que as moléculas de carmim concentram na fase rica em polímero/copolímero de casa sistema. Este resultado tem sido atribuído a interações intermoleculares entre as moléculas de carmim e as moléculas de polímero/copolímero. A proposta do trabalho é melhorar o comportamento de partição do carmim em SABs para aumentar a eficiência de extração deste soluto. Para isso, o coeficiente de partição do carmim ( $K_c$ ) foi avaliado para diversos SABs e os parâmetros termodinâmicos de transferência do corante foram obtidos ( $\Delta_{tr}H$ ,  $\Delta_{tr}S$  and  $\Delta_{tr}G$ ).

## ABSTRACT

LEITE, Luciana de Oliveira Reis, M. S., Univesidade federal de Viçosa, julho de 2010. **Thermodynamic partition of carmine natural dye in several Aqueous Two Phase Systems**. Adviser: Luis Henrique Mendes da Silva. Committe Members: Álvaro Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Ana Clarissa Pires dos Santos e Jairo Tronto.

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

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

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

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



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

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

## 1. Introdução

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

Existem diversas técnicas de extração e de purificação deste corante. Neste contexto, os sistemas aquosos bifásicos (SABs) se mostraram eficientes já que o carmim particiona preferencialmente para a fase superior destes.<sup>2</sup> A água é o componente principal, o que demonstra a potencialidade da utilização dos sistemas aquosos bifásicos em detrimento às extrações líquido-líquido (ELL) convencionais que em sua maioria fazem uso de solventes orgânicos tóxicos seguindo os princípios da química verde.

A proposta deste trabalho é investigar a partição deste corante em diferentes SABs, determinar os parâmetros termodinâmicos a fim de elucidar os fatores que governam essa partição.

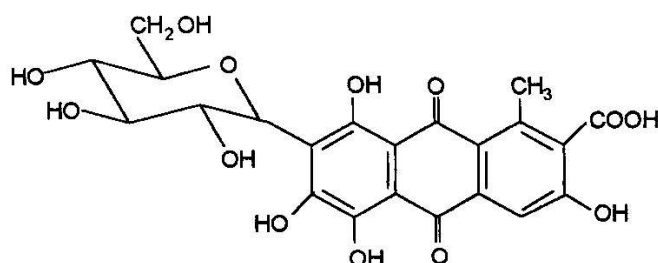
### 1.1 Corante Natural Carmim de Cochonilha: Origem, Estrutura Química e História

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

Este inseto pertence à família *Dactylopiidae*, que está amplamente distribuída e cujos membros vivem em associação. O *Dactylopius coccus* Costa vive como parasita sobre cactus dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*,

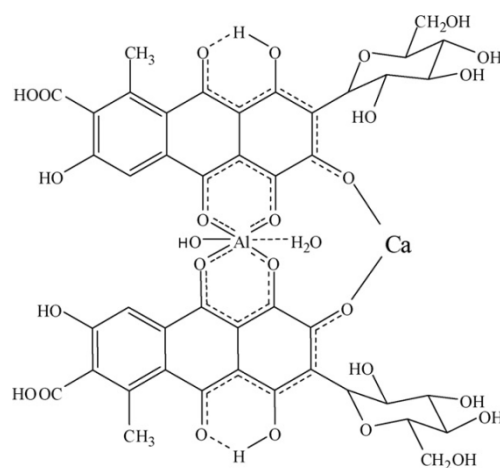
especialmente *Nopalea cochenillifera* de habitat fundamentalmente na América do Sul e América Central.<sup>3</sup>

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



**Figura 1** – Fórmula estrutural do Ácido Carmínico

O ácido carmínico é um composto orgânico derivado da antraquinona, especificamente uma hidroxiantraquinona ligada a uma unidade de glicose, cuja estereoquímica foi recentemente definida. Sua nomenclatura oficial é ácido 7-D-glucopiranosil-7-D-glucopiranosil-9,10-dihidroxi-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxi-2-antraceno-carboxílico ( $C_{22}H_{20}O_{13}$ , PM = 492,39). A extração do ácido carmínico é feita a partir das fêmeas secas do inseto e a complexação deste com os íons Alumínio e Cálcio forma o pigmento natural Carmim conhecido como laca (Figura 2), de grande importância comercial.<sup>3</sup>



**Figura 2** – Fórmula Estrutural do Corante natural Carmim.

Dapson ressaltou que são utilizados os termos: produtos a base de cochonilha (base products), extrato de cochonilha (cochineal extract) e ácido carmim estável (acid-stable carmine) aparecem em catálogos dos produtores sem qualquer descrição. Estes termos se referem à cochonilha e o carmim, ao ácido carmínico e ao carmim ou também ácido aminocarmínico respectivamente. Essa revisão visou a esclarecer essa terminologia confusa. Então Cochonilha é o material cru oriundo dos corpos secos das fêmeas do inseto. O Ácido Carmínico é o ingrediente ativo de cor vermelha e aparece em produtos comerciais de marcas científicas. O Carmim é um complexo metálico coordenado envolvendo os íons alumínio e cálcio e ácido carmínico com quantidades e tipos variados de outros compostos, alguns destes são vitais para usos específicos de um produto. O carmim é geralmente produzido a partir diretamente a partir da cochonilha e vendido como pigmento insolúvel precipitado com cálcio ou outros íons metálicos.<sup>4</sup>

O corante vermelho fino foi descoberto em civilizações ricas em recursos naturais, por exploradores espanhóis que invadiram a América Central e do Sul durante o século XV e XVI. A Espanha exportou uma média de 50 a 160 toneladas anualmente, sendo somente ouro e prata mais importantes. A cochonilha comercial moderna era originária de plantações no Peru, Chile, Bolívia, e Ilhas Canárias. Pequenas quantidades eram oriundas do sul da Espanha, Algéria e Austrália. Em destaque estava o México como maior centro produtor até o aparecimento das anilinas em 1860. E ironicamente o fator que causou essa perda, foi o responsável pela sua crescente demanda mundial. Os corantes sintéticos foram causadores de doenças e a partir da década de 80 a sua utilização em alimentos, drogas e cosméticos foi banida nos Estados unidos, Japão e Europa. Desde então, os derivados da cochonilha se tornaram os corantes vermelhos mais populares para essa proposta de substituição<sup>4</sup>.

### **1.1.2 Métodos de Extração do Carmim**

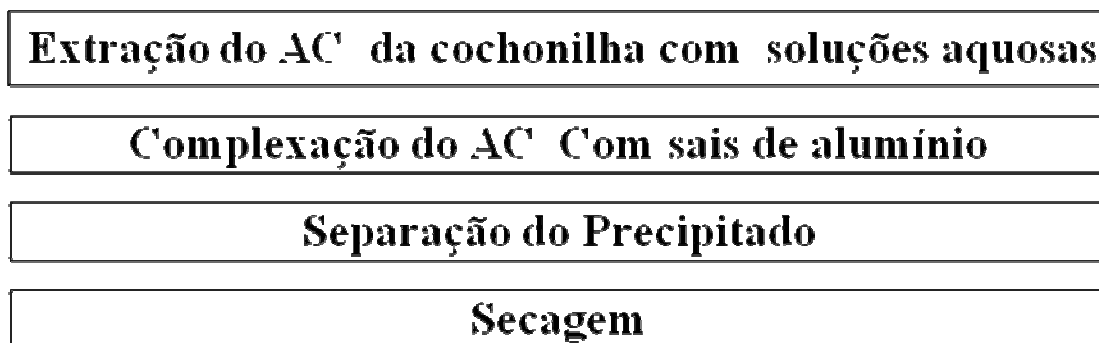
Existe uma séria exigência de diversos países sobre a qualidade dos insetos e dos extratos. São as fontes de variação na qualidade do inseto, de ácido carmínico e da laca respectivamente<sup>4</sup>:

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

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

Carvalho descreveu diversos métodos (Alcabés, Alemão, Carré, Madame Cenette, Chinês, Inglês, Francês, Muspratt, Napier, Prado, Rios e Thorpe). Estes se diferem pelo uso diversos tipos solventes como: água a ebulição, hidróxido de sódio e solução de sal (citrato de sódio, carbonato de cálcio, carbonato de potássio)<sup>3</sup>.

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

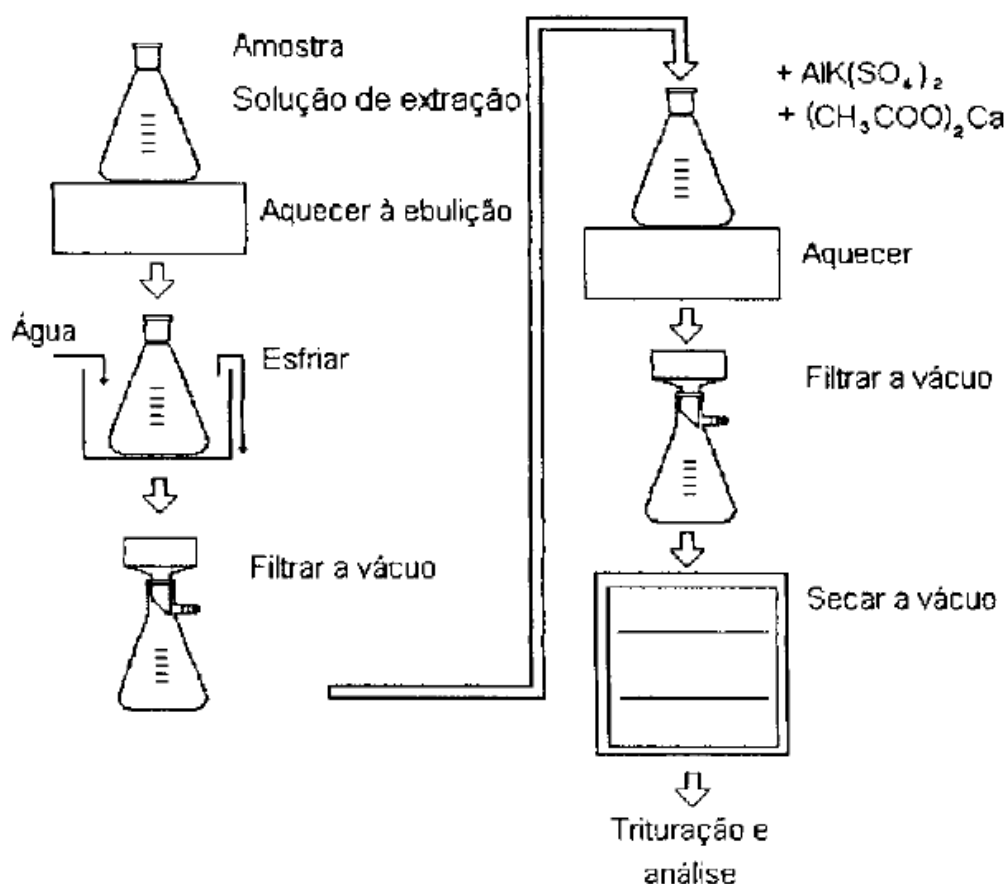


**Figura 3** - Esquema das etapas do processo de extração do carmin a partir do inseto.

O pigmento comercializado no Brasil tem aspectos diferentes do que o resultante desses métodos de extração citados anteriormente. Hoje se mantêm sigilo sobre segredos industriais das alterações tecnológicas feitas no processo

de produção do carmim. A empresa Chr. Hansen oferece uma faixa completa do corante carmim nas formas líquida, sólida hidrossolúvel, laca e cápsula que são bastante estáveis à variação de luz e temperatura.<sup>5</sup>

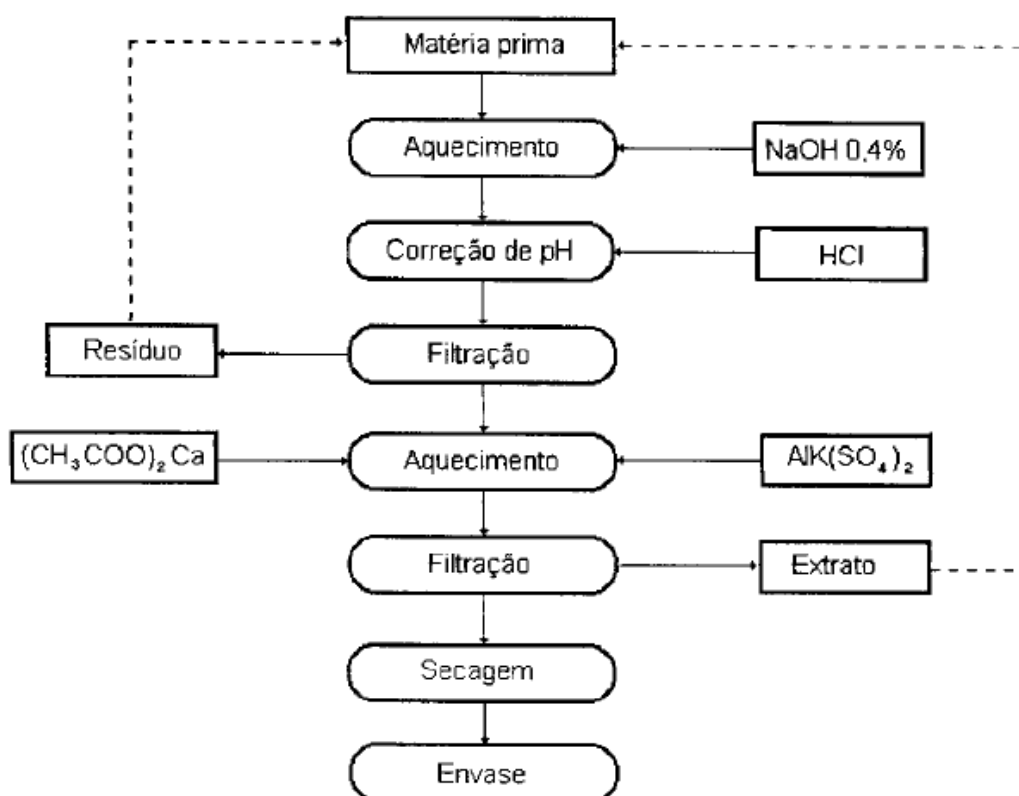
Carvalho também propôs dois métodos de extração do carmim e otimizou o processo de produção. O fluxograma da metodologia (Figura 4) que foi utilizada para estudo de cinco fatores significativos: pH de extração 2 (-) ou 12 (+), pH de precipitação 6 (-) e 8 (+), massa de sulfato de alumínio e potássio 0,25g (-) e 0,5g(+), massa de carbonato de cálcio 0,1g(-) e 0,5g(+), e forma de adição dos sai (sulfato de alumínio e potássio antes (-) e juntos (+))<sup>3</sup>.



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

A tecnologia final proposta teve um baixo rendimento de extração (~67%), sendo um fator limitante deste processo. Para aumentar a eficiência

dessa tecnologia, foi proposto reciclar o resíduo desta extração. O tempo de extração estabelecido foi de 25 minutos com a proporção de solvente (NaOH 0,4%) igual a 80mL/g de amostra e pH =13. O extrato foi resfriado, teve o pH corrigido para 4 com adição de HCl e filtrado. O resíduo foi reciclado e o filtrado teve o pH ajustado para 6. Adicionaram-se os sais a esse extrato. A concentração de sulfato de alumínio e potássio  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$  e a concentração de acetato de cálcio utilizadas foram de 0,72g/g e 0,08g/g de ácido carmínico respectivamente. O que sugere a participação de outra fonte de cátion na formação do complexo. Essa mistura foi aquecida até a ebulição por 30 minutos, resfriada e o material precipitado é separado por filtração. O corante obtido é seco em estufa à vácuo em temperatura inferior a 60°C, triturado e envasado. O fluxograma (Figura 5) deste método estabelecido demonstra todas essas etapas citadas anteriormente<sup>3</sup>.



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

González e colaboradores desenvolveram outro método de extração e determinação de pigmentos a partir do corpo das fêmeas do inseto cochonilhas (*Dactylopius Coccus* Costa). O procedimento foi baseado na extração por solvente de pigmentos em amostras de insetos usando metanol:água (65:35, v:v) como extratante. Foi usado um planejamento fatorial de dois níveis para otimizar os parâmetros de extração. São eles: temperatura, tempo, concentração de metanol na mistura extratante, e o número de extrações. O fator mais significativo foi o número de extrações. A determinação e separação dos pigmentos foram estabelecidas por cromatografia líquida de alta eficiência/UV-vis. Foi demonstrado que o ácido carmínico é o principal composto no extrato das cochonilhas.<sup>6</sup> Visando aumentar o valor comercial do pigmento extraído das cochonilhas investigou-se a qualidade da cor do extrato e caracterização da origem geográfica usando análise estatística multivariada.<sup>7</sup> Outro método rápido desenvolvido para a determinação de adulteração de cor em cochonilhas por estabelecido por espectrofotometria. Os comprimentos de onda selecionados foram 420 e 500nm para a determinação e quantificação simultânea de grupos de pigmentos vermelhos e amarelos em extrato das cochonilhas. A determinação do coeficiente médio de absorção foi dada pela razão entre ( $C_{420}/C_{500}$ ) que resultou em equações que servem para calcular a concentração dos dois grupos de pigmentos e que são considerados constantes e utilizados como parâmetro de controle de qualidade. O método proposto foi comparado à cromatografia líquida e não apresentou diferenças significantes.<sup>8</sup>

### **1.1.3 Aplicações e Métodos de identificação, determinação e quantificação de Ácido Carmínico em diversas matrizes**

Este corante na antiguidade era aplicado como pigmento em telas, têxteis e mapas. A análise da composição destes artefatos é de grande importância, já que serve como fonte de informação pra técnicas de trabalho de reconstrução, restauração e conservação. São diversos os trabalhos que investigam o tipo de pigmento, inclusive carmim, utilizado nestes objetos. Usualmente são empregados para identificação de têxteis históricos e arqueológicos baseados na comparação com material de referência conhecido.



Dependendo da composição qualitativa e quantitativa dos principais corantes e é extremamente vantajoso para elucidação da origem deles.<sup>9</sup>

Favaro e colaboradores investigaram os espectros de emissão dos corantes vermelhos, como ácido carmínico (AC) e laca (AC-AI) em solução ou superfície pintada. O estudo foi focado no uso do ácido carmínico em pinturas e a possível mudança de cor e envelhecimento com o tempo. A laca é muito estável e não é fotodegradada como o ácido carmínico.<sup>10</sup> Observou-se que o espectro do ácido carmínico diluído em água muda em função do pH. Foram detectadas quatro etapas de dissociação que correspondem a valores de pK's que foram determinados a partir de titulações espectrofotométricas e de fluorescência.

Maier e colaboradores utilizaram a desorção/ionização a laser matriz-assistida e espectrometria de massas eletrospray (ESI-MS). A aplicação de ambas as técnicas é feita para análise de ácido carmínico suspenso em óleo de linhaça aplicado em pintura de telas, demonstrando a habilidade das mesmas para identificar corante orgânico em mistura usada nessas pinturas.<sup>11</sup> As antraquinonas e corantes naturais vermelhos usados por pintores antigos foram identificadas também por espectrometria de massas eletrospray acoplada a eletroforese capilar.<sup>12</sup> Outro método utilizou esta última técnica com detecção UV para identificar cinco corantes naturais numa coleção de mapas e desenhos da Royal Chancellery Archives em Granada, Espanha. A validação foi feita usando HPLC como método de referência.<sup>13</sup>

Os Corantes orgânicos usados em pinturas artísticas do museu Diocesano de Arte sacra de Bilbao na Espanha também foram analisados por cromatografia eletrocínética usando como surfactante SDS. A grande vantagem é o tempo da análise que é de dez minutos contra trinta minutos, reportado na literatura quando a análise é feita por HPLC.<sup>14</sup>

Surowlec otimizou uma análise seletiva por HPLC para a principal classe de corantes naturais (antraquinonas, flavonóides e seus produtos de degradação) usados antigamente para tingimento de têxteis<sup>9</sup>. Atualmente o carmim é aplicado em fármacos e cosméticos e também em alimentos devido a

sua estabilidade. Os principais alimentos em que é empregado são: balas, biscoitos, geléias, sorvetes, bebidas lácteas, sucos, carnes, salsichas e salames defumados. Cada vez mais são desenvolvidas técnicas para a purificação<sup>2,3,6-8</sup>, ou detecção de adulteração deste corante em diferentes matrizes<sup>15-18</sup>.

. Huang e colaboradores determinaram oito corantes em bebidas lácteas. Os corantes são adicionados para aumentar a atração, aparência e, além disso, a detecção e medida de corante neste tipo de bebida são relativamente importantes por razões de saúde. Dentre eles o ácido carmínico também foi analisado. Foi ressaltado que as extrações em fase líquida ou fase sólida são dois pré-tratamentos usados para uma variedade de amostras, porém consomem muito tempo e aumentam a concentração dos corantes já que estes são solúveis em água.<sup>15</sup>

Gonzáles e colaboradores desenvolveram também um método automático para determinação de cinco corantes naturais (inclusive o carmim) e também para sintéticos em alimentos liofilizados baseado no processo de lixiviação e extração em fase sólida. A liofilização da amostra acoplada com o procedimento de separação fornece uma amostra limpa sem a complexidade das matrizes estudadas. O limite de detecção alcançado para todos os corantes (0,003-75 µg/g) que está dentro dos padrões estabelecidos pela União Européia.<sup>16</sup>

Um simples método foi desenvolvido para discriminação entre os corantes naturais e sintéticos presentes em alimentos para reduzir o uso de técnicas analíticas caras como cromatografia líquida com detecção por diodos. Foi proposto um sistema em fluxo rápido em que as amostras de corantes sintéticos e naturais em meio de ácido acético passam através de uma coluna de lã/algodão, no qual os corantes sintéticos são retidos e diluídos em amônia. E os aditivos de diversas cores (amarelo, vermelho e verde-azul-marrom) podem ser monitorados nos respectivos comprimentos de ondas (400, 530 e 610nm) com o espectrofotômetro convencional. A discriminação completa entre corantes sintéticos e naturais pode ser obtida pela concentração molar.<sup>17</sup>

Investigou-se a separação de corantes sintéticos e também de alguns corantes naturais (inclusive o carmim) em sistema micelar para comprovação da composição de produtos farmacêuticos. A análise pode ser entendida para produtos alimentícios visando a identificar falsificação.<sup>18</sup>

#### **1.1.4 Funcionalidade**

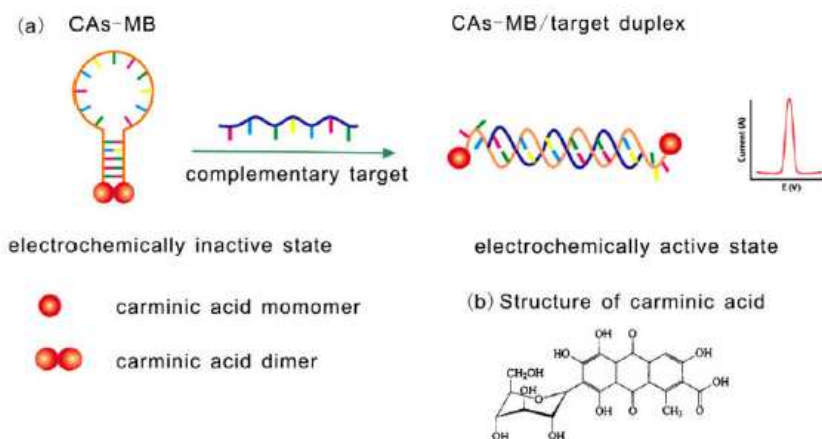
Do ponto de vista tecnológico o corante natural carmim é considerado um corante funcional, pois é um antioxidante. Constatou-se que este corante é capaz de preservar os constituintes dos alimentos contra a oxidação lipídica.<sup>19</sup>

Além disso, o ácido carmínico (principal constituinte do carmim) é conhecido como agente terapêutico devido as suas atividades farmacológicas. São elas: antitumorais, antivirais e antimicrobianas<sup>20</sup>.

Acredita-se que a eficácia que esse composto tem de inibir o crescimento das células tumorais é devido não só a habilidade em associar e intercalar com o DNA, mas também por processos de oxidação-redução com geração de espécies oxigenadas reativas que modificam e degradam ácidos nucléicos e proteínas no interior das mesmas.<sup>20,21</sup>

Wu e colaboradores desenvolveram um novo tipo de sonda (Molecular Beacons – MBs) em que moléculas de ácido carmínico são utilizadas como marcador eletroquímico. O sinal eletroquímico ativado/desativado encontrado na mudança do monômero para o dímero de ácido carmínico é o requisito necessário para uso como MB. Essas sondas são aplicadas na detecção de DNA em solução homogênea para diagnóstico de doenças infecciosas e hereditárias.

No Esquema 1<sup>a</sup> (Figura 6) é mostrada, na ausência da sequência de DNA, a estrutura haste-laço formada por duas metades de ácido carminico em formando um dímero, e como resultado, o sinal eletroquímico do monômero de ácido carmínico é suprimido através do mecanismo de auto-associação. Em consequência da hibridização com a sequência de DNA complementar, a MB sofre uma mudança conformacional dinâmica e o dímero se dissocia, e o sinal eletroquímico é ativado produzindo correntes facilmente mensuráveis<sup>22</sup>.



**Figura 6** - Representação esquemática da sonda de ácido carmínico (Cas-MB) eletroquimicamente inativa/ativa proposta por Wu e colaboradores.

### 1.1.5 Toxicidade e Reações Adversas

Embora seja um corante natural, não está isento de ser tóxico ou provocar reações adversas a saúde humana. Atualmente não se pode associar o termo natural a inócuo. Portanto o carmim foi avaliado quanto às atividades mutagênicas e carcinogênicas, demonstrando ausência destes efeitos.<sup>23</sup>

A combinação de corantes naturais (dentre eles, o carmim) com os sintéticos em fármacos podem provocar reações pseudo-alérgicas, em especial a pessoas que também são alérgicas a aspirina e outros agentes antiinflamatórios, ou que sofrem de urticária ou asma.<sup>18</sup>

O carmim é amplamente utilizado em alimentos e bebidas, e possíveis reações alérgicas não se desenvolvem pela ingestão destes, já que a ingestão diária aceitável (IDA) está estabelecida em 0-5mg/Kg de peso corporal pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO)<sup>3</sup> (CARVALHO)

Podem ser desencadeadas asma<sup>13</sup>, alergias respiratórias, rinites, urticária e diarreia<sup>23</sup> em trabalhadores expostos diretamente ao pó do carmim em na indústria de aditivos para alimentos.

### 1.1.6 Legislação e Restrição de Uso

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

Outras Resoluções<sup>25-30</sup> (nº 382, 384, 385, 387, 388, 389) e a Portaria nº 1004<sup>31</sup> ambos da ANVISA aprovam o uso de aditivos alimentares (inclusive INS 120), estabelecendo suas funções seus limites máximos para categorias específicas de alimentos de resumidos na Tabela 1 em anexo.

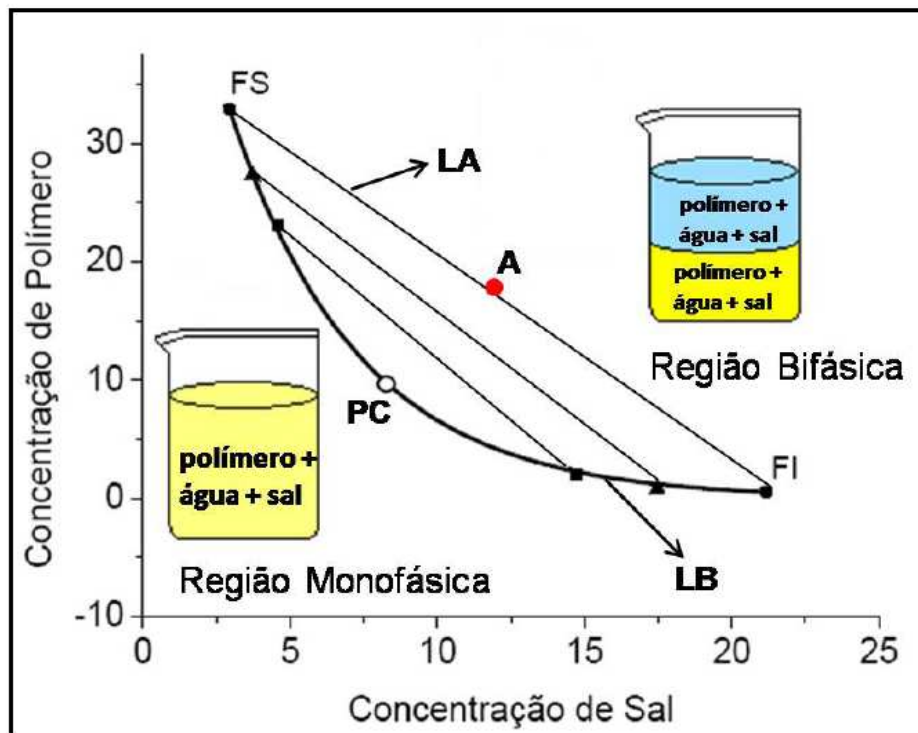
Na Portaria nº 376 da ANVISA estabeleceu-se o conceito do termo *quantum satis* que se refere à quantidade mínima necessária para obter o efeito tecnológico necessário.<sup>32</sup>

## 2. Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs)

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

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

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



**Figura 7** - Diagrama de fase em coordenadas retangulares<sup>35</sup>

Esta representação gráfica (Figura 3) é de grande importância para estudos de partição, pois é utilizada como ferramenta inicial para o desenvolvimento o processo de extração<sup>34</sup>. Os dados estão relacionados à variação da energia livre de Gibbs do sistema. O eixo das abscissas representa a concentração de sal e o eixo das ordenadas a concentração de polímero, ambas em porcentagem mássica % (m/m). O diagrama informa em quais composições globais o sistema é homogêneo ou heterogêneo.

A Linha Binodal (LB) separa essas duas regiões. Na região abaixo dessa linha, o sistema é monofásico já na região acima o sistema é bifásico<sup>35</sup>. Apresentam-se também as linhas de amarração (LA). Essas linhas fornecem a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio (FS e FI) para uma determinada composição global (A) do sistema. O comprimento da Linha de Amarração (CLA) é um parâmetro termodinâmico que é utilizado para medir as propriedades intensivas entre as fases. É calculado em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase (Equação 1).

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

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

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

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

## 2.1 Processos envolvidos na formação dos SABs

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

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

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



contribuição entálpica, já que a entalpia de transferência desse processo continua negativa depois da separação das fases sugerindo que esses íons ( $\text{Na}^+$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ) interagem entre mais ente si, na presença de PEO do que em água devido a uma maior concentração local dos mesmos<sup>36</sup>.

## 2.2 Teoria de Partição de solutos em SABs

O coeficiente de Partição de um soluto ( $K_S$ ) é dado pela razão da concentração do soluto na fase superior e na fase inferior do SAB<sup>35</sup> (Equação 2).

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

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

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

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

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

A contribuição entálpica é dada pela equação 4 sendo que  $\Phi^{\text{FS}}$  e  $\Phi^{\text{FI}}$  é a fração volumétrica de cada componente do SAB<sub>(i,j)</sub> na fase superior e inferior

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

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

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

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

### 2.2.1 Sistemas Aquosos Bifásicos utilizados para partição de corantes

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

considerada é o impacto ambiental causado pela descarga de efluentes contendo esses corantes.<sup>39</sup>

Atualmente, a utilização de SABS para a extração/purificação de diversos solutos como proteínas, bio-nanopartículas, ácidos nucleicos, íons metálicos<sup>16</sup> e corantes são uma excelente alternativa por serem de baixo custo e estarem dentro dos princípios da química verde devido a não utilização de solventes tóxicos e não há geração de descartes perigosos ao meio ambiente e a saúde humana.<sup>2</sup>

Mageste e colaboradores recentemente estudaram a partição do corante carmim em SABS constituídos pelo polímero PEO 1500 e sais de sulfato (lítio e sódio). O  $K_c$  do carmim foi investigado em função do pH do sistema, massa molar do polímero, hidrofobicidade, comprimento da linha de amarração e natureza do eletrólito.<sup>2</sup> Neste trabalho, para explicar os fenômenos de partição do carmim nos SABS investigados, adotou-se o modelo teórico proposto por Haynes e colaboradores, descrito na seção anterior. A densidade numérica da fase inferior é maior (devido ao maior teor de água presente nesta fase), portanto levando em consideração a contribuição entrópica as moléculas de carmim deveriam ter a tendência de se concentrarem nesta fase. Porém os resultados experimentais comprovaram o contrário. As moléculas de carmim têm a tendência de se alojarem na fase superior dos SABS ( $K_c > 1$ ). O que só poderia ser explicado pela contribuição entálpica demonstrando que as moléculas de carmim interagem mais fortemente com a macromolécula do polímero. Evidentemente, foi comprovado que os SABS são uma alternativa promissora para o processo de purificação deste corante em substituição aos processos convencionais.

### **3. Objetivos**

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

#### **3.1. Objetivos específicos**

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

## 4. Materiais e Metodologia

### 4.1 Reagentes

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

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

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

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

### 4.2 Experimentos de Partição

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

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

Alcançado o equilíbrio termodinâmico, as fases superior e inferior foram coletadas e separadas por seringas e pesadas em tubos de ensaio (2,5 g) de ambas as fases misturadas com  $0,963 \mu\text{mol}$  do corante carmim e  $30 \mu\text{L}$  de solução de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

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

#### 4.3 Determinação do coeficiente de Partição ( $K_C$ )

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

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

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

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

#### 4.4 Medidas Calorimétricas

As medidas de entalpia de transferência foram feitas pela metodologia de microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Todos os experimentos foram realizados no microcalorímetro CSC-4200 (Calorimeter Science Corp.) controlado pelo software ITCRun. Todos os procedimentos calorimétricos foram calibrados quimicamente e eletricamente pelo calor de protonação do (Tris(Hidroximetil)Aminomethano) e pelo efeito joule, conforme recomendado<sup>46</sup>.

O equipamento tem duas células calorimétricas (amostra e referência) com volume de 1,75 mL. O experimento consiste de cinco injeções consecutivas de alíquotas (50  $\mu$ L) de carmim dissolvido na fase inferior dentro da célula da amostra que inicialmente continha 0,90 mL de ambas as fases. O titulante foi adicionado com auxílio de uma seringa Hamilton com capacidade máxima de 250  $\mu$ L. O intervalo foi de 60 minutos entre as injeções. A mistura titulada foi

agitada a 350 rpm usando um agitador de hélice. As medidas foram estabelecidas à temperatura constante de  $25.000 \pm 0.001^\circ \text{C}$ .

Os valores para entalpia de transferência foram calculados pela integração da área abaixo dos picos em função do tempo e da mudança de potência e dividindo esses números de mols do carmim transferidos para a fase superior após cada adição ( $n_{\text{TFS}}$ ). O valor de  $n_{\text{TFS}}$  foi obtido pela equação 6:

$$n_{\text{TFS}} = \frac{K_c}{K_c + 1} i n_{\text{add}} \quad (\text{Eq. 6})$$

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

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

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Diagramas de fase

Todos os diagramas utilizados neste trabalho foram previamente construídos e reportados na literatura<sup>41-44</sup>. A partir das composições das fases dos SABs, em equilíbrio termodinâmico, foi calculado o parâmetro termodinâmico Comprimento da Linha de amarração (CLA). O aumento do CLA é sempre relacionado ao aumento da eficiência no processo de extração do carmim.

O CLA para cada SAB foi calculado a partir da equação 1.

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

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

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

	PEO 1500	L35	L64	F68
1	28,73	40,8	29,28	18,21
2	34,95	48,17	37,34	24,37
3	41,74	52,77	41,28	30,06
4	48,51	58,43	47,2	33,01
5	50,21	69,28	52,34	37,7

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

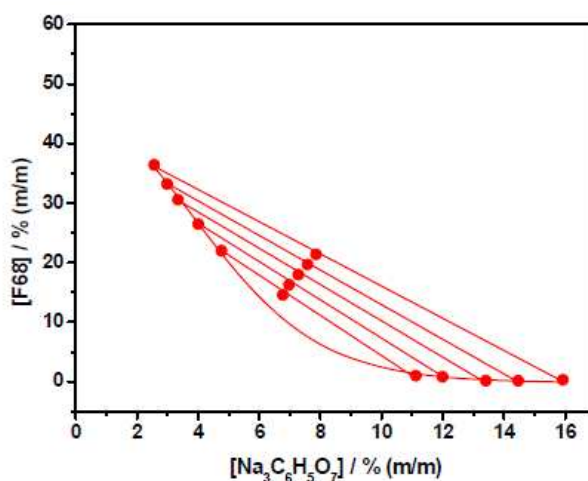
CLA	PEO 1500	L35	L64	F68
1	22,49	34,78	36,58	21,91
2	36,76	42,16	42,56	26,87
3	39,87	48,18	45,58	32
4	47,32	53,71	52,96	34,97
5	56,04	59,48	57,83	38,5



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

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

Na figura 8 é mostrado um exemplo típico de diagrama de fase utilizado neste trabalho. O sistema possui duas fases isotrópicas, sendo a superior enriquecida em macromolécula e a inferior concentrada em sal. Esse diagrama foi construído com análises das fases superiores e inferiores de cada sistema contendo composições globais pertencentes a diferentes linhas de amarração.



**Figura 8** – Diagrama de Fase para o SAB formado por F68/Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>/H<sub>2</sub>O, a 25°. <sup>40</sup>

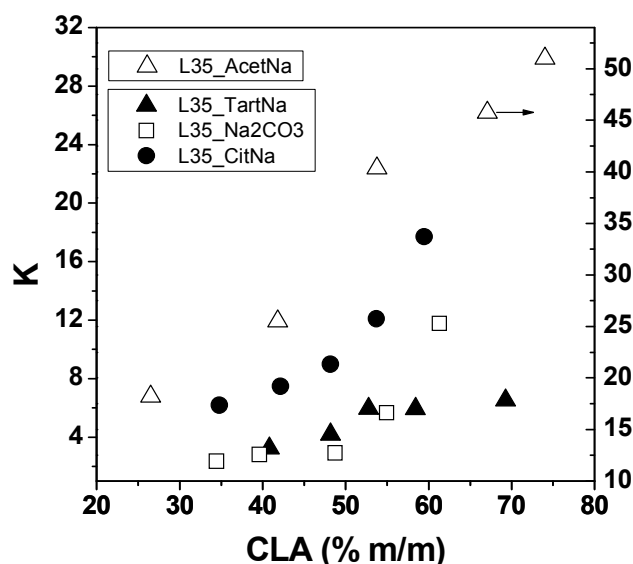
## **5.2 Influência da natureza do eletrólito formador do SABs na partição do corante natural carmim**

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

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

### 5.2.1 Efeito do Ânion

Para estudarmos o efeito da natureza do ânion sobre o processo de partição do o corante natural carmim, o soluto foi particionado em SABs formados pelo copolímero L35 e sais de sódio (Acetato, Carbonato, Citrato e Tartarato). Os resultados são mostrados na figura 9



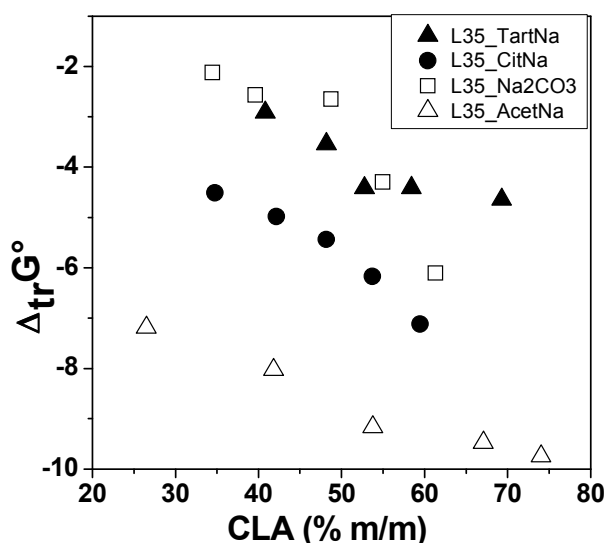
**Figura 9** – Coeficiente de Partição ( $K_c$ ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de sais de sódio.com copolímero tribloco L35, a 25°C .

Há um efeito bem pronunciado da estrutura química dos íons negativos formadores dos SABs, sendo o ânion acetato o que causa os maiores valores de  $k_c$ . Foi observada a seguinte ordem crescente nos valores dos coeficientes de partição:  $K_c(\text{Na}_2\text{CO}_3) < K_c(\text{TartNa}) < K_c(\text{CitNa}) < K_c(\text{AcetNa})$ . Esse efeito mostra que as interações intermoleculares ânion-corante são decisivas no comportamento de partição do carmin. A influência do ânion sobre a partição do corante pode se dar via a interação deste íon com os segmentos das macromoléculas presentes em maior concentração na fase superior. Posteriormente essas interações serão discutidas com mais detalhes no modelo de Haynes.

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

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

A figura 10 mostra a relação entre as variáveis  $\Delta_{tr}G$  e CLA para os quatro SABs estudados. Independente do sal usado, a transferência do carmim causa uma diminuição da energia livre de Gibbs com o aumento do CLA. Os valores energéticos ficaram compreendidos entre -2,0 e -10,0 kJ mol<sup>-1</sup>.



**Figura 10** – Valores de  $\Delta_{tr}G$  do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura de diferentes sais de sódio com copolímero tribloco L35, a 25°C.

Todos os valores de  $\Delta_{tr}G$  dos SABs estudados foram negativos, indicando que a transferência do carmim da fase inferior para a superior é um processo espontâneo. Esta liberação de energia livre de Gibbs está associada às diferentes interações entálpicas associadas à formação e rompimento de diferentes pares potenciais que ocorrem durante a transferência do corante,

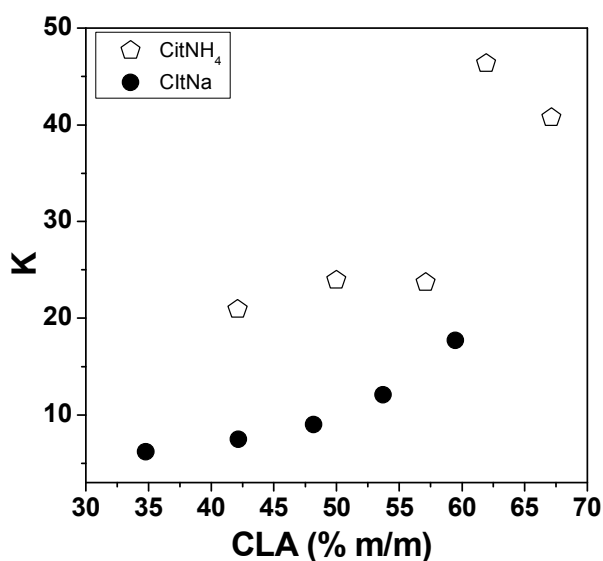
bem como à mudanças configuracionais relacionadas com as diferenças dos números de possibilidades de arranjar as moléculas de Carmim na fase superior e na fase inferior, isto é, a variação da entropia configuracional conforme a equação 8

$$\Delta_{tr}G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq. 7})$$

### 5.2.2 Efeito do Cátion

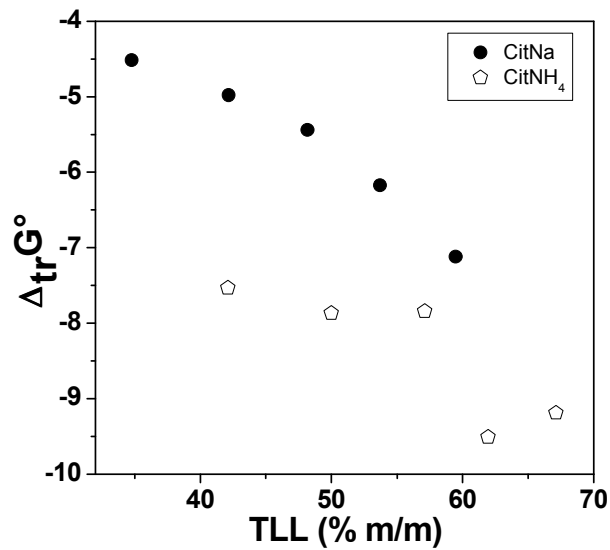
A figura 11 mostra a relação entre o coeficiente de partição em função do CLA para SABs formados pelo mesmo copolímero tribloco L35 e sais de citrato de sódio e amônio.

Os maiores valores de coeficiente de partição foram para os SABs formados pelo cátion amônio. Esse forte efeito dos cátions amônio pode ser explicado considerando que estes íons interagem mais fortemente com os segmentos EO da macromolécula do copolímero L35 do que os cátions Na, gerando assim uma alta densidade de carga positiva. Desta forma, os maiores valores de  $K_c$  observados pode ser atribuído a existência de fortes interações eletrostáticas entre as moléculas de carmim e os pseudopolicátions formado por interações  $\text{NH}_4^+$ -EO.



**Figura 11** – Coeficiente de Partição ( $K_c$ ) do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco L35 com sais de citrato de Sódio e amônio, a 25°C .

Avaliou-se também a relação entre  $\Delta_{tr}G$  e a CLA dos SABs formados pelo copolímero L35 e sais de citrato de sódio e amônio como mostra a Figura 12.



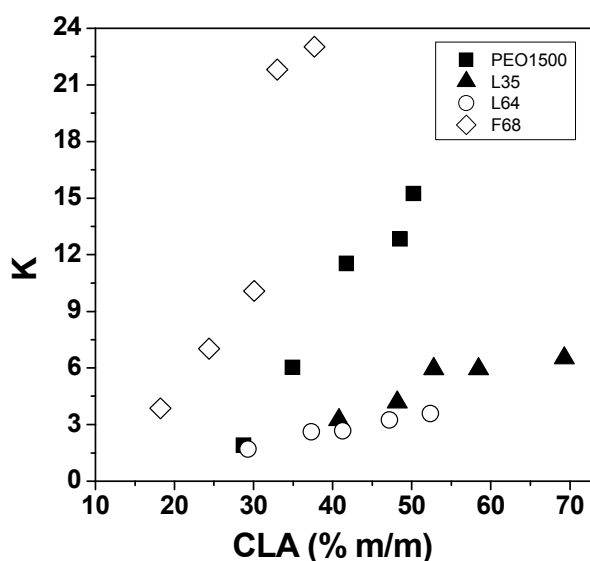
**Figura 12** – Valores de  $\Delta_{tr}G^\circ$  do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do copolímero tribloco com sais de citrato de sódio e amônio, a 25°C.

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

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

A Figura 13 mostra a relação entre as variáveis  $K_c$  e CLA para quatro SABS estudados, formados pelo mesmo sal (Tartarato de Sódio) e por diferentes macromoléculas: o polímero (PEO1500) ou os copolímeros tribloco (L35, L64 e F68). Para todos os SABS o coeficiente de partição aumentou com o aumento da CLA.

É bem conhecido que os copolímeros tribloco possuem a tendência de se auto-associar na forma de micelas. Como pode ser visto na Figura 13, um aumento da hidrofobicidade levou a uma diminuição do coeficiente de partição. Um exemplo é quando o polímero formador do SAB PEO 1500 é trocado pelo copolímero L35, o coeficiente de partição diminui. Isso indica então que o corante carmim é hidrofílico e não se solubiliza no interior hidrofóbico das micelas.

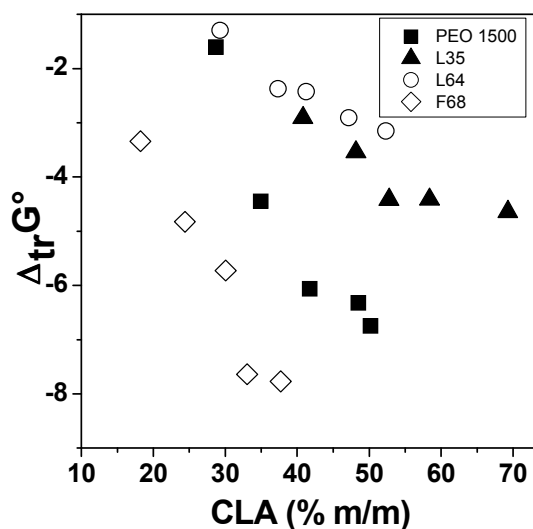


**Figura 13** – Coeficiente de Partição ( $K_c$ ) do carmim em função do CLA dos SABS formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas.

Para comprovarmos esse efeito da hidrofobicidade, na Figura 14, mostramos a relação entre o  $\Delta_{tr}G$  e o CLA. Independente da macromolécula



usada na construção do SAB, o  $\Delta_{tr}G^\circ$  se torna cada vez mais negativo com o aumento do CLA. O incremento da hidrofobicidade, provoca um aumento do  $\Delta_{tr}G^\circ$  na seguinte ordem: F68 < PEO1500 < L35 < L64.



**Figura 14** – Valores de  $\Delta_{tr}G$  do carmim em função do CLA dos SABs formados pela mistura do sal tartarato de sódio e diferentes macromoléculas

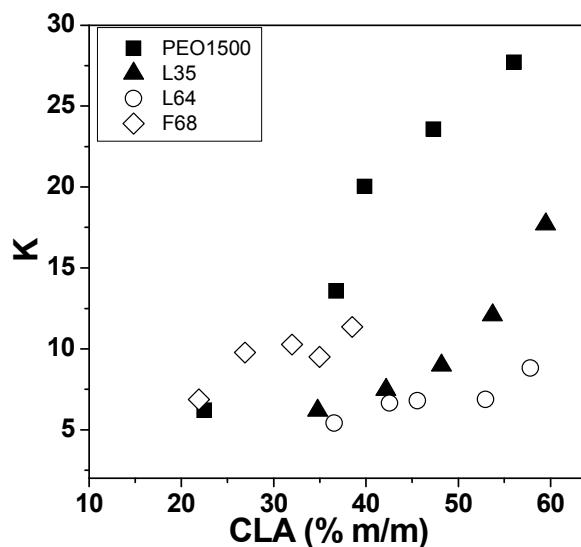
De forma análoga, podemos explicar as figuras 15 e 16, que relacionam os parâmetros  $K_c$  e  $\Delta_{tr}G^\circ$  com o CLA respectivamente.

Os SABs investigados são formados pelo sal citrato de sódio e o polímero PEO 1500 ou diferentes copolímeros (L35, L64 e F68).

Na figura 15, foi observado o mesmo comportamento do SAB macromolécula-Tartarato, onde independente da macromolécula usada, o coeficiente de partição aumenta com o aumento do CLA.

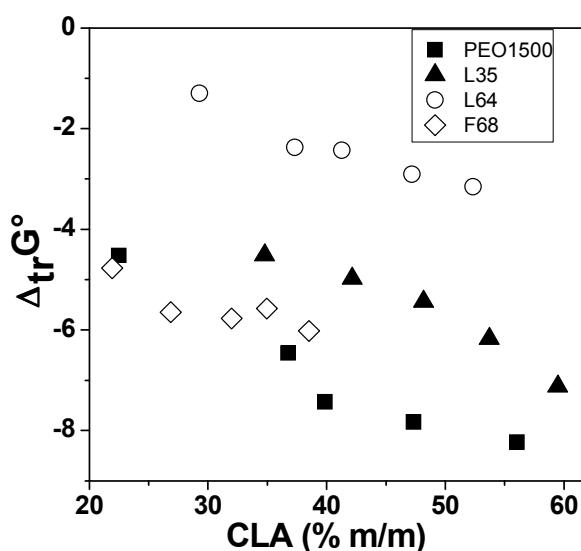
O polímero PEO 1500 possui os maiores valores de coeficiente de partição, indicando que por ser menos hidrofóbico, esta macromolécula interage mais com o carmim, apresentando melhor eficiência de extração.

Observou-se também que um aumento na hidrofobicidade das fases superiores, causou uma diminuição no coeficiente de partição do corante.



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

A Figura 16 mostra os valores de  $\Delta_{tr}G$  em relação aos valores de CLA. Para todos os SABs a transferência é espontânea. Mais uma vez fica claro que o incremento da hidrofobicidade, aumenta o  $\Delta_{tr}G$ . Indicando o caráter hidrofílico das moléculas de carmim.



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

#### 5.4 Parâmetros Termodinâmicos de transferência do carmim

Todas as propriedades de transferência obtidas a partir de SABs formados por macromoléculas e sais dependem das interações eletrostáticas de longo alcance que ocorrem entre os os íons e também das interações iônicas e não-iônicas de curto alcance que ocorrem entre as macromoléculas sem carga e os diferentes íons presentes nos SABs. Então para obter uma descrição teórica dos resultados termodinâmicos associados à transferência do carmim, optou-se por um modelo simples, derivado da teoria de Flory-Huggins, que produz expressões semi-quantitativa para o coeficiente de partição<sup>44</sup>. Essas equações , seguem uma simples interpretação qualitativa indicando que existem apenas duas contribuições que regem a partição do soluto uma entálpica e outra entrópica.

No modelo de Haynes<sup>37</sup> e colaboradores, a contribuição entrópica que dirige a partição foi descrita pela equação

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

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

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

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

Baseado na equação 4 a contribuição entálpica tem dois termos. O primeiro termo é a contribuição energética da interação direta entre o carmim e todos os componentes de cada fase. A fase superior é rica em macromoléculas o que comprova que existe uma forte interação do carmim com a macromolécula (PEO1500, L35, L64 ou F68) favorecendo a sua transferência para a fase superior. O segundo termo considera a energia envolvida no processo de formação e destruição de cavidades, que ocorre nas fases superiores e inferiores, respectivamente, durante o processo de transferência do carmim. A transferência do carmim da fase inferior para a superior implica na quebra das interações entre todos os componentes presentes na fase superior para que ocorra a formação de uma cavidade capaz de alojar a molécula do corante. Ao deixar a fase inferior, a molécula do corante deixa para trás uma cavidade na qual os componentes da fase inferior podem realizar novas interações intermoleculares. Essas energias são dependentes do volume do soluto. Foi comprovado por estudos anteriores do grupo que esse segundo termo não contribui muito para a partição.<sup>38</sup>

Determinaram-se experimentalmente os parâmetros termodinâmicos para todos os SABs investigados. A variação da energia Livre e Gibbs de transferência foi determinada pela equação 7, já citada anteriormente a partir dos valores do coeficiente de partição

$$\Delta_{tr}G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq. 7})$$

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

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

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

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

Observamos na tabela 5 que os valores de  $\Delta_{tr}G$  são negativos para todos os CLAs dos SAB's, indicando que o processo de transferência do carmim é espontâneo. O incremento da hidrofobicidade das fases superiores provocou um aumento de  $\Delta_{tr}G$ , indicando que as moléculas do corante natural carmim são hidrofílicas e não tem a tendência de se alojar no interior hidrofóbico das micelas de copolímero.

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

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

Quanto maior a hidrofobicidade mais negativa é o  $\Delta_{tr}H$  e maior é a redução da entropia do sistema. Este comportamento das propriedades termodinâmicas de transferência é devido à menor interação das moléculas de água com os segmentos das macromoléculas mais hidrofóbicas, sendo assim necessária menor energia para dessolvatar a cadeia polimérica durante o processo de interação polímero-corante. Esta menor interação H<sub>2</sub>O-

macromolécula causa também uma transferência de moléculas de água da fase superior para a inferior, promovendo assim a diminuição da entropia do sistema durante a transferência das moléculas do corante.

## 6. Conclusões

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

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

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

## 7. Referências Bibliográficas

- [1] Mageste B. A.; Carvalho, M. M.; Sampaio, S. C. S. **Pigmentos Naturais: Carmim de Cochonilha**. 2008. 28f. Monografia-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- [2] Mageste, A. B.; De Lemos, L. R.; Da Silva, M. C. H.; Ferreira, G. M. D.; Da Silva, L. H. M.; Bonomo, R. C. F.; Minim, L. A. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **J. Chromatography A** 1216 (2009) 7623-7629.
- [3] Carvalho, P. R. N. **Extração de ácido carmínico e análise por cromatografia líquida de alta eficiência**. 1996. F. Tese (Doutorado em Química)-Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- [4] Dapson, R. W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. **Biotechnic and Histochemistry** 82 (2007) 173-187.
- [5] CHR Hansen. Disponível em: <<http://www.chr-hansen.com>>. Acesso em: 23 jun. 2010
- [6] González, M.; Méndez, J.; Carneiro, A.; Lobo, G. M.; Afonso, A. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. **J. Agric. Food Chemistry** 50 (2002) 6968- 6974.
- [7] González, M.; Méndez, J.; Carneiro, A.; Lobo, G. M.; Afonso, A. Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis. **J. Agric. Food Chemistry** 52 (2004) 1331- 1337.
- [8] González, M.; Lobo, G. M.; Méndez, J.; Carneiro, A. Detection of colour adulteration in cochineals by spectrophotometric determination of yellow and red pigments groups. **Food Control** 16 (2005) 105- 112.



[9] Surowlec, I.; Szostek B.; Trojanowicz, M. HPLC-MS of anthraquinoids, and their degradation products in analysis of natural dyes in archeological objects. **J. Sep. Sci.** 30 (2007) 2070-2079.

[10] Favaro, G.; Miliani C.; Romani A.; Vagnini M. .Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake in solution and painted layers. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2** (2002), 192-197.

[11] Maier, M. S.; Parera, Sara, D.; Seldes, A. M. Matrix-assisted laser desorption and electrospray ionization mass spectrometry of carminic acid isolated from cochineal. **International Journal of Mass Spectrometry** 232 (2004) 225-229.

[12] Puchalska, M.; Orłinska, M.; Ackacha M. A.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M. Identification of anhraquinone coloring matters in natural red dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. **Journal of mass spectrometry** 38 (2003) 1252-1258.

[13] Lopez-Montes, A.; Garcia, R. B.; Espejo, T.; Huertas-Perez J. F.; Navalon, A.; Vilchez. Simultaneous identification of natural dyes in the collection of drawings and maps from the Royal chancellery Archives in Granada (Spain) by CE. **Electrophoresis** 28 (2007), 1243-1251.

[14] Maguregui, M. I.; Alonso, R. M.; Barandiaran, M.; Jimenez, R. M.; García, N. Micellar electrokinetic chromatography method for the determination of several natural red dyestuff and lake pigments used in art work. **J. Chromatography A** 1154 (2007) 429- 436.

[15] Huang, H.; Shih, Y.; Chen, Y.; Determination eight colorants in milk beverages by capillary electrophoresis. **J. Chromatography A** 959 (2002) 317-325.

[16] González, M.; Gallelo, M.; Valcárel, M. Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in liophilized foods using na

automatic solid-phase extraction system. **J. Agric. Food Chemistry** 51 (2003) 2121- 2129.

[17] González, M.; Gallelo, M.; Valcárel, M. Automatic screening method for the rapid and simple discrimination between synthetic and natural colorants in foods. **Analytica Chimica Acta** 454 (2002) 237- 247.

[18] Jaworska, M.; Szulinska, Z.; Wilk, M. Anuszezwska. Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system Application to pharmaceutical analysis. **J. Chromatography A** 1081(2005) 42- 47.

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

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

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

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

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

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

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

[26] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 384, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECE SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 3 – GELADOS COMESTÍVEIS. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/384\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/384_99.htm)> Acesso em: 22. jun. 2010

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

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

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

[30] BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO Nº 389, de 05 de Agosto de 1999. REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECE SUAS FUNÇÕES E SEUS

LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 16: BEBIDAS – SUBCATEGORIA 16.2.2 – BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/389\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/389_99.htm)> Acesso em: 22. jun. 2010

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

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

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

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

- [35] Brito, G. M. **Termodinâmica de partição do ânion  $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$  em sistemas aquosos bifásicos**. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.
- [36] Da silva, L. H. M. **Uso da calorimetria em estudos físico-químicos de processos responsáveis pela formação de sistemas aquosos bifásicos contendo poli(óxido de etileno)**. 2001. 118f. Tese (Doutorado em Química)-Unicamp, Campinas, SP, 2001.
- [37] Johansson, H. O.; Karlström G.; Tjerneld, F.; Haynes, C. A. Driving forces phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatography B** 711 (1998) 3-17.
- [38] da Silva, L. H. M.; da Silva, M .C. H.;Aquino, R. A. N.; Francisco, K.R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO Entalpic Interaction as a Driving Force for partitioning of the  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$  Anion in Aqueous Two-Phase Systems Formed by poly(ethylene oxide) and Sulfate Salts. **J. Phys. Chem. B** 110 (2006) 23540-23546.
- [39] Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Boaz, K. R.; Rogers, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **J. Chromatography B** 711 (1998) 237- 244.
- [40] Teixeira, L. S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e as em diferentes temperaturas**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- [41] Lemos, L. R. ; Santos, I. J. B. ; Rodrigues, G. D. ; Ferreira, G. M. D. ; da Silva, L. H. M. ; da SILVA, M.D.H. ; de Carvalho, R. M. M. Phase Compositions of Aqueous Two phase Systems Formed by L35 and Salts at Different Temperatures. **J. of Chemical and Engineering Data** 55 (2010)1193-1199.
- [42] Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da SILVA, M.D.H.; da Silva, L. H. M.; Patricio, P.R.; Coimbra, J. S.; Minim, L. Liquid-liquid equilibria of an aqueous

two-phase system formed by a triblock copolymer and sodium salts at different temperatures. **J. of Chemical and Engineering Data** 54 (2009) 2891-2894.

[43] Martins, J. P. ; da Silva, M.D.H. ; da Silva, L. H. M. ; Senra, T. D. A. ; Ferreira, G. M. D. ; Coimbra J. S. R. ; Minim, L. A. . Liquid Liquid Phase Equilibrium of Triblock Copolymer F68, Poly(ethylene oxide) b poly (propylene oxide) b poly(ethylene oxide), with Sulfate Salts. **J. of Chemical and Engineering Data** 55 (2010) 1618-1622.

[44] Alves, J. G. L. F.; Brenneissen, J.; Ninni, L.; Meirelles, A. J. A.; Maurer, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. **J. of Chemical and Engineering Data** 53 (2008) 1587-1594.

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

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

## ANEXO

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

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





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)