UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Química

Alício Wagner Vieira

ESTUDO DA PARTIÇÃO DE FÁRMACOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.

Diamantina

2018

Alício Wagner Vieira

ESTUDO DA PARTIÇÃO DE FÁRMACOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Leandro Rodrigues de Lemos

Coorientador: Gustavo Molina

Diamantina

2018

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V658e Vieira, Alício Wagner.
Estudo da partição de fármacos em sistemas aquosos bifásicos / Alício Wagner Vieira. - Diamantina, 2018.
89 p. : il., tabs., grafs.

Orientador: Leandro Rodrigues Lemos
Coorientador: Gustavo Molina

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Poluição ambiental. 2. Medicamentos. 3. Aspirina. I. Lemos, Leandro Rodrigues. II. Molina, Gustavo. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 615.19

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Ivanilton Antônio de Oliveira CRB-6/3359

ALÍCIO WAGNER VIEIRA

ESTUDO DA PARTIÇÃO DE FÁRMACOS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.

Dissertação apresentada ao MESTRADO EM QUÍMICA, nível de MESTRADO como parte dos requisitos para obtenção do título de MAGISTER SCIENTIAE EM QUÍMICA

Orientador : Prof. Dr. Leandro Rodrigues De Lemos

Data da aprovação : 27/04/2018

Prof.Dr. LEANDRO RODRIGUES DE LEMOS - UFVJM

Prof.Dr.ª APARECIDA MAGESTE BARBOSA - UFOP

Prof.Dr. GUSTAVO MOLINA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedicatória

À Deus, criador de todas as coisas,
ao divino e amado mestre Jesus,
aos meus pais, por todo amor,
aos meus irmãos, por todo apoio,
à todos meus amigos, família que escolhi,
à todos sabores e dessabores que me trouxeram até aqui.
Dedico este trabalho.

Agradecimentos

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, ao Departamento e Programa de Pós-Graduação em Química por todo apoio e estruturas que me possibilitaram a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

Aos meus pais Hélio e Avanir, por serem o meu símbolo de abnegação, dedicação e sacrifício. Por tudo que me ensinaram sobre honestidade, trabalho e sentido de responsabilidade. Por serem, para mim, a representação máxima de que o amor incondicional ilumina todos os seres.

Aos meus irmãos Alex e Alessandro, companheiros de todas as horas, minhas referências de lealdade e de que quem avisa amigo é.

Aos meus amigos e irmãos de fé que fizeram toda essa caminha ser mais fácil, alegre e prazerosa.

Ao professor Leandro Rodrigues de Lemos, pela orientação, disponibilidade, confiança, comprometimento, ensinamentos, discussões. Enfim, por todo apoio tão essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Gustavo Molina, pela presteza, ensinamentos e prontidão durante a coorientação.

À todos amigos técnico administrativos, amparadores de todas as horas, em especial à Flavinha, Arthur e Dilton.

Aos meus companheiros de curso e laboratório, amigos de sempre e outros que tive a oportunidade de conquistar o direito de chamar de “mó frend” sendo eles Fanne, Flavinha, Keyciane, Christian, Laryssa, Daniela, Nara, Mainara e Glaytom. Recebam minha gratidão por todos momentos de auxílio, piadas ruins e assuntos fora de hora que aliviaram todo cansaço e medo de falhar.

À todos que se esforçam de corpo e alma pela ciência brasileira. À todo povo brasileiro que mantem vivo o sonho de uma nação justa e prospera para todos.

A humildade não está na pobreza, na indigência, na penúria, na necessidade, na nudez e nem na fome.

A humildade está na pessoa que tendo o direito de reclamar, julgar, reprovar e tomar qualquer atitude compreensível no brio pessoal, apenas abençoa.

Chico Xavier.

RESUMO

Os contaminantes emergentes têm despertado grande atenção nos últimos anos devido ao incipiente conhecimento dos seus efeitos adversos ao homem e ao ambiente, e a dificuldade de monitoramento, uma vez que aparecem em baixas concentrações nestas matrizes. Dentre as diversas classes desses poluentes destacam-se os fármacos. No âmbito dos medicamentos mais consumidos no Brasil, destaca-se o Ácido Acetilsalicílico (AAS), e seu principal metabólito, o Ácido Salicílico (AS). O presente trabalho teve como principal objetivo estudar o comportamento de partição do AAS e do AS em Sistemas Aquosos Bifásicos – SAB's formados por um polímero (ou copolímero), sal e água, a fim de possibilitar uma futura aplicação desta técnica na extração/pré-concentração desses analitos a partir de amostras ambientais. Foram avaliadas, de forma univariada, o efeito das seguintes variáveis sobre o coeficiente de Partição (K) do AAS: comprimento da linha de amarração (CLA) do SAB; pH do meio; tipo de eletrólito e tipo de polímero formador do sistema. Todas as variáveis apresentaram grande efeito sobre o comportamento de partição do AAS, sendo obtido um K máximo de 952 (± 323) para o SAB formado por PEO1500 + Li_2SO_4 + H_2O em pH = 1,0. Além disso, foi realizado também um estudo multivariado das condições ótimas de partição do AS através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) ajustado por uma Função de Desejabilidade. Foram avaliados os efeitos das variáveis concentração de polímero (PEO1500) e concentração de sal (Li_2SO_4) formadores do SAB e o pH da água utilizada no preparo do sistema. Os termos lineares das variáveis concentração de PEO1500 e Li_2SO_4 e a interação entre as mesmas apresentaram um efeito estatístico significativo ao nível de 95% de confiança, enquanto o pH não apresentou impacto significativo sobre a partição do analito. Por fim, a Função de Desejabilidade indicou um sistema ótimo para partição do AS composto de 29,06 % m/m de PEO1500 e 11,94 % m/m de Li_2SO_4 em pH 6.1; sob essas condições o valor esperado para K era de ± 940. Oito réplicas desse sistema reportaram um valor real de K = 949 (± 147). Portanto, os SAB's apresentaram altos valores de K para os analitos estudados, possibilitando uma futura aplicação para a pré-concentração destas espécies a partir de amostras ambientais.

Palavras-chave: Poluição ambiental, Fármacos, Ácido Acetil Salicílico, Sistema Aquoso Bifásico.

ABSTRACT

Emerging contaminants have attracted great attention in recent years due to the incipient knowledge of their adverse effects on man and the environment, and the difficulty of monitoring, since they appear in low concentrations in these matrices. Among the several classes of these pollutants, the drugs stand out. Among the most consumed drugs in Brazil, we can mention Acetylsalicylic Acid (ASA), and its main metabolite, Salicylic Acid (SA). The main objective of this work was to study the partitioning behavior of AAS and AS in Aqueous Biphasic Systems (ABS's) formed by a polymer (or copolymer), salt and water, in order to enable a future application of this technique in the extraction / concentration of these analytes from environmental samples. The effect of the following variables on the partition coefficient (K) of the ASA: length of the tie line (CLA) of the ABS was evaluated univariate; pH of the medium; type of electrolyte and type of polymer forming the system. All variables had a great effect on the partitioning behavior of ASA, obtaining a maximum K of 952 (± 323) for ABS formed by PEO1500 + Li_2SO_4 + H_2O at pH = 1.0. In addition, a multivariate study of the optimal SA partition conditions was carried out through a Rotational Central Compound Design (RCCD) adjusted by a Desirable Function. The effects of the variables polymer concentration (PEO1500) and concentration of salt (Li_2SO_4) forming the ABS and the pH of the water used in the preparation of the system were evaluated. The linear terms of the concentration variables of PEO1500 and Li_2SO_4 and the interaction between them had a significant statistical effect at the 95% confidence level, while pH had no significant impact on the analyte partition. Finally, the Desirability Function indicated an optimal system for partitioning the AS composed of 29.06% m / m PEO 1500 and 11.94% m / m Li_2SO_4 at pH 6.1; under these conditions the expected value for K is ± 940. Eight replicates of this system reported a real value of K = 949 (± 147). Therefore, ABS's presented high values of K for the studied analytes, making possible a future application for the pre-concentration of these species from environmental samples.

Key words: Environmental Pollution, Drugs, Acetyl Salicylic Acid, Biphasic Aqueous System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do Ácido Acetil Salicílico. 25
Figura 2 – Estrutura molecular do Ácido Salicílico. 25
Figura 3 - Representação esquemática do preparo de um SAB. 26
Figura 4 - Estrutura molecular do Ácido Acetil Salicílico. 34
Figura 5 - Estrutura molecular do Ácido Salicílico. 35
Figura 6 - Representação esquemática de um diagrama de fases retangular para um SAB. 44
Figura 7 - Esquema da metodologia de execução dos experimentos com SAB's. 55
Figura 8 - (a) Espectro do AS na FS; (b) Espectro do AS na FI. 60
Figura 9 - (a) Espectro do AAS na FS; (b) Espectro do AAS na FI. 61
Figura 10 - Curva analítica do AAS na fase superior do Sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O. 62
Figura 11 - Curva analítica do AAS na fase inferior do Sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O.63
Figura 12 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 em pH 6,0 com diferentes sais de sulfato. (-Δ- Li_2SO_4 ; -●- Na_2SO_4 ; -■- $MgSO_4$). 64
Figura 14 - Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 em pH 6,0 com diferentes sais de sódio. (-Δ- $Na_2C_4H_4O_6$; -●- $Na_3C_6H_5O_7$; -■- Na_2SO_4).....68
Figura 15 - Ânions dos sais de sódio: (a) sulfato; (b) citrato; (c) tartarato. 69
Figura 16 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por Li_2SO_4 em pH 6,0 com diferentes polímeros. (-Δ- L64; -●- PEO 4000 ; -■- PEO 1500). 70
Figura 17 - Equilíbrio das formas molecular e ionizada do AAS quando o pH = pKa. 71
Figura 18 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 e Li_2SO_4 com água em diferentes valores de pH. (-Δ- pH 6,0; -●- pH 3,5 ; -■- pH 1,0). 72
Figura 19 - Comportamento de partição do AS em SAB's formados por PEO 1500 e Li_2SO_4 com água em diferentes valores de pH. (-Δ- pH 6,0; -●- pH 3,5 ; -■- pH 1,0). 73
Figura 20 - Superfície de Resposta em função das variáveis: [ ] PEO 1500 e [ ] Li_2SO_4. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Moléculas orgânicas extraídas e/ou pré-concentradas em SAB's. 49
Tabela 2 - Composição dos SAB's nos estudos de partição do AAS e AS. 54
Tabela 3 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR. .58
Tabela 4 – Valores de K do AS obtidos pelo DCCR, sendo X_1 ([ ] Li_2SO_4), X_2 ([ ] PEO) e X_3 (pH). 74
Tabela 5 - Análise estatística dos coeficientes de regressão para os K's do AS nos SAB's. 75
Tabela 6 - ANOVA dos resultados para os coeficientes de partição do AS. 76
Tabela 7 - Réplicas do sistema determinado pela função de Desejabilidade. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides.

AAS – Ácido Acetilsalicílico.

AS – Ácido Salicílico.

SAB – Sistema Aquoso Bifásico.

FS – Fase superior.

FI – Fase inferior.

PEO – Polióxido de Etileno.

L64 – Copolímero tribloco.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.

G6PD - Glicose-6-fosfato desidrogenase.

MEFS - Microextração em fase sólida.

EPN - Extração por ponto nuvem.

MEFL - microextração em fase líquida.

PDMS – Polidimetilsiloxano.

PA – Poliacrilato.

Cwx - Carbowax

Carboxen - Carvão ativo microparticulado.

EC – Eletroforese capilar.

EPA - Environmental Protection Agency.

MMA – Ministério do Meio Ambiente.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente.

LB - Linha Binodal.

LA - Linha de Amarração.

Pc – Ponto Crítico.

CLA – Comprimento da Linha de Amarração.

K – Coeficiente de Partição.

SPT - Scaled Particle Theory.

EE – Eficiência de Extração.

LI – Líquido iônico.

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 24

2 OBJETIVOS 28

2.1 Objetivos Gerais 28

2.2 Objetivos Específicos 28

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 30

3.1 Contaminantes Emergentes 30

3.2 Mercado farmacêutico brasileiro 31

3.3 Ácido Acetil Salicílico e Ácido Salicílico 33

3.3.1 Ácido Acetil Salicílico 33

3.3.2 Ácido Salicílico 35

3.3.3 Determinações analíticas entre o AAS e o AS 36

3.4 Química Verde: Uma nova concepção para o uso de técnicas e processos químicos 39

ambientalmente mais seguros..... 39

3.5 Sistema Aquoso Bifásico 42

3.5.1 Histórico e desenvolvimento do método 42

3.5.2 Fundamentos dos SAB's..... 43

3.5.3 Coeficiente de Partição..... 45

3.6 Aplicações dos SAB's 49

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 52

4.1 Materiais..... 52

4.2 Metodologia 52

4.2.1 Curva analítica 52

4.2.2 Estudos de Partição 53

4.3 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição do..... 56

AAS..... 56

4.3.1 Efeito da variação do cátion formador do SAB 56

4.3.2 Efeito da variação do ânion formador do SAB..... 56

4.3.3 Efeito da variação do polímero formador do SAB 57

4.3.4 Efeito da variação do pH do SAB..... 57

4.4 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição do..... 57

AS por Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR..... 57

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 60

5.1 Curva analítica 62
5.2 Estudos de Partição 64
5.2.1 Efeito da variação do cátion formador do SAB 64
5.2.2 Efeito da variação do ânion formador do SAB 67
5.2.3 Efeito da variação do polímero formador do SAB 69
5.2.4 Efeito da variação do pH do SAB 71
5.3 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição 74
do AS por Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 74
6 CONCLUSÕES 80

1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes são espécies cujo interesse em estudos ambientais tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido aos avanços em diversos segmentos industriais e aos precários sistemas de tratamento de efluentes empregados na maioria das regiões do país (BRASIL, 2014). Um contaminante emergente pode ser definido como uma substância ou um microrganismo cuja ocorrência no ambiente foi constatada recentemente, cujos efeitos, em sua totalidade, ainda permanecem imprecisos. No que se refere à grande variedade desses poluentes, estes têm sido divididos em diversas classes como forma de direcionar estudos e padronizar as ações remediativas. Algumas das classes investigadas são os agrotóxicos; os produtos de higiene pessoal como shampoos, sabonetes e demais congêneres; os plastificantes; e os fármacos (RICHARDSON; TERNES, 2011).

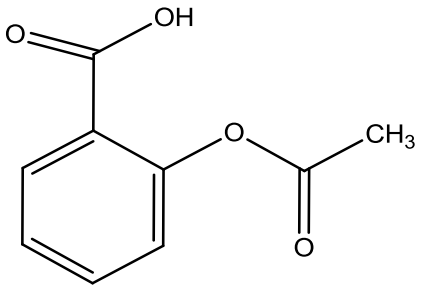
No contexto dos fármacos, os índices de crescimento do setor farmacêutico no Brasil demonstram uma forte expansão do consumo de medicamentos no país. Entre 2007 e 2013, o Brasil saltou da 10° posição para 6° no mercado farmacêutico mundial e a estimativa é de que em 2017 o país chegue ao 4° lugar, ficando atrás apenas de Estados Unidos, China e Japão. No Brasil existem cerca de 80 mil farmácias, distribuídas sem critérios geográficos ou epidemiológicos, com forte apelo mercadológico e sob influência direta de grandes redes farmacêuticas, além do altos índices de automedicação por parte dos brasileiros (NOVATO, 2015).

Dentre os vários tipos de fármacos, destacam-se aqueles de amplo espectro de ação, como é o caso dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), sendo o ácido acetilsalicílico (AAS) um dos principais medicamentos dessa classe. Com propriedade analgésica, antipirética e anti-inflamatória, o AAS é usado para o alívio de dores e de quadros febris. Entretanto, o AAS possui um quadro amplo de efeitos colaterais, sendo alguns desses: (1) desencadear broncoespasmo e crises de asma; (2) eleva a tendência de sangramentos durante e após intervenções cirúrgicas, inclusive cirurgias de pequeno porte como extrações dentárias; (3) reduz a excreção do ácido úrico, podendo desencadear crises de gota em pacientes predispostos (ANVISA, 1999).

Quimicamente, o AAS é um pó branco cristalino e inodoro. Possui uma massa molecular de 180,15 g/mol; densidade relativa de 1,4 g mL^{-1}; pontos de fusão e ebulição de 135 °C e 140 °C, respectivamente; solubilidade em água de 0,3 g 100 g^{-1} (à 25 °C), solúvel em álcool e éter. Trata-se de um composto orgânico de funções mistas, possuindo um grupo funcional ácido

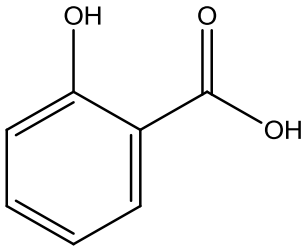
carboxílico e um grupo éster (FOGAÇA, 2016). A estrutura molecular do AAS encontra-se na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura molecular do Ácido Acetil Salicílico.



O principal metabólito do AAS é o Ácido Salicílico (AS), sendo esse um hidróxiácido de massa molar 138,12 g mol^{-1}. Este composto é encontrado na forma de pó cristalino de cor branca, solúvel em água e muito solúvel em etanol e éter. O AS é um ácido orgânico com pKa = 3,0, enquanto o AAS possui pKa = 3,5 (E SÁ, 2006). A estrutura molecular do AS está representada na Figura 2.

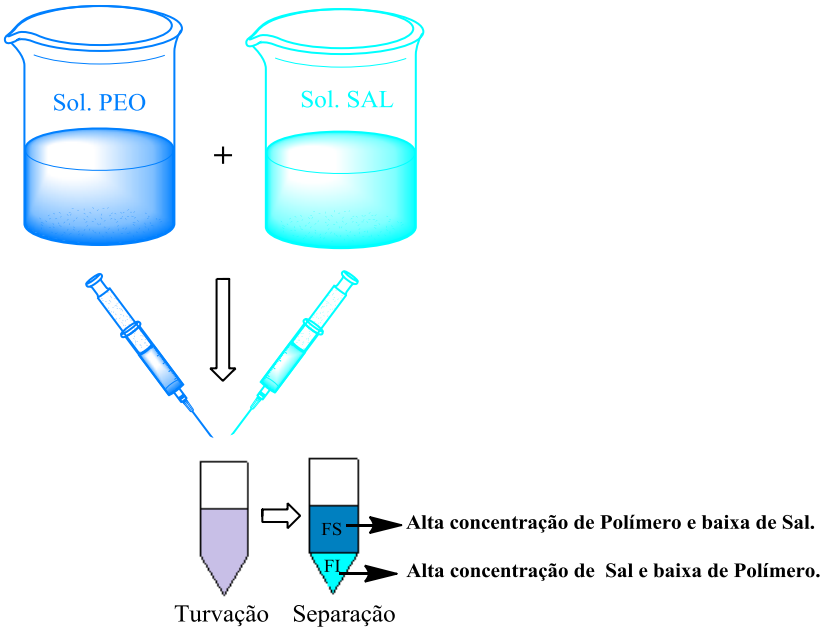
Figura 2 – Estrutura molecular do Ácido Salicílico.



O fato destes compostos atingirem corpos d'agua através de sistemas precários ou mesmo inexistentes de saneamento urbano oferecem riscos àqueles que possuem hipersensibilidade aos mesmos, mesmo quando presentes em baixas concentrações nos efluentes. Assim, considerando tanto o risco clínico quanto a baixa concentração desses analitos nos reservatórios naturais, faz-se necessário a busca por métodos de separação e pré-concentração destas moléculas e seus metabólitos em leitos d'água. Neste contexto, o Sistema Aquoso Bifásico (SAB) apresenta-se como uma alternativa viável e ambientalmente segura. Para avaliar a capacidade de aplicação do SAB para este fim é necessário, à princípio, realizar estudos do comportamento de partição desses analitos (LACERDA et al., 2009; PATRÍCIO et al., 2011).

Sob certas condições termodinâmicas de temperatura, pressão e concentração, os SAB's podem ser formados a partir da mistura de uma solução aquosa de um polímero com uma solução aquosa de um eletrólito, ou de duas soluções aquosas de polímeros quimicamente distintos, ou ainda pela mistura de um solução de um sal inorgânico com um líquido iônico, entre outras combinações de soluções aquosas de espécies imiscíveis entre si como soluções de diferentes surfactantes e etc (RODRIGUES et al., 2010). Em um sistema composto por Polímero/Eletrólito, após a agitação da mistura, o sistema se separa em duas fases, apresentando uma fase superior (FS) normalmente rica em polímero (menos hidrofílica) e pobre em eletrólito e uma fase inferior (FI) rica em eletrólito (mais hidrofílica) e pobre em polímero, sendo ambas as fases majoritariamente constituídas por água. A representação esquemática do sistema formado por Polímero + Sal + Água está demonstrada na Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática do preparo de um SAB.



Fonte: Autor.

O SAB dispõe de várias características que o alocam dentro dos princípios da química verde, pois as substâncias utilizadas podem ser reaproveitadas, são biodegradáveis, atóxicas e não são inflamáveis. Esta técnica apresenta vantagens como baixo custo, fácil expansão para a escala industrial e possibilidade de reutilização dos constituintes. Além disso, o SAB é formado majoritariamente por água, o que permite que uma ampla faixa de analitos sejam analisados sem que os mesmos tenham suas principais funções alteradas (DA SILVA; DA SILVA; PAGGIOLI, 2005).

O SAB tem sido utilizado na separação, pré-concentração (RODRIGUES et al., 2010) e purificação (ASENJO; ANDREWS, 2012) de diversos analitos orgânicos (ASENJO; ANDREWS, 2012), biomoléculas (EVERBEG et al., 2006; FREIX et al., 2006), corante (MAGESTE et al., 2009) e íons (LACERDA et al., 2009; PATRICIO et al., 2011).

Variáveis como pH, composição do sistema, natureza do eletrólito formador do SAB, natureza e massa molar do polímero, bem como a temperatura, afetam o comportamento de partição de analitos no sistema (POWELL; KERBY; ROWELL, 1990).

Desse modo, neste trabalho foram investigados os comportamentos de partição do AAS e seu metabólito AS em SABs, os quais foram aplicados pela primeira vez para extração/partição destas substâncias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o comportamento de partição do Ácido Acetilsalicílico -AAS e do Ácido Salicílico -AS em sistemas aquosos bifásicos formados por um polímero (ou copolímero), eletrólito e água, visando a pré-concentração desses analitos para possível desenvolvimento de um método analítico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da mudança univariada dos seguintes parâmetros nos equilíbrios envolvidos no processo de transferência de fase do AAS:

  - ✓ comprimento da linha de amarração (CLA);
  - ✓ pH do meio;
  - ✓ composição global dos SAB's;
  - ✓ natureza química do eletrólito (Li_2SO_4, Na_2SO_4, $MgSO_4$, $Na_2C_4H_4O_6$ e $Na_3C_6H_5O_7$) formador do SAB;
  - ✓ massa molar do polímero (PEO1500 e PEO 4000);
  - ✓ natureza química da macromolécula (L64 ou PEO).

- Avaliar o efeito da mudança multivariada, através de Delineamento Composto Central Rotacional, dos seguintes parâmetros nos equilíbrios envolvidos no processo de transferência de fase do AS:

  - ✓ concentração do polímero formador do SAB;
  - ✓ concentração do sal formador do SAB;
  - ✓ pH do meio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminantes Emergentes

Contaminantes emergentes ou poluentes emergentes são substâncias potencialmente tóxicas, das quais pouco se sabe sobre seus efeitos no meio ambiente. Como muitas dessas substâncias não estão inseridas em normativas ou legislações de controle ambiental ficam as mesmas excluídas dos programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente e saúde (MOREIRA; GONÇALVES, 2011).

Essas substâncias estão presentes em diversas atividades humanas e consequentemente nos produtos de consumo humano e veterinário, tais como, fármacos, produtos de higiene pessoal, retardantes de chamas, surfactantes, metabolitos, aditivos industriais, aditivos de gasolina, pesticidas, entre outros (ARIAS, 2013). O impacto ambiental que os contaminantes emergentes causam fica evidente quando se observa que, atualmente, 60 milhões de substâncias químicas são conhecidas e registradas. Nos Estados Unidos são sintetizadas de 1200 a 1500 novas substâncias por ano, em escala industrial, são produzidos aproximadamente 3000 compostos que correspondem a algo em torno de 500 toneladas, de todo esse volume, menos de 45% foram submetidos a algum tipo de teste ecotoxicológico e nem 10% foram testados considerando efeitos deletérios em organismos (KRAMER, 2017).

Ainda são incipientes os conhecimentos sobre os efeitos negativos que os contaminantes emergentes podem causar, mas o maior problema já constado é que, quando entram em contato com os seres vivos podem ter ação no sistema endócrino, ou seja, alteram toda a resposta hormonal do corpo, e por isso são também conhecidos como interferentes endócrinos. Um exemplo notório aconteceu na década de 90, quando pesquisadores americanos observaram que em regiões dos Estados Unidos com grande influência de urbanização havia um desequilíbrio de machos e fêmeas em algumas espécies de peixes. A esse problema foi relacionada a presença dos interferentes endócrinos, como os hormônios sexuais femininos, que eram lançados através dos esgotos na região. Os hormônios agiam nos peixes machos tornando-os assexuados e em alguns casos fazendo com que eles começassem a ovular (KRAMER, 2017). Portanto, necessário se faz destacar e alertar para os possíveis efeitos negativos sobre as futuras gerações, justificando assim, a importância que tem sido atribuída às substâncias capazes de atuarem sobre o sistema endócrino (MOREIRA; GONÇALVES, 2013).

A emergência atribuída à caracterização dos efeitos negativos dos contaminantes emergentes têm contribuído para que novas metodologias de monitoramento ambiental sejam

desenvolvidas. O desenvolvimento de equipamentos cada vez mais sensíveis têm possibilitado a obtenção de resultados analíticos mais confiáveis e reprodutíveis para o entendimento dos processos toxicológicos e ecotoxológicos (MOREIRA; GONÇALVES, 2013).

Entre os contaminantes emergentes, destaca-se os fármacos pela grande variedade de novos medicamentos sintetizados todos os anos, atrelando-se a esse fato, o alto consumo dos mesmos.

3.2 Mercado farmacêutico brasileiro

Considerado um dos setores industriais mais importantes do mundo, a indústria farmacêutica tem como objetivo fundamental a produção de medicamentos. A visão do setor farmacêutico como um mercado global teve seu início no fim do século XIX, com um grande crescimento a partir dos anos de 1920, devido a intensificação da pesquisa científica aplicada à indústria e a produção em maior escala. Uma vez que a expectativa e a qualidade de vida da época eram limitadas, existia uma imensa demanda por medicamentos, encontrando o mercado farmacêutico um ambiente favorável para o seu desenvolvimento. Como consequência de um mercado altamente dinâmico devido ao surgimento de novas doenças e a cura ainda não estabelecida de tantas outras, exigia-se constantemente desse setor, atividades de pesquisa e desenvolvimento, e fortes ações de apelo comercial (DUARTE et al., 2015).

No Brasil, o surgimento e o desenvolvimento da indústria farmacêutica se deu entre o fim do período Monárquico e a formação do Estado brasileiro (DUARTE et al., 2015). Ainda sob o reinado de Dom Pedro II, o doutor João Daudt Filho, fundador do laboratório Daudt Freitas & Cia em Santa Maria no Rio Grande do Sul, registrou seu primeiro produto em 1894, a Bora Borácica, uma pomada cicatrizante (DAUDT, 2017). No mesmo ano da proclamação da República do Brasil, em 1889, foi realizado o primeiro recenseamento da indústria farmacêutica sendo catalogadas 35 empresas no setor, sendo predominante, as de aspectos familiares (BERMUDEZ, 1995). Com a estruturação do Estado brasileiro, o mesmo incentivou a produção de soros, vacinas e medicamentos, a fim de tratar questões de saúde pública e de promover práticas sanitárias de prevenção e de combate a doenças infectocontagiosas, como malária, febre amarela entre outras doenças comuns em países tropicais. Com a intensificação do ciclo do café, no início do XX, a população brasileira cresceu vertiginosamente, devido às ondas de imigração e ampliação do processo de urbanização, que provocaram aumento no número de doenças e epidemias, causadas pelas péssimas condições de higiene dos navios e cortiços da época (DUARTE et al., 2015). Com a evolução vagarosa, mas constante da indústria

farmacêutica nacional, surgiram três instituições responsáveis pela fabricação de medicamentos de origem biológica (soros e vacinas), vegetal e mineral e que ainda se mantêm como empresas de altíssima importância nacional, são elas: 1) O Instituto Butantan que, inicialmente produzia soro antiofídico e vacinas contra a peste e, ainda hoje, configura grande produtor de vacinas, sendo referência global na área; 2) O Instituto Manguinhos (atual Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz), destinado a produzir soro e vacinas para o tratamento da peste bubônica, além de pesquisas biomédicas; e 3) O Instituto Pasteur de São Paulo, referência no estudo da raiva, o qual foi criado em 1903 como uma instituição privada, por um grupo de beneméritos e em 1916, foi doado ao Governo Estadual (DUARTE et al., 2015; RIBEIRO, 2001). Na década de 1950, durante o governo do presidente Juscelino Kubitschek e com a abertura do mercado farmacêutico nacional às empresas estrangeiras, promovida pelos governos militares, o setor iniciou uma era de considerável crescimento e modernização, gerada pela maior concorrência e avanços científicos (DUARTE et al., 2015). Mesmo com as dificuldades inerentes ao mercado nacional de fármacos como, excesso de regulamentação, volatilidade da taxa de câmbio, incerteza geopolítica, instabilidade social, etc; a indústria farmacêutica apresenta, com raras, anos de alta produtividade e lucratividade (GTHEALTHCARE., 2016).

Análises mercadológicas recentes e as projeções para os próximos anos revelam a robustez do mercado de medicamentos em meio à crise econômica brasileira que deu seus primeiros indícios no fim de 2012. Entre 2007 e 2011, as vendas de medicamentos no varejo cresceram de forma acumulada cerca de 82,2%, saltando de R$ 23,6 bilhões para R$ 43 bilhões, de acordo com um relatório da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa – Interfarma (KIHARA et al., 2008). Entre os anos de 2014 e 2015, o setor farmacêutico experimentou um aumento de 12% no faturamento, representando quase R$ 11 bilhões faturados durante esse período. No quesito doses comercializadas houve um aumento no de 8,4%, com os números passando de quase 115 bilhões para cerca de 125 bilhões de unidades. Em relação a 2010, o ano de 2015 teve um aumento no número de doses vendidas de aproximadamente 57% (BRASIL, 2016).

O ano de 2016 apresentou grandes dificuldades para vários setores da economia, sendo o setor farmacêutico uma exceção. Enquanto a economia brasileira permaneceu em recessão em 2016, em relação à 2015, a expectativa para o setor farmacêutico era de um de crescimento de 8% em unidades e de quase 15% em faturamento ao longo de todo o ano. Embora o crescimento seja menor do que a faixa geral de 12% a 15% apresentada em anos anteriores, ainda assim o setor se mostrou mais resistente do que outros. A previsão para os próximos anos segue positiva, segundo a consultoria ISM Health, uma das maiores empresas de consultoria do

setor farmacêutico, a expectativa é que o mercado movimente R$ 87 bilhões até 2017. Se a economia brasileira recuperar parte da sua força no biênio 2017-2018, o setor pode conquistar ainda mais mercado (BRASIL, 2016).

3.3 Ácido Acetil Salicílico e Ácido Salicílico

3.3.1 Ácido Acetil Salicílico

O uso de ácido acetil salicílico – AAS como substância para alívio de dores e febres trata-se um daqueles casos em que o consumo de um dado produto se difunde silenciosamente pelo estabelecimento de um hábito corriqueiro. Anotações datadas de 1.500 a.C., conhecidas como papiros de Ebers, recomendavam o uso da infusão de folhas secas de murta para o alívio de dores reumáticas. Mil anos se passaram e Hipócrates, o pai da medicina, indicou infusão da casca do salgueiro para aliviar as dores do parto e diminuir a febre. Passados centenas de anos é que se deu nome de salicilato à substância presente nessas e outras plantas, capaz de aliviar dores e febre. O nome salicilato deriva-se de salix, denominação latina ao grupo de plantas a que pertence o salgueiro (BAYER, 2016).

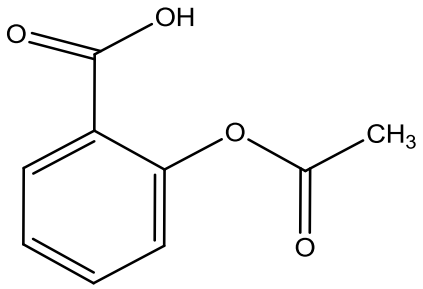
A estrutura química do AAS foi sintetizada pela primeira vez quando o químico alemão Felix Hoffman Kolbe buscava um substituto para o salicilato de sódio, medicamento usado naquela época no tratamento de artrite, mas que exigia grandes doses diárias e provocava irritação e fortes dores estomacais nos pacientes. A nova droga tinha as mesmas propriedades do salicilato de sódio, mas conseguia melhorar a qualidade de vida dos portadores de artrite e gerava menos efeitos colaterais. Funcionário do laboratório Bayer, os superiores de Hoffman não viam futuro no AAS, mas nascia ali um dos medicamentos mais consumidos no mundo (MASSABNI, 2006).

O uso comercial em escala global do AAS surgiu com o registro do medicamento Aspirina. Foi o farmacêutico chefe da "Farbenfabriken Friedrich Bayer & Co." professor Heinrich Dreser quem deu o nome de Aspirina® ao AAS: O "A" vem de acetil, a segunda sílaba "spir" faz uma alusão a Spiraea ulmaria, nome científico da planta de onde pode se obter ácido salicílico, e por fim o sufixo "in", comumente utilizado na época (BAYER, 2016).

A caracterização do AAS o revela como um pó branco cristalino e inodoro, de massa molar 180,15 g mol^{-1}; densidade relativa de 1,4 g ml^{-1}; pontos de fusão e ebulição de 135 °C e 140 °C, respectivamente. Solubilidade em água: 0,3 g 100 g^{-1} (25 °C), solúvel em álcool e éter (DE TEVES, 2007). O AAS é um composto orgânico com dois grupos funcionais distintos,

sendo um grupo funcional ácido carboxílico e um grupo éster (FOGAÇA, 2016). A estrutura molecular do AAS está representada na Figura 4:

Figura 4 - Estrutura molecular do Ácido Acetil Salicílico.



A classificação farmacológica do AAS o condiciona ao grupo dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroides, com propriedade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição irreversível da enzima ciclooxigenase, envolvida na síntese das prostaglandinas, tendo como consequência uma redução nos sintomas de inflamação e dor (ANVISA, 1999). Esse mecanismo foi elucidado nos anos 70 pelo cientista britânico John Vane. O cientista observou que após alguns tipos de ferimentos havia a liberação de substâncias chamadas de prostaglandinas, sendo que dois tipos dessas substâncias provocavam febre e vermelhidão no local do ferimento como consequência do processo inflamatório. Vane e colaboradores descobriram que o AAS bloqueava a síntese de prostaglandinas, evitando a formação de plaquetas, sendo consequentemente indicado para doenças e indisposições relacionadas ao sistema vascular (MASSABNI, 2006).

O AAS é usado para o alívio da dor e de quadros febris, tais como resfriados e gripes, para controle da temperatura e alívio das dores musculares e das articulações. Também é usado nos distúrbios inflamatórios agudos e crônicos, tais como artrite reumatoide, osteoartrite e espondilite anquilosante. Porém, o ASS possuí um quadro amplo de efeitos colaterais, sendo alguns desses: (1) desencadear broncoespasmo e crises de asma ou outras reações de hipersensibilidade; (2) levar a um aumento da tendência a sangramentos durante e após intervenções cirúrgicas, inclusive cirurgias de pequeno porte, como por exemplo, extrações dentárias; (3) mesmo em pequenas doses, o AAS reduz a excreção do ácido úrico, podendo desencadear crises de gota em pacientes predispostos; (4) em pacientes que sofrem de deficiência grave de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), o AAS pode induzir a hemólise ou anemia hemolítica; (5) dose elevada, febre ou infecções agudas são fatores que podem aumentar o risco de hemólise (ANVISA, 1999).

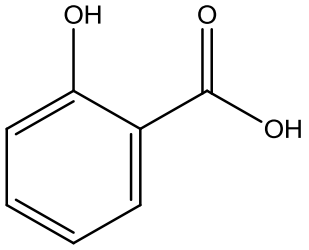
3.3.2 Ácido Salicílico

Mesmo com o uso comum e de longa data das infusões da casca de salgueiro como remédio natural para o combate à febre, inflamações e dores de um modo geral, somente em 1828 o ácido salicílico - AS foi isolado em sua forma pura pelo farmacêutico francês Henri Leroux e pelo químico italiano Raffaele Piria. Uma constatação à época era a de que o uso oral de ácido salicílico como substância antipirética e anti-inflamatória era eficiente no combate de febres e dores, porém igualmente agressivo ao sistema gastrointestinal. Com a síntese do AAS pela conjugação do ácido salicílico com acetato em 1897 pelo laboratório farmacêutico Bayer, obteve-se um composto igualmente eficiente, porém menos agressivo (FONSECA; MEJIA, 2015).

Com o sucesso no uso do AAS no lugar do AS no combate às dores de um modo geral, o AS em sua forma primária é, atualmente, uma das principais matérias primas da indústria de cosméticos. O AS é fortemente empregado como agente de terapia externa superficial em tratamentos dermatológicos, sendo um dos princípios ativos de maior eficiência e segurança empregados em formulações que têm como objetivo produzir uma lesão (esfoliação) controlada na pele, para a remoção de rugas, verrugas, calos e acnes (RAMOS et al., 2005). O AS tem propriedades queratolíticas (afina a camada espessada da pele) e antimicrobiana (evitando a contaminação de bactérias e fungos oportunistas). É utilizado no tratamento de pele hiperqueratótica (muito espessada), em condições de descamação como: caspa, dermatite seborréica, ictiose, psoríase e acne. É caracterizado ainda por ser um regularizador da oleosidade (PIATTI, 2015).

O AS (ácido 2-hidroxi-benzóico) é um hidróxi ácido de massa molar 138,12 g mol^{-1}. Tem o aspecto de um pó cristalino de cor branca, solúvel em água e muito solúvel em etanol e éter. O AS é um ácido orgânico com pKa = 3,0, enquanto que, o AAS possui pKa = 3,5 (E SÁ, 2006). A fórmula estrutural do AS está representada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura molecular do Ácido Salicílico.



As aplicações do ácido salicílico vão desde o setor farmacêutico como base para a fabricação de AAS (BAYER, 2016); passa pelo setor agrícola como um fito hormônio secundário e que está relacionado a abertura de estômatos, germinação de sementes e principalmente na resistência contra o ataque de patógenos(RIGAZZO et al., 2016; SILVA et al., 2016); segue pela indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal na fabricação de shampoos, sabonetes e cremes de rejovencimento facial, entre outros (PIATTI, 2015; YOKOMIZO et al., 2013) e; insumo base para a fabricação de salicilatos para a indústria química entre outras áreas (CAVALCANTE et al., 2015).

3.3.3 Determinações analíticas entre o AAS e o AS

A síntese industrial do AAS é realizada pela acetilação do AS utilizando anidrido acético em meio ácido. Quando o processo sintético é insatisfatório, observa-se pequenas quantidades de AS como impureza na produção do AAS. O AS, apesar de possuir propriedades farmacológicas semelhantes ao AAS, possui gosto amargo e provoca irritações estomacais (UHDRE; NEZI; ROMERO, 2011). Outro fator à ser analisado é de que as propriedades farmacocinéticas do AAS revelam que após a administração oral, o mesmo é rápida e completamente absorvido no trato gastrintestinal e que durante e após a absorção, o AAS é convertido à AS, seu principal metabólito ativo. O AS é excretado principalmente por via renal (ANVISA, 1999).

A bioconversão e a possível degradação do AAS em AS e a consequente disseminação destes salicilatos pelo meio ambiente evidenciam a necessidade da elaboração de novas técnicas e metodologias de determinação dessas substâncias que possam distingui-las com precisão, uma vez que a semelhança estrutural das mesmas e a fácil conversão entre elas podem distorcer resultados analíticos.

Atualmente, alguns estudos analíticos com base à determinação simultânea e/ou separação do AAS e AS veem sendo publicados, além de estudos com base no comportamento molecular dessas substâncias em variados meios. Em seus estudos De Aguiar et al. (2009) teve como objetivo mostrar a validação intralaboratorial de um novo método por cromatografia em fase líquida para dosar o AAS e o AS em comprimidos, obtendo resultados melhores, referentes à adequação do sistema, do que a metodologia por cromatografia em fase líquida da Farmacopéia Americana (USP 30) e vantagens metodológicas sobre a metodologia volumétrica da Farmacopéia Brasileira. UHDRE, NEZI e ROMERO (2011) avaliaram, qualitativamente, a presença de AS em nove produtos à base de AAS utilizando o método “spot test”. Este método

é baseado na formação do complexo de cor roxa intensa entre o AS e íons Fe (III). Sirok et al. (2016) desenvolveram um método robusto e sensível para a detecção simultânea de AAS e AS no plasma humano por meio de cromatografia líquida acoplada à um espectrômetro de massas, segundo os autores o método desenvolvido pode contribuir para a melhoria da determinação do AAS e AS em pacientes sob terapia antitrombótica e para a redução do risco de resistência ao AAS associada a problemas de biodisponibilidade/exposição (não conformidade, má administração, má absorção).

As técnicas instrumentais de determinação de substâncias são o fundamento central das análises químicas, porém outro aspecto igualmente importante quanto à determinação analítica desses fármacos e demais substâncias potencialmente agressivas ao meio ambiente está nas técnicas de preparo de amostras com ênfase para os métodos de pré-concentração e extração, uma vez que muitos contaminantes estão presentes nos efluentes, reservas aquáticas subterrâneas e solos em baixas concentrações. Assim, preparar as amostras para análises quantitativas e/ou qualitativas por métodos de pré-concentração e extração são fundamentais para a obtenção de resultados analiticamente confiáveis e reprodutíveis (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Dentre as várias técnicas utilizadas para o preparo de amostras, destacam-se a microextração em fase sólida (MEFS), a extração por ponto nuvem (EPN) e a microextração em fase líquida (MEFL). Diversos trabalhos estão sendo executados utilizando-se pelo menos uma dessas técnicas para o preparo de amostras.

A MEFS é uma técnica que se utiliza de bastão de fibra de sílica fundida (fase sólida), de 110 a 160 µm de diâmetro e 10 mm de comprimento recoberto com um filme fino de um polímero (polidimetilsiloxano - PDMS, poliacrilato - PA ou Carbowax - Cwx) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado - Carboxen). O processo de extração se dá pela imersão do bastão na amostra quando o analito alvo não é volátil, quando volátil, o bastão é mantido acima do nível da amostra (modo headspace), sendo os compostos voláteis adsorvidos na estrutura sólida. Realizada a extração, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Queiroz (2009) em seu estudo sobre microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos, concluiu que quando comparada aos métodos convencionais de extração, a MEFS apresenta uma série de vantagens, tais como: a não utilização de solvente orgânico, integração da extração e da concentração do soluto em uma única etapa em um dispositivo extrator (de pouca reutilização) e introdução deste dispositivo no sistema analítico para o processo de dessorção.

A MEFS apresenta algumas limitações para análises de fármacos em fluidos biológicos, tais como: baixa estabilidade das fases extratoras na presença de solventes orgânicos ou em valores de pH extremos; número limitado de fases extratoras disponíveis no mercado; e adsorção irreversível dos compostos endógenos da matriz junto às fases extratoras diminuindo a eficiência do processo de extração.

A EPN é uma técnica de extração/pré-concentração que se fundamenta nas propriedades que apresentam os tensoativos não-iônicos polietoxilados, quando em temperaturas superiores à curva de separação em ponto crítico nos diagramas de fases temperatura-composição. Quando a temperatura do meio ultrapassa os valores desta curva, uma solução de tensoativo separa-se em duas fases isotrópicas apresentando um meio turvo. A fase de maior concentração em tensoativo, denominada fase rica, encontrasse em equilíbrio com a fase pobre, a qual apresenta baixa concentração de tensoativos. Fisicamente, o aumento da temperatura provoca a desidratação do grupo hidrofílico das moléculas de tensoativo, aumentando por consequência, a agregação e o tamanho das micelas até que o fenômeno de separação de fases ocorra. Assim, quando uma solução aquosa contendo um composto orgânico simples ou uma macromolécula biológica, pouco solúvel em água, é adicionada ao meio, o analito em questão particionará preferencialmente para a fase rica, devido a sua solubilização nos agregados micelares. Este fenômeno pode ser atribuído ao equilíbrio entre as interações hidrofóbicas e eletrostáticas que ocorre entre os analitos e o sistema micelar. Estabelece-se assim, um equilíbrio cujas características dependem da natureza e quantidade de tensoativo, da natureza e quantidade de analito e da temperatura (DUARTE; CANSELIER, 2005). Faria, Queiroz e Neves (2005) estudaram o uso da EPN como técnica alternativa para extração de resíduos de agrotóxicos em diferentes matrizes. Pinto, Pavón e Cordero (1995) determinaram agrotóxicos organofosforados, tais como metil paration, etil paration, paroxon e feniltrotion, em amostras de água de rio, empregando EPN com o surfactante não-iônico Triton X-114 antes da análise por cromatografia líquida com detecção eletroquímica. Um fator limitante dessa técnica está condicionado a qualquer componente presente na água que seja capaz de se associar às micelas, ou de ser dissolvido em seu interior orgânico, que atua como fase pseudo-orgânica (FARIA; QUEIROZ; NEVES, 2005).

Por fim, a MEFL, é uma miniaturização da clássica técnica de extração líquido-líquido, cujo os principais objetivos estão na redução da razão volumétrica entre a fase aquosa (chamada de doadora) e a fase orgânica (denominada de aceptora), buscando elevados fatores de enriquecimento da fase aceptora. Isto pode ser obtido usando tanto fases líquidas imiscíveis (microextração em gota suspensa), membranas separando as fases aceptora e doadora (extração

em membrana) e fibras ocas. No geral, as principais variações entre essas técnicas estão na instrumentação e no modo de operação, mas o fundamento central está na imiscibilidade relativa das fases doadora e aceptora (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008). Vários trabalhos têm sido publicados utilizando-se da MEFL como técnica de preparo de amostra a fim de extrair e pré-concentrar fármacos ou poluentes ambientais em amostras biológicas (plasma, sangue total, urina, entre outras). Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) empregaram a MEFL na análise de amostras de plasma tendo metanfetamina como analito de estudo. Halvorsen, Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (2001) aplicaram a MEFL em sangue total tendo metanfetamina e citalopram como fármacos alvo, obtendo alta seletividade (livre de interferentes) e com bom grau de enriquecimento. De Oliveira *et al.* (2008) desenvolveram um método para análise enantiosseletiva da hidroxicloroquina e metabólitos em urina empregando n-octanol como solvente de extração e posterior análise por Eletroforese Capilar - EC.

Assim como as outras técnicas de extração, a MEFL também apresenta algumas desvantagens. Analitos altamente polares e hidrofílicos são difíceis de serem extraídos, sendo frequentemente necessária a adição de par-iônico na amostra, sendo essa uma das possíveis razões para que fármacos como o AAS e o AS não sejam pré-concentrados por estas técnicas, devido aos seus aspectos polares presentes nas suas funções orgânicas (ácido carboxílico e éster no AAS; o radical hidroxila e o ácido carboxílico no AS), o que também vale paras as técnicas de EPN e MEFS. Além disso, somente solventes com alto ponto de ebulição e altamente insolúveis em água devem ser utilizados, limitando um pouco a seletividade do método (DE OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, as técnicas que se utilizam de solventes orgânicos adicionam às metodologias analíticas a desvantagem dos mesmos, serem em alguns casos, tóxicos e/ou inflamáveis, além de outros aspectos limitantes, principalmente quando os analitos de interesse são moléculas biológicas que possivelmente terão suas atividades anuladas. Assim, a busca pela aplicação de técnicas analíticas mais limpas (sem o uso de reagentes tóxicos, cancerígenos e/ou mutagênicos) e seguras (sem reagentes inflamáveis, corrosivos ou oxidantes potentes) estão em destaque no meio acadêmico pela implantação da filosofia da Química Verde.

3.4 Química Verde: Uma nova concepção para o uso de técnicas e processos químicos ambientalmente mais seguros.

Desde a conferência em Estocolmo sobre o meio ambiente, em 1972, até os dias atuais, muito tem se proposto e dialogado sobre segurança ambiental. Esse encontro teve como marco

alertar ao mundo para os perigos à curto, médio e longo prazo para o uso irracional dos recursos naturais bem como o aumento vertiginoso dos resíduos industriais tóxicos, cancerígenos, mutagênicos e persistentes, entre outros possíveis efeitos negativos causados ao ecossistema e consequentemente à cadeia alimentar humana. Depois da ECO- 92, uma reunião que contou com a presença de 179 chefes de Estado, na cidade do Rio de Janeiro em 1992, foi convencionado um documento chamado "Agenda 21". Nesse documento, os líderes presentes se comprometeram a incentivar e prezar pelo chamado desenvolvimento sustentável. Entretanto, uma vez que muitos interesses financeiros são impedidos devido à algumas ações que visam restringir o uso irrestrito de áreas de preservação, leitos de rios e reservas minerais; bem como exigem de empresas e corporações o uso de parte do seus recursos para a recuperação de áreas devastadas, ações de educação ambiental e pesquisa, além de responsabilidade jurídica sobre danos ambientais causados pelas atividades dessas empresas; o "lobby político" tem dificultado muitas ações das agendas de segurança ambiental criadas até aqui (DA SILVA; DE LACERDA; JUNIOR, 2005)

Em meio a tantos trâmites burocráticos e jogos de interesses, a comunidade acadêmica surgiu como uma salvaguarda para a solução de alguns problemas ambientais impedidos de serem resolvidos pelas vias políticas e legais. Na área da química e seus diversos ramos produtivos há riscos e potenciais causadores de poluição, uma vez que os processos muitas vezes lidam com substâncias tóxicas, inflamáveis e/ou persistentes e como consequência de sínteses gera-se resíduos ainda mais graves (DA SILVA; DE LACERDA; JUNIOR, 2005). Como parte de suas proposições, a Agenda 21 em seu capítulo 30 propõem a reformulação dos processos para produções mais limpas e é com base nessa proposição que a chamada Química Verde ou Química Limpa tem seu papel fundamental como uma nova filosofia de prevenção aos danos causados pela indústria química e seus diversos ramos produtivos. Essa nova forma de pensar a química tem como objetivo desenvolver metodologias e/ou processos que usem e gerem a menor quantidade de materiais tóxicos e/ou inflamáveis possíveis, minimizando os riscos e reduzindo ao máximo a produção de resíduos e consequentemente os gastos para tratá-los. A Química Verde está suportada sobre os seguintes princípios (ANASTAS; EGHBALI, 2010; DA SILVA; DE LACERDA; JUNIOR, 2005):

1. Melhor prevenir do que tratar resíduos químicos;
2. Otimizar ao máximo a incorporação de toda a massa dos reagentes no produto (Economia Atômica);

3. Sendo viáveis, as metodologias devem usar e gerar substâncias menos tóxicas possíveis;
4. Projetar produtos químicos com maior eficiência no cumprimento de suas funções;
5. Evitar utilização de intermediários de processo;
6. Optar por métodos de síntese que consumam o mínimo de energia, dando atenção aos que possam ser realizados à temperatura e pressão ambientes;
7. Optar por matéria-prima proveniente de fontes renováveis;
8. Optar ou planejar por metodologias que não requerem derivatizações como grupos de proteção;
9. Optar pelo uso de catalisadores cada vez mais eficientes;
10. O planejamento dos produtos químicos deve levar em consideração o seu descarte e que os seus produtos de degradação sejam inofensivos;
11. As metodologias analíticas devem ser desenvolvidas para monitoramento de processos em tempo real controlando, a princípio, a formação de substâncias perigosas e;
12. As substâncias e a forma como são empregadas no processo químico devem minimizar potenciais acidentes.

Um dos principais alvos dos estudos envolvendo química verde e segurança ambiental é o monitoramento da qualidade das águas, solos, atmosfera, etc. Assim, diversas agências de controle ambiental foram criadas afim de que esses monitoramentos fossem corretamente executados. Dentre elas, destacam-se a Environmental Protection Agency (EPA) que, atualmente, é um dos principais órgãos de controle ambiental do mundo e, em âmbito nacional, o Ministério do Meio Ambiente (MMA), representado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (RODRIGUES et al., 2010).

Com o olhar da Química Verde, novas técnicas foram incorporadas aos procedimentos analíticos convencionais com o objetivo de se desenvolver "métodos limpos" de monitoramento, pré-concentração e extração. Entre os métodos de extração e pré-concentração destaca-se os Sistemas Aquosos Bifásicos – SAB por ser um método composto majoritariamente por água, o que elimina o uso de solventes orgânicos no processo de extração. Outras vantagens apresentadas pelos SAB são simplicidade; baixo custo; rápido processo de separação de fase e, possibilidade de reciclagem dos componentes do sistema, que em alguns casos são biodegradáveis (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.5 Sistema Aquoso Bifásico

3.5.1 Histórico e desenvolvimento do método

O SAB foi relatado pela primeira vez em 1896 quando Beijerinck observou que soluções aquosas de gelatina e Agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de concentrações e mantidas sob repouso separavam espontaneamente em duas fases líquidas, com a fase superior rica em gelatina e fase inferior enriquecida com ágar (ou amido), sendo a água, o componente de maior concentração em ambas as fases (DA SILVA; LOH, 2006).

Passados mais de 30 anos, Ostwald e Hertel (1929) verificaram que amidos distintos produziam diferentes diagramas de fase, revelando esses resultados, a influência direta que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Buscando elucidar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fase em sistemas contendo macromoléculas, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, estudaram a imiscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Estes constataram que dos 35 pares de macromoléculas avaliados, apenas 4 não produziram sistemas bifásicos, constatando que a incompatibilidade entre polímeros era um fenômeno geral (DA SILVA; LOH, 2006; DIAMOND; HSU, 1992).

Até então, todas essas informações não se encontravam reunidas e aplicadas como um método analítico de extração e separação. Porém, todos esses estudos supracitados foram utilizados por Per-Åke Albertsson, em meados da década de 50, nas suas pesquisas de partição de proteínas, revelando-se esses sistemas como meios adequados para partição e purificação de materiais biológicos como proteínas e células, pois a água é o solvente presente em ambas as fases e encontra-se como componente em maior concentração mássica do sistema. Assim, o SAB fornece um ambiente favorável para biomoléculas evitando que as mesmas sofram mudanças em suas estruturas e perda nas atividades biológicas por desnaturação. Outro fator positivamente considerável foi o estabelecimento de um método ambientalmente mais seguro pela não utilização de solventes orgânicos, que são, de um modo geral, tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis, caracterizando-se o SAB como uma metodologia segura tanto para o meio ambiente quanto para os manipuladores da técnica (DA SILVA; LOH, 2006).

Atualmente, o SAB é aplicado como método de partição e concentração em uma vasta gama de analitos, como organelas celulares (BANIK et al., 2003; SANTESSON et al., 2004), proteínas (HAGHTALAB; MOKTHTARANI; MAURER, 2003), enzimas (FERREIRA et al.,

2011) antioxidantes (SANTOS et al., 2015), DNA (EVERBEG et al., 2006), nanopartículas (ALEJANDRO; LING; LYDDIATT, 2007), íons (LACERDA et al., 2009; PATRÍCIO et al., 2011) e corante (MAGESTE et al., 2009).

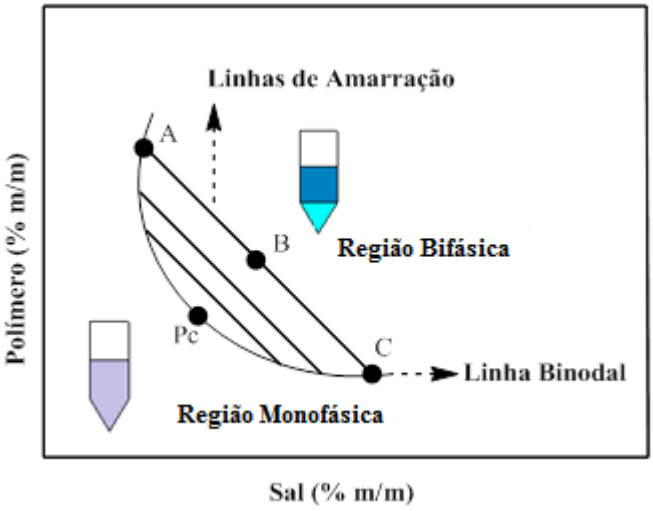
3.5.2 Fundamentos dos SAB's

O SAB é um método de extração líquido-líquido e baseia-se na imiscibilidade de muitas soluções de espécies químicas que, quando misturadas em uma certa faixa de concentrações, separaram-se em duas fases líquidas com composições diferentes. Estando as fases em equilíbrio termodinâmico, o fenômeno é um exemplo de equilíbrio líquido-líquido, procedimento esse muito utilizado em operações industriais de extração/separação (SMITH; VAN NESS; ABOTT, 2000). A extração líquido-líquido separa componentes de uma solução submetida ao contato direto com um líquido imiscível ou parcialmente miscível (solvente). Quando o equilíbrio é atingido, cada uma das fases conterá concentrações iguais ou distintas das espécies particionadas (FOUST et al., 1982).

No que se refere ao SAB, o mesmo pode ser formado pela mistura de duas soluções aquosas de polímeros distintos ou pela mistura de uma solução aquosa de polímero e uma solução aquosa de um determinado sal inorgânico ou orgânico, ou ainda, pela mistura de duas soluções salinas, sendo que uma delas à base de um líquido iônico. Assim, sob determinadas condições de concentração, temperatura e pressão, duas fases são formadas, o que define o nome do sistema por bifásico. Essas duas fases apresentam propriedades termodinâmicas intensivas distintas como densidade, índice de refração, pressão e composição (MARTINS, 2008). Nos sistemas Polímero-Sal, geralmente, a fase superior (FS) é rica em polímero e a inferior (FI) em sal, sendo a água o constituinte majoritário em ambas (DA SILVA; LOH, 2006).

A composição das duas fases que se encontram em equilíbrio é, geralmente, representada em diagramas de fase à uma temperatura e pressão constante. Os diagramas podem assumir uma estrutura retangular ou triangular com as composições dadas, geralmente, em porcentagem mássica %(m/m). No caso de um diagrama dado em coordenadas retangulares (Figura 6) o eixo das abcissas representa a concentração de sal e o eixo das ordenadas a concentração de polímero.

Figura 6 - Representação esquemática de um diagrama de fases retangular para um SAB.



Fonte: Autor

O diagrama de fases revela também em quais composições globais os sistemas se mantém homogêneos ou se separam em duas fases. A separação dessas duas regiões são delimitadas pela Linha Binodal - LB que pode ser determinada experimentalmente por diversos métodos, sendo os mais empregados o de titulação turbidimétrica e análise das composições das fases (DA SILVA et al., 2006). Assim, quando pontos globais abaixo da LB são escolhidos o sistema permanece homogêneo, do contrário, pontos escolhidos acima da LB resultarão em um sistema bifásico, desde que respeitado os limites de solubilidade dos polímeros e eletrólitos durante o preparo das soluções aquosas dos mesmos (JÚNIOR, 2006). Vários fatores como a massa molar do polímero, os cátions e os ânions dos sais, a temperatura e o pH interferem na forma e angulação da linha binodal. A binodal representa também, a composição das fases superior e inferior nas Linhas de Amarração – LA (MARTINS, 2008).

As LA's ligam pontos no diagrama de fase que representam a composição das duas fases em equilíbrio, assim, considerando a linha de amarração dada pelo seguimento de reta ABC (Figura 6), o ponto B representa uma dada composição global, sendo que o ponto A fornece a composição de polímero-sal da fase superior e o ponto C a composição polímero-sal da fase inferior no sistema definido pelo ponto B. Além do mais, todos os pontos que se encontram na região bifásica e que estejam sobre uma mesma linha de amarração geram sistemas com fases superiores com propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, entre outras) e propriedades termodinâmicas extensivas diferentes (massa, volume, etc). Sendo o mesmo princípio aplicado às fases inferiores (CUNHA, 2008; MARTINS, 2008). O ponto Pc, chamado de ponto crítico, representa um ponto

teórico/hipotético no qual a composição e volume das fases superior e inferior são iguais (JÚNIOR, 2006). Trata-se de um ponto onde não é possível distinguir uma fase da outra, pois as mesmas possuem propriedades termodinâmicas idênticas, o que confere ao sistema um estado termodinâmico de alta instabilidade, sendo as propriedades alteradas constantemente (MARTINS, 2008).

Com base no diagrama de fase um outro parâmetro importante relacionado ao SAB é o Comprimento da Linha de Amarração – CLA, fisicamente esse parâmetro mede a diferença das propriedades termodinâmicas intensivas entre as fases em equilíbrio e matematicamente é um número calculado que mede a distância entre os pontos de composição das FS e FI em equilíbrio no diagrama de fases (Figura 6). A CLA é calculada em função das diferenças de concentração dos componentes em cada fase do sistema, de acordo com a Equação 1 (DA SILVA; LOH, 2006).

$$CLA = \sqrt{(C_{pol}^{FS} - C_{pol}^{FI})^2 + (C_{sal}^{FS} - C_{sal}^{FI})^2} \qquad (1)$$

onde, C_{pol}^{FS} e C_{pol}^{FI} são as concentrações em massa (% m/m) de polímero das fases superior e inferior, respectivamente, enquanto que, C_{sal}^{FS} e C_{sal}^{FI} são as concentrações em massa do sal nas fases superior e inferior, respectivamente.

Quanto maior o valor do CLA, maior será a diferença entre as propriedades termodinâmicas intensivas das fases, pois a concentração de polímero na fase superior será cada vez maior e a concentração de sal nessa fase menor, sendo o inverso válido para a fase inferior. Assim, como consequência, haverá um aumento na eficiência de transferência do soluto de interesse para a fase na qual suas interações sejam mais efetivas (DE BRITO, 2007).

3.5.3 Coeficiente de Partição

Entre os vários parâmetros que compõem os estudos e elucidações a respeito do Sistema Aquoso Bifásico, um dos mais importantes é o Coeficiente de Partição – K. Trata-se de um parâmetro termodinâmico que indica o sentido preferencial de partição do analito entre as fases do sistema. Matematicamente é definido pela razão entre as atividades (a_i) dos analitos encontrados nas fases superior e inferior, respectivamente. Porém, em se tratando de estudos de partição costuma-se empregar o analito em baixas concentrações e nesses casos considera-se que essa espécie esteja sob diluição infinita e assim, o coeficiente de atividade sob essa

condição, empregado para corrigir o valor da concentração, tenderá a 1 e o valor da atividade será aproximado ao da concentração. Assim, o coeficiente de partição é dado pela Equação 2 (DE BRITO, 2007):

$$K = \frac{[analito]_i^{FS}}{[analito]_i^{FI}} \qquad (2)$$

onde, $[analito]_i^{FS}$ e $[analito]_i^{FI}$ são as concentrações, do analito "i" presente nas FS e FI, respectivamente.

Todos os mecanismos que governam a partição de um analito entre as fases de um sistema não foram, ainda, completamente esclarecidos. Assim, no intuito de melhor compreender as forças que regem a partição de um soluto no SAB, as conclusões experimentais a respeito da partição são interpretadas com base em modelos de termodinâmica estatística, no presente trabalho, o de Haynes *et al*, extraído da teoria de Flory-Huggins (DE BRITO, 2007). Em geral, esses modelos foram estabelecidos com a intenção de descreverem com maior riqueza de detalhes, os processos dominantes em soluções poliméricas (DA SILVA; LOH, 2006).

A teoria de rede de Flory-Huggins define as macromoléculas como estruturas lineares e flexíveis dotadas de segmentos idênticos. Considerando a macromolécula em solução, seus segmentos encontram-se em uma rede tridimensional, onde cada segmento preenche um sítio da rede e o volume ocupado por cada um desses segmentos são iguais aos volumes ocupados pelas moléculas do solvente, que também ocupam outros sítios na rede (DE BRITO, 2007).

Com base na clássica equação, $\Delta_{mis}G = \Delta_{mis}H - T\Delta_{mis}S$, observa-se que a energia livre de Gibbs de mistura ($\Delta_{mis}G$) está em função de uma parcela de contribuição entálpica (Δ_{mis} H) e outra parcela de contribuição entrópica ($\Delta_{mis}S$) (DA SILVA; LOH, 2006). A teoria de Flory-Huggins define a contribuição entálpica através das interações intermoleculares entre as espécies constituintes do sistema pela ocorrência de rupturas e formações de pares potenciais. Considera-se também que o retículo contendo segmentos de macromoléculas e moléculas de solvente, é incompressível, tornando possível o estabelecimento da igualdade entre a variação da entalpia de mistura e a variação da energia interna de mistura - $\Delta_{mis}H = \Delta_{mis}U$, fator esse considerado na equação (3) que define Δ_{mis} H (DE BRITO, 2007):

$$\Delta_{mis}H = N \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^{m} \phi_i \phi_j W_{ij} \qquad (3)$$

Sendo N o número total de sítios do retículo, ϕ_i e ϕ_j são as frações volumétricas dos sítios ocupados pelas espécies 'i' e 'j', respectivamente. Já W_{ij}, é a energia total dos pares potenciais advindos da ruptura e formação de interações intermoleculares.

A parcela entrópica ($\Delta_{mis}S$) é dada pela Equação 4 que revela a dependência da variação da entropia de mistura em função da fração dos sítios ocupados e do grau de polimerização da molécula (DE BRITO, 2007):

$$\Delta_{mis}S = -NR\sum_{i=1}^{m}\frac{\phi_i}{X_i}\ln\phi_i \qquad (4)$$

sendo X_i, o grau de polimerização da macromolécula e R a constante universal dos gases.

A Equação 4 revela que a contribuição entrópica diminui com o aumento do grau de polimerização da macromolécula, uma vez que as junções entre os segmentos das macromoléculas aparecem e tendem a aumentar, além do mais, essas interações entre os segmentos reduzem os graus de liberdade dessas macromoléculas (DE BRITO, 2007).

A partir da teoria de Flory-Huggins, Haynes *et al.*, buscaram determinar, mesmo que de forma qualitativa, as forças motrizes que levam um analito a particionar preferencialmente para uma das fases do SAB. Assim, a força motriz por traz da transferência do analito tem uma componente entálpica e outra entrópica (DA SILVA; LOH, 2006; JÚNIOR, 2006). A componente entrópica é determinada pela Equação 5:

$$\ln K_a = \frac{M_a}{\rho}\left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}}\right) \qquad (5)$$

sendo M_a a massa molar do analito, ρ o número de sítios do retículo por unidade de volume (densidade numérica molecular global do SAB), n^{FS} e n^{FI} são os números totais de moléculas nas fases superior e inferior respectivamente, v^{FS} e v^{FI} são os volumes das fases superior e inferior respectivamente, as razões $\frac{n^{FS}}{V^{FS}}$ e $\frac{n^{FI}}{V^{FI}}$ são as densidades numéricas de moléculas presentes nas respectivas fases.

Em outras palavras, a Equação 5 aponta que nos casos em que o efeito entálpico estiver ausente, o efeito entrópico será preponderante caso ocorra uma diferença significativa no número de moléculas por unidade de volume, entre as fases superior e inferior. E assim, o analito particionará preferencialmente para a fase que possuir maior densidade numérica de

moléculas, o que significa que essa fase oferecerá ao analito maiores possibilidades de ser acomodado de várias maneiras diferentes (DE BRITO, 2007).

Quando, por outro lado, a densidade numérica dos sítios dos retículos em ambas as fases é a mesma e os efeitos entrópicos são nulos, a parcela entálpica contribui para o direcionamento do coeficiente de partição através da Equação 6, expressa matematicamente por (JÚNIOR, 2006):

$$\ln K_a = -\frac{M_a}{RT}\left[\sum_{i=1(i\neq j)}^{m}\left(\phi_i^{FS}-\phi_i^{FI}\right)W_{ia} - \sum_{i=1(i\neq j)}^{m-1}\sum_{j=i+1(j\neq i)}^{m}\left(\phi_i^{FS}\,\phi_j^{FS}-\phi_i^{FI}\,\phi_j^{FI}\right)W_{ij}\right] \quad (6)$$

sendo todos os termos anteriormente definidos nas Equações 3 e 4.

A contribuição entálpica para a o particionamento do analito possui dois termos, como mostra a equação 6. O primeiro termo representa a variação de energia entálpica do sistema devido à interação do analito com todos os componentes formadores dos SAB's nas duas fases. Assim, este termo expressa a tendência do analito em se transferir para a fase que contém o maior número de moléculas do componente com o qual possui maior afinidade, isto é, onde há maior valor absoluto de W_{ij} (energia total dos pares potenciais) (FRANCISCO, 2006) .

O somatório duplo da Equação (6) revela a diferença de energia associada a cada fase do SAB, devido as variadas interações intermoleculares entre as espécies presentes em cada fase. Esse termo fornece também a entalpia total de formação da fase sem o analito, comumente conhecida como "auto energia" da fase. Assim, há uma relação entre o coeficiente de partição do analito e a auto energia das fases superior e inferior, uma vez que a transferência do analito para uma das fases está condicionada ao rompimento e formação de interações entre as espécies da fase criando espaços capazes de acomodarem o analito. Como consequência disso, o analito se concentrará preferencialmente na fase que possuir maior auto-energia (valor menos negativo ou mais positivo de W_{ij}) afim de minimizar o excesso de energia livre de Gibbs do sistema, isto é, na fase em que há menor interação entre os componentes formadores dos SAB's (DE BRITO, 2007; FRANCISCO, 2006).

Para os casos em que ambos efeitos entálpicos e entrópicos contribuem simultaneamente na partição de um analito, tem-se que o coeficiente de partição é determinado pela soma dos termos, como apresentado na equação7 (FRANCISCO, 2006):

$$\ln K_a = -\frac{M_a}{RT}\left[\sum_{i=1(i\neq j)}^{m}\left(\phi_i^{FS}-\phi_i^{FI}\right)W_{ia} - \sum_{i=1(i\neq j)}^{m-1}\sum_{j=i+1(j\neq i)}^{m}\left(\phi_i^{FS}\,\phi_j^{FS}-\phi_i^{FI}\,\phi_j^{FI}\right)W_{ij}\right]$$

$$+\frac{M_a}{\rho}\left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}}-\frac{n^{FI}}{V^{FI}}\right) \qquad (7)$$

3.6 Aplicações dos SAB's

O comportamento de partição de uma grande variedade de moléculas e partículas tanto orgânicas quanto inorgânicas vêm sendo estudados em SAB's, revelando a vasta possibilidade de combinações desses sistemas quanto aos analitos que se pretende particionar. Encontra-se na literatura vários trabalhos à cerca da aplicação de SAB's para extração e/ou pré-concentração de moléculas orgânicas, como exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Moléculas orgânicas extraídas e/ou pré-concentradas em SAB's.

Biomolécula	SAB	Referências
Cafeína	PEO + Na_2SO_4	(SAMPAIO et al., 2016)
Lipase	PEO + K_2PO_4	(PADILHA; ALEGRE; TAMBOURGI, 2010)
Bromelina	PEO + K_2PO_4	(FERREIRA et al., 2011)
α-Lactoalbumina e β-lactoglobulina	PEO + $Na_3C_6H_5O_7$	(KALAIVANI; REGUPATHI, 2015)
Amaranto e Tartrazina	PEO + $(NH_4)_2SO_4$	(HUDDLESTON et al., 1998)
Ribose, Xilose e Glicose	PEO + Na_2SO_4	(ZHOU et al., 2014)

Através das características estruturais de um determinado analito, pode-se inferir em algumas situações qual a tendência de particionamento do mesmo entre as fases de um sistema. Mageste et al., (2009) estudaram o particionamento do corante natural Carmim de Cochonilha em SAB's e constataram que a maior partição do corante para a fase superior, rica em polímero, está diretamente relacionada às interações entálpicas específicas entre o carmim e as macromoléculas poliméricas.

Em seus estudos sobre a partição do ácido láctico em SAB's, Gargano et al. (2016) através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) obtiveram um sistema ótimo composto de 14% de PEO 1500, 11,5% de Na_2SO_4 em pH 4,5 obtendo valores de K entre 1,26 a 2,17; apesar desses baixos valores de K, o SAB se revelou como mais uma alternativa

economicamente viável e segura para a recuperação e purificação desse que é um dos ácidos mais utilizados pela indústria química, farmacêutica e de alimentos.

A possibilidade de se utilizar o SAB como método de separação evidencia-se no trabalho de Oliveira, Abreu e Pessôa Filho (2007), onde os mesmos estudaram o comportamento de proteínas em sistemas aquosos bifásicos formados por carbamato de amônio e os copolímeros-bloco F38 ou F68, visando à utilização desses sistemas em processos de purificação. Os autores obtiveram os coeficientes de partição das proteínas albumina de soro bovino, lisozima, α-lactoalbumina, β-lactoglobulina, quimotripsina e γ-globulina em sistemas de diversas composições. Os resultados mostraram que este parâmetro variou nas faixas de 0,1 a 0,8 para a albumina de soro bovino, 0,5 a 2,0 para a lisozima, 1,0 a 2,5 para a α-lactalbumina, 0,1 a 1,0 para a β-lactoglobulina e 0,3 a 1,0 para a γ-globulina. Assim, de acordo com as propriedades estabelecidas para cada sistema como a temperatura, o tamanho da cadeia polimérica e o comprimento da linha de amarração, os diferentes valores do coeficiente de partição entre valores acima e abaixo de 1 mostra que é possível separar adequadamente misturas dessas proteínas, o que estabelece esse sistema como uma alternativa a ser considerada no planejamento de processos de recuperação e purificação de bioprodutos.

A utilização do SAB como método de extração demonstra bons valores de eficiência de extração - EE quando o sistema é adequadamente estabelecido de acordo com as características dos analitos que se deseja recuperar. De Souza et al. (2014) em seus estudos de extração de antioxidantes utilizando sistemas aquosos bifásicos (PEG 1500 ou 8000 + [K_2HPO_4/KH_2PO_4]) com líquidos iônicos - LI (família dos imidazólios, conjugados com o ânion cloreto [$C_n$mim]Cl (n = 2 a 8)) como adjuvantes obtiveram ótimos resultados de EE do eugenol (99%), em sistemas contendo [C6mim]Cl; para o propil galato, a EE foi completa (100%) independentemente da presença ou não de LI, exceto quando aplicado o [C8mim]Cl.

Portanto, considerando todas as possibilidades de combinações de soluções poliméricas quimicamente distintas, ou combinações entre soluções poliméricas e soluções de sais orgânicos ou inorgânicos, bem como de líquidos iônicos, soluções de surfactantes ou outras espécies químicas que ao terem suas soluções misturadas formem sistemas bifásicos ; conclui-se que além do fato do SAB ser composto em sua maioria por água, seu grande leque de modulações em termos de polaridades faz com que essa técnica seja amplamente aplicável à partição de inúmeros analitos. Necessário se faz esclarecer que o conhecimento sobre os mecanismos que regem particionamento das espécies pelo SAB são ainda incipientes, necessitando-se assim de que muitos outros estudos sejam executados com a intenção ampliar

com maior riqueza de detalhes as forças motrizes que coordenam o particionamento dos analitos entre as fases desses sistemas.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Foram utilizados os seguintes reagentes para a realização dos experimentos de partição nos sistemas aquosos bifásicos. Sais Inorgânicos: Na_2SO_4 (99,0 % - Vetec), Li_2SO_4 (99,0 % - Dinâmica), $MgSO_4$ (99,0 % - Synth). Sais Orgânicos: $Na_2C_4H_4O_6$ (99,5 % - Vetec) e $Na_3C_6H_5O_7$ (99,0 % - Synth). Polímeros: Polietilenoglicol ($C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$) de massas molares 1500 e 4000 (Synth); além do copolímero tribloco L64 ((Polióxido de etileno - PEO)$_{13}$(Polióxido de propileno - PPO)$_{30}$(PEO)$_{13}$ – 2,900 g/mol) (Aldrich). Analitos: Ácido acetilsalicílico ($C_9H_8O_4$) e Ácido salicílico ($C_7H_6O_3$) (99,0 % - Isofar). Água deionizada (Mili-Q) e ácido sulfúrico (Dinâmica) (para a padronização dos valores de pH).

4.2 Metodologia

Todos os resultados obtidos neste trabalho foram processados por análise espectrofotométrica em um Espectrofotômetro/UV-Vis (Varian-Cary 50 Probe), utilizando-se duas microcubetas de quartzo (1,7 mL), sendo uma utilizada para as leituras de Absorbância (Abs) das fases superiores e a outra para as fases inferiores. As análises foram realizadas em modo varredura entre os Comprimentos de Onda (λ) 200 e 800 nm.

4.2.1 Curva analítica

A fim de verificar a relação entre os sinais de absorbância obtidos nas análises espectrofotométricas e a concentração do analito em cada fase, foram construídas curvas analíticas para o AAS nas fases superior e inferior do sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O em pH 6.

Para tanto, preparou-se inicialmente 17,00 g de uma solução estoque de PEO 1500 a 55% (m/m) e 36,00 g de uma solução estoque de Sulfato de Lítio a 21,25% (m/m) com o auxílio de uma balança analítica (SHIMADZU AUX 220). Na sequência, construiu-se os SAB's pela adição de 15.88 g da solução estoque de PEO mais 34.12 g da solução estoque de sal em um tubo do tipo Falcon. Após agitação e repouso (24 horas), as duas fases (FS e FI) foram separadas utilizando-se seringas de 10 mL e colocadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL.

Em um tubo pesou-se 0,0018 g de AAS completando a massa final com 1,5 g de FS anteriormente extraída. Após a solubilização do AAS diluiu-se a solução em 6 vezes, totalizando 9 g de solução com 200 mg Kg^{-1} de AAS. Em outro tubo pesou-se 0,0018 g de AAS completando a massa final com 7,5 de FI. Após a solubilização do AAS diluiu-se a solução em 1,2 vezes, totalizando 9 g de solução também com 200 mg Kg^{-1} de AAS. O que restou das FS e FI foram diluídas para 6 e 1,2 vezes, respectivamente, para serem utilizadas como solvente no processo de diluição.

Na sequência foram realizadas diluições a partir das soluções contendo 200 mg Kg^{-1} de AAS em tubos Falcon de 10 mL, obtendo-se as seguintes concentrações: 0, 10, 30, 50, 100, 150 e 200 mg Kg^{-1} de AAS. Por fim, leituras de absorbância nos λ de máxima absorção (270 ± 5 nm) foram realizadas em um espectrofotômetro utilizando-se microcubetas de quartzo.

4.2.2 Estudos de Partição

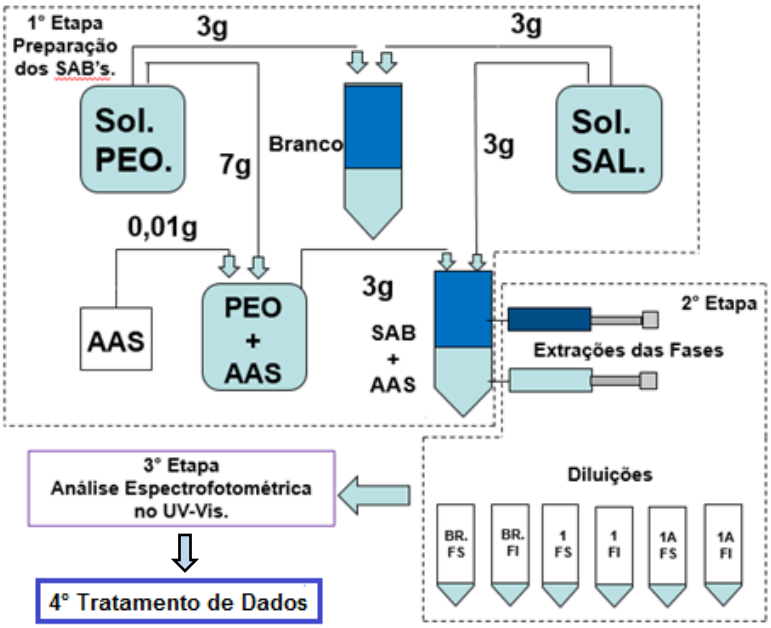
Na Tabela 2 estão dispostos todos os SAB's utilizados para os estudos de partição dos analitos no presente trabalho.

Tabela 2 - Composição dos SAB's nos estudos de partição do AAS e AS.

SAB	Composição (% m/m) Fase Superior Polímero	Fase Superior Sal	Fase Inferior Polímero	Fase Inferior Sal	CLA (% m/m)	Ref.
PEO1500 + $MgSO_4$	37.27	1.63	6.75	16.18	33.81	(MARTINS et al., 2008)
	42.80	1.16	6.29	17.79	40.12	
	45.72	0.81	5.84	18.82	43.76	
	47.95	0.56	5.34	21.04	47.28	
	52.24	0.38	4.83	22.70	52.4	
PEO 1500 + Na_2SO_4	32.36	2.84	2.47	15.63	32.51	
	34.51	2.16	2.12	17.77	35.96	
	37.94	1.95	1.86	19.45	40.10	
	43.41	1.46	1.03	21.71	46.97	
PEO 1500 + Li_2SO_4	34.44	5.30	6.85	15.54	29.43	
	39.18	4.15	6.60	16.85	34.97	
	44.40	3.25	5.91	19.32	41.71	
	48.38	2.58	5.68	20.63	46.36	
	53.26	2.15	5.60	22.12	51.67	
PEO 1500 + $Na_2C_4H_4O_6$	28.62	6.60	2.73	19.09	28.74	(PATRICIO et al., 2011)
	32.65	5.51	1.54	21.43	34.95	
	37.65	4.30	0.90	24.10	41.74	
	42.92	3.38	0.85	27.20	48.35	
	44.25	3.15	0.71	28.15	50.21	
PEO 1500 + $Na_3C_6H_5O_7$	25.17	6.35	1.84	18.78	26.43	
	32.31	4.39	0.46	22.29	36.54	
	37.06	3.02	0.18	24.88	42.87	
	42.24	2.13	0.01	28.28	49.67	
	45.63	1.70	0.01	30.29	53.84	
PEO 4000 + Li_2SO_4	35.96	3.52	2.63	14.69	35.15	(CARVALHO et al., 2007)
	41.02	2.78	2.70	16.67	40.76	
	45.48	2.25	3.24	18.22	45.16	
	50.42	1.79	4.35	19.22	49.26	
L64 + Li_2SO_4	23.40	5.07	2.09	7.95	21.5	(RODRIGUES et al., 2009)
	32.08	4.14	1.12	8.48	31.26	
	35.77	4.01	0.56	9.50	35.64	
	41.72	3.27	0.41	10.01	41.86	

A execução dos experimentos de partição dos analitos encontra-se esquematizado de forma sucinta na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da metodologia de execução dos experimentos com SAB's.



Fonte: Autor

A execução de todos os experimentos seguiu um roteiro de 4 etapas como representado na Figura 7. Na primeira, prepara-se as soluções de polímero e eletrólito nas concentrações indicadas para cada sistema (Tabela 2). Na sequência, em um béquer, solubiliza-se 0.0100 g (~ 0,14%) do analito em 7,00 g da solução de polímero anteriormente preparada. Por fim, os sistemas são construídos, sendo um tubo referente ao Branco (sistema sem adição de analito) composto de 3,00 g da solução pura de polímero e 3,00 g da solução de sal, e mais dois sistemas (tubos) em duplicata com a adição de 3,00 g da solução de polímero contendo o analito e 3,00 g da solução de sal. Após agitação manual por 1 minuto dos tubos, os mesmos foram deixados em banho termostatizado (MA 184 - Marconi) à 25 °C por 24 horas. Os tubos utilizados nessa etapa foram previamente preparados pela perfuração de um pequeno orifício na parte lateral próximo ao fundo dos mesmos, sendo esses furos vedados com cola de silicone. Essa metodologia teve como objetivo impedir que ao se extrair cada umas das fases ocorresse contaminação entre elas.

Na segunda etapa, recolhe-se as fases e transfere-se as mesmas para outros tubos, onde subsequentemente são diluídas. Quando o AAS é o analito, as fases superiores são diluídas em

6 vezes, por outro lado, quando o analito é o AS, as fases superiores são diluídas em 50 vezes, em ambos os casos, as fases inferiores são diluídas em 1,2 vezes.

Na terceira etapa realiza-se as leituras das Abs no espectrofotômetro, nos λ entre 270 ± 5 nm para o AAS e 295 ± 5 nm para o AS.

Com a obtenção dos sinais de absorbância, a quarta etapa se dá com análise e tratamento dos dados realizando sobre os mesmos os cálculos de *K* através da equação 2:

$$K = \frac{[analito]^{FS}}{[analito]^{FI}} \qquad (2)$$

4.3 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição do AAS.

4.3.1 Efeito da variação do cátion formador do SAB

Os estudos de variação dos cátions formadores dos sistemas foram realizados utilizando-se alguns sais de sulfato, a saber: $MgSO_4$, Na_2SO_4 e Li_2SO_4. Os sistemas foram formados seguindo-se os procedimentos expressos pela Figura 7. Para esses estudos foram utilizados, o PEO 1500 como polímero formador do sistema e o AAS como analito de partição, estando a água utilizada como solvente no preparo do SAB em pH = 6,0. Para o sistema formado por PEO 1500 + Na_2SO_4 + H_2O foram possíveis o estudo em apenas 4 valores de CLA, isso porque, no quinto valor de CLA estabelecido pela Tabela 2, a solubilidade do sal se mostrou incompleta para que o sistema fosse formado.

4.3.2 Efeito da variação do ânion formador do SAB

Nos estudos de variação dos ânions formadores dos sistemas foram testadas as influências dos ânions dos sais orgânicos citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) e tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$), e acrescentou-se a esses estudos o resultado obtido para sal inorgânico Na_2SO_4. Os experimentos foram executados seguindo-se os procedimentos expressos pela Figura 7. O PEO 1500 também foi utilizado como polímero formador do sistema e o AAS como analito de partição, estando a água em pH 6.

4.3.3 Efeito da variação do polímero formador do SAB

Nos estudos de variação dos polímeros formadores dos SAB's foram observadas as relações entre as massas molares dos polímeros PEO 1500 e PEO 4000, ou seja, nesse caso manteve-se a mesma natureza química das espécies poliméricas no meio, observando a influência da variação da massa molar. Em uma expansão do estudo, foi verificada a variação no comportamento de partição do AAS quando a natureza química do polímero foi alterada, nesse caso, adicionando-se um sistema formado pelo copolímero tribloco L64. Todos os sistemas foram preparados utilizando-se os procedimentos da Figura 7. O Li_2SO_4 foi utilizado como o sal formador do sistema, sendo que a água utilizada como solvente na execução dos experimentos foi padronizada para o pH 6,0. Outro fator a ser considerado nesses experimentos foi o fato de que para os sistemas formados pelos polímeros PEO 4000 e L64 não foi possível obter os 5 valores de CLA, isso porque, no quinto valor de CLA estabelecido pela Tabela 2, as soluções dessas macromoléculas não se solubilizaram por completo.

4.3.4 Efeito da variação do pH do SAB

O efeito do pH da água utilizada como solvente para o preparo das soluções foi realizado considerando os valores de pKa do AAS e do AS, a saber, pka = 3.5 e 3,0, respectivamente. O sistema padrão para esse estudo foi o composto de PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O nos diferentes valores de pH 1,0; 3,5; e 6,0; seguindo-se os procedimentos da Figura 7 para a construção dos mesmos. Oportuno se faz esclarecer, a respeito desses estudos, é que as considerações acerca das variações nos valores de K dos analitos devido as alterações nos valores de pH são baseadas apenas no valor de pH da água padronizada utilizada na construção dos sistemas.

4.4 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição do AS por Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR

Os estudos univariados tiveram como objetivo elucidar e ampliar a compreensão de como o coeficiente de partição do AAS é alterado seguindo as variações nas características dos sistemas. Enquanto isso, o estudo multivariado teve como objetivo observar se houve e o quão relevante foram as relações de interação entre as variáveis independentes do SAB na partição do AS e, assim, encontrar e validar um sistema ótimo, tendo o coeficiente de partição como

resposta das análises. Para tanto, foi empregado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como ferramenta estatística de análise multivariada.

O DCCR foi executado através do programa Statistica 12®, em um procedimento com 3 variáveis independentes, sendo essas, a concentração de Li_2SO_4 (v1), a concentração de PEO 1500 (v2) e o pH (v3) da água utilizada na construção dos sistemas. O estudo envolveu 8 tratamentos nos pontos fatoriais, 6 nos axiais e 4 nos pontos centrais. Cada variável independente foi estudada em 5 níveis (-1,68; -1; 0; 1; 1,68), cujo valores codificados e reais encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR.

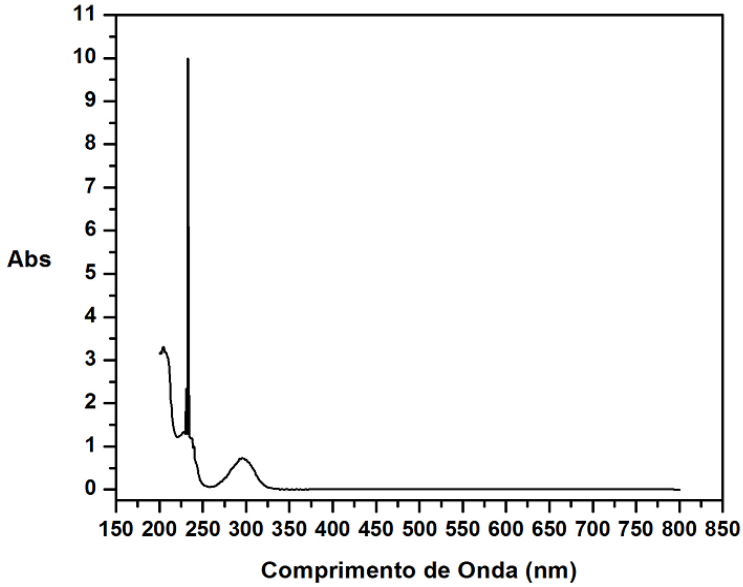
Níveis	**[ ] Sal (% m/m) (v1)**	**[ ] PEO (% m/m) (v2)**	**pH (v3)**
-1,68	10,42	20,65	0,5
-1	10,77	22,43	1,71
0	11,28	25,04	3,5
1	11,79	27,65	5,28
1,68	12,14	29,43	6,5

Para uma melhor interpretação do DCCR, foi aplicada a função de Desejabilidade, que tem como objetivo determinar as melhores condições de ajuste de processo, tornando possível a otimização simultânea de múltiplas respostas. Com isso, as melhores condições das respostas foram obtidas simultaneamente, minimizando-se, maximizando-se ou buscando-se valores nominais de especificações, dependendo da situação mais conveniente para o método (PIMENTA et al., 2014). Assim, através da aplicação da função de Desejabilidade, buscou-se estabelecer quais os valores que maximizariam as variáveis independentes do SAB para máxima partição do AS.

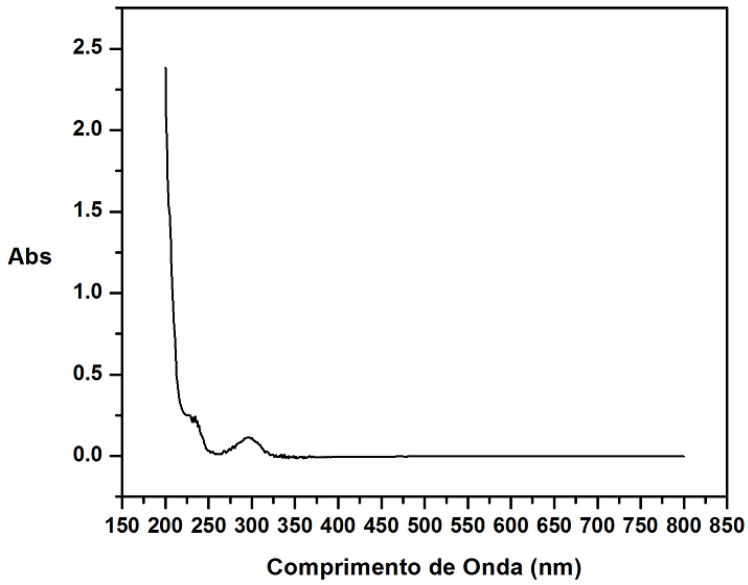
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para adquirir os dados a partir das medidas espectroscópicas, foram analisadas as absorbâncias nos comprimentos de onda de máxima absorção dos analitos AAS e AS para cada sistema, considerando as variações existentes entre cada SAB com diferentes polímeros, eletrólitos e os valores de pH formadores dos mesmos, bem como as diferentes composições das fases. Espectros dos analitos podem ser observados nas Figuras 8 (a e b) e 9 (a e b).

Figura 8 – Espectro eletromagnético de absorção molecular do (a) AS na FS e do (b) AS na FI.

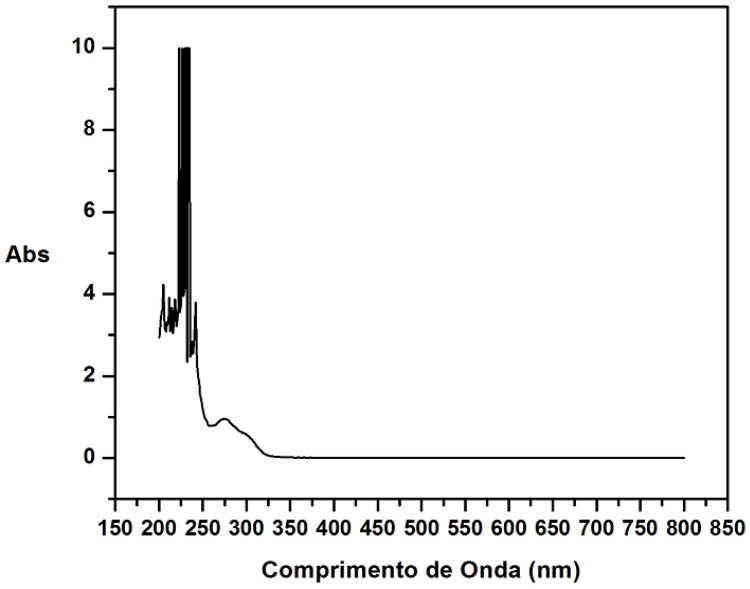


(a)

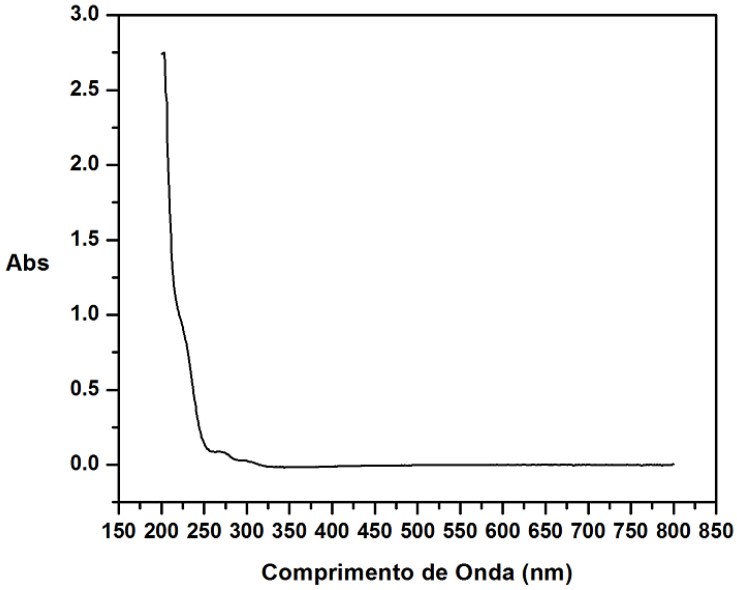


(b)

Figura 9 - (a) Espectro eletromagnético de absorção molecular do (a) ASS na FS e do (b) ASS na FI.



(a)



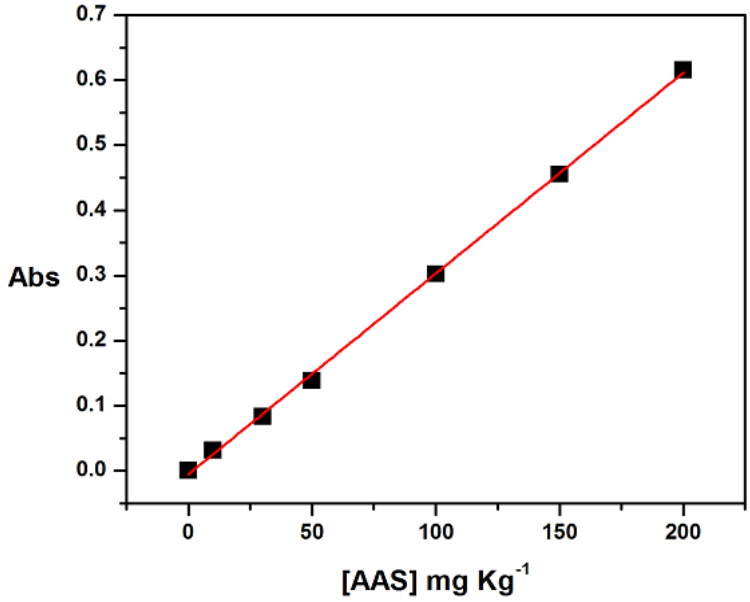
(b)

Nas Figura 8 (a e b) e Figura 9 (a e b) encontram-se os espectros de absorção molecular do AS e do AAS em SAB's compostos de PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O em pH 6,0 com 0,0100 g de analito adicionado em cada sistema. Os sinais analíticos de Abs estão em função do λ, nestas condições o λ de máxima absorção do AS encontra-se entorno de 295 nm e o do AAS entorno de 270 nm. Nota-se pela comparação dos mesmos que a diferença nas composições das fases não causaram um deslocamento significativo nos valores de λ de máxima absorção.

5.1 Curva analítica

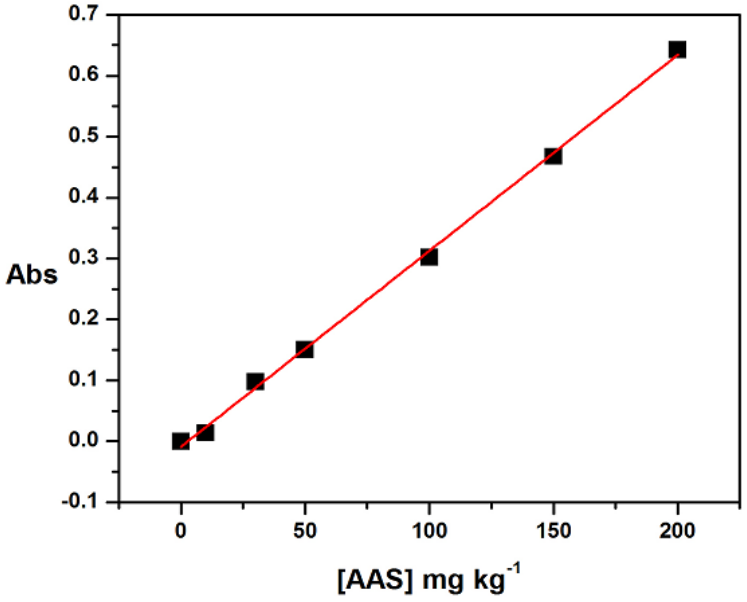
A fim de demonstrar uma relação linear entre os valores obtidos de absorbância e a concentração do analito, foram construídas duas curvas analíticas, uma para cada fase do sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O em pH 6,0. As curvas foram obtidas através da leitura de 7 pontos (0, 10, 30, 50, 100, 150 e 200 mg Kg^{-1} de AAS) no UV-Vis. As curvas analíticas com os pontos experimentais e o ajuste do modelo linear estão representadas nas Figuras (10) e (11).

Figura 10 - Curva analítica do AAS na fase superior do Sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O.



A curva analítica obtida para o AAS na fase superior (Figura 10) do sistema apresentou uma equação da reta na forma y = -0.0052 + 0.0031 x, com um coeficiente de regressão linear R^2 = 0.99923. Assim, pode-se inferir que o valor encontrado de R^2 próximo da unidade relaciona de maneira linear os valores entre a concentração do AAS e os sinais de absorbância.

Figura 11 - Curva analítica do AAS na fase inferior do Sistema PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O.



Já a curva analítica obtida para o AAS na fase inferior (Figura 11) do sistema apresentou uma equação da reta igual a y = -0.0087 + 0.0032 x, com um R^2 = 0.99836, podendo-se afirmar através do valor obtido de R^2 que também há uma relação linear entre a concentração do AAS na fase inferior e o sinal de absorbância.

Outro aspecto importante que pode ser observado através das equações encontradas para as FS e FI é o fato de seus coeficientes angulares serem aproximadamente iguais, com valores de 0.0031 (±0.0036) e 0.0032 (± 0.0056) para as FS e FI, respectivamente. Este fato indica que a relação entre a concentração do analito e o sinal de absorbância na equação de Lambert-Beer (Abs = ε.b.C) serão igualmente respeitados em ambas as fases do sistema. Assim, como consequência, pode-se inferir que o coeficiente de partição seguirá também essa relação direta entre concentração e absorbância entre as fases do sistema. Logo, as concentrações dos analitos em cada uma das fases do sistema podem ser aproximadas pelos valores de Abs obtidos nas análises espectrofotométricas. Assim, a equação 2 rearranjada para os sinais de Abs das FS e FI resulta na equação 8:

$$K = \frac{(Abs)^{FS}}{(Abs)^{FI}} \qquad (8)$$

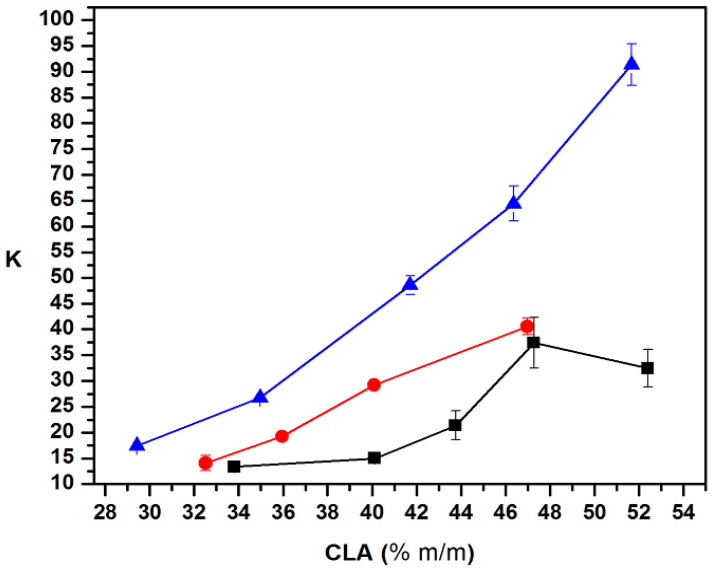
5.2 Estudos de Partição

Os estudos de partição foram realizados com o intuito de se compreender o comportamento de partição do AAS entre as fases dos diferentes sistemas analisados. Quanto ao AS, os estudos de partição tiveram como objetivos determinar como a alteração simultânea das variáveis independentes do sistema alteram os valores de K do analito, bem como encontrar por consequência dessas observações, a combinação de SAB que irá gerar valores máximos de K para o AS. Assim, buscou-se analisar como a alteração de algumas variáveis, sendo essas: o cátion e ânion utilizado na formação dos SAB's; PEO's de diferentes massas molares; polímeros de diferentes naturezas químicas; diferentes valores de pH e CLA; influenciam no processo de partição dos analitos nos SAB's estudados.

5.2.1 Efeito da variação do cátion formador do SAB

Inicialmente, objetivou-se compreender a influência da variação dos cátions formadores do sistema no coeficiente de partição do AAS. Assim, na Figura 12 encontram-se os resultados de K para os experimentos em que SAB's compostos de PEO 1500 em pH 6,0 tiveram variados os seus sais constituintes, sendo utilizados os sulfatos de magnésio, sódio e lítio como eletrólitos formadores dos sistemas. Os coeficientes de partição encontrados estão em função dos valores de CLA determinados pelos respectivos trabalhos referenciados na Tabela 2.

Figura 12 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 em pH 6,0 com diferentes sais de sulfato. (-Δ- Li_2SO_4 ; -●- Na_2SO_4 ; -■- $MgSO_4$).



Os resultados expressos pela Figura 12 revelam que nas condições dos sistemas supracitados, os coeficientes de partição do AAS em cada SAB seguiu uma ordem crescente com o aumento nos valores de CLA, o que revela uma afinidade do AAS pela fase superior desses sistemas. O aumento no valor de CLA significa aumentar as distinções entre as fases devido ao aumento e redução de PEO e SAL na FS, respectivamente; ocorrendo o inverso na FI (aumento da concentração de SAL e redução na concentração de PEO). Assim, com o aumento nas distinções das fases aumenta-se a partição do analito para a fase com a qual tenha maior afinidade.

O sistema composto por $MgSO_4$ apresentou valores de k entre 13.3 (± 0.0318) e 32.5 (± 3.7), enquanto o sistema com Na_2SO_4 apresentou os valores de K entre 14.1 (± 1.5) e 40.6 (± 1.6), salientando que para esse sistema foram possíveis a execução de apenas 4 valores de CLA devido a solubilidade incompleta da solução do referido sal. Por fim, o sistema composto de Li_2SO_4 resultou em valores de K entre 17.4 (± 0.1) e 91.4 (± 4.1). Os maiores valores de K encontrados para o sistema composto de PEO 1500 com o Li_2SO_4 mostram que este eletrólito apresenta maior eficiência na partição do analito estudado.

Estes resultados podem ser explicados levando-se em consideração os estudos propostos por Da Silva e Loh (2000), onde os mesmos concluíram que entre sistemas formados por Li_2SO_4 /Na_2SO_4 com PEO (3350 g mol^{-1}) possuem ambientes químicos diferentes devido a diferença de tamanho entre os íons Na^+ e Li^+ bem como das suas intensidades de interação com as macromoléculas. Segundo esses autores, os sais de sódio interagem mais fortemente com o PEO do que os sais de lítio e esse fato foi confirmado pelos valores positivos das entalpias de transferência para o Li_2SO_4 indicando que qualquer interação entre os eletrólitos e as macromoléculas ocorrem seguidos por um aumento na entropia devido à liberação de moléculas de água que estavam solvatando os cátions e os polímeros. Esta interação entre os cátions e as macromoléculas seguem à medida que mais eletrólitos são adicionados, até um ponto de saturação, após o qual não há mais ganho de entropia e a separação de fase se torna mais favorável. Entretanto, é importante ressaltar que essa saturação não significa saturação física dos sítios de ligação ao redor o polímero, mas que uma quantidade significativa de eletrólito é deixada em solução, sem interagir com o polímero, desestabilizando o sistema e, portanto, levando à separação de fases. Assim, considerando o AAS e sua característica tanto apolar (anel aromático) quanto polar (grupos éster e ácido carboxílico), o mesmo tenderá a particionar com uma intensidade maior para a fase superior desse sistema por esse apresentar uma fase com características anfifílicas mais acentuadas e por conferir ao meio maiores possibilidades de interação e acomodação para o analito.

Ainda buscando a compreensão teórica dos dados obtidos experimentalmente, podemos analisar o presente conjunto de dados pelo trabalho de Haynes e colaboradores. O modelo de Haynes et al. (1998), abstraído da teoria de Flory-Huggins, ampliaram a compreensão das forças que regem o particionamento de um dado analito entre as fases de um SAB. Tais forças são compostas de um fator de natureza entálpica e outra entrópica. Assim, quando as forças de natureza entálpica são nulas ou menos efetivas do que as de natureza entrópica, o coeficiente de partição do analito pelo SAB é determinado pela variação da entropia associada ao processo de transferência do analito (equação 5).

$$\ln K_a = \frac{M_a}{\rho}\left(\frac{n^{FS}}{V^{FS}} - \frac{n^{FI}}{V^{FI}}\right) \qquad (5)$$

Isso significa que o K do referido analito será diferente de 1 apenas se o número de moléculas por unidade de volume (n/V) for diferente nas duas fases. Além do mais, a equação 5 revela que o analito particionará para a fase cuja densidade numérica de moléculas for maior, pois nesta fase haverá um maior número de formas de distribuir as moléculas espacialmente, aumentando assim, a contribuição da entropia configuracional para a minimização do parâmetro termodinâmico $\Delta_{mis}G$ (DA COSTA, 2010). Em SAB's formados pela mistura de polímero/eletrólito (sendo a fase superior rica em polímero e a inferior rica em sal), onde forças motrizes de natureza entrópica atuam de maneira efetiva no processo de partição, o analito particionará preferencialmente para a fase rica em sal, visto ser esta a que contém maior densidade numérica (DA SILVA; LOH, 2006). Portanto, nos casos em que os K's obtidos experimentalmente forem menores do que 1 espera-se que as forças que estejam dominando na partição do analito são de natureza entrópica.

Por outro lado, quando as forças de natureza entrópica são nulas ou menos efetivas do que as de natureza entálpica, o coeficiente de partição é regido pelas interações entálpicas que ocorrem dentro do sistema (equação 6).

$$\ln K_a = -\frac{M_a}{RT}\left[\sum_{i=1(i\neq j)}^{m}\left(\phi_i^{FS} - \phi_i^{FI}\right)W_{ia} - \sum_{i=1(i\neq j)}^{m-1}\sum_{j=i+1(j\neq i)}^{m}\left(\phi_i^{FS}\,\phi_j^{FS} - \phi_i^{FI}\,\phi_j^{FI}\right)W_{ij}\right] \qquad (6)$$

Como anteriormente definido, o primeiro termo da equação 6 expressa a tendência que o analito tem de se transferir para a fase onde haja maior concentração do componente com o qual interaja preferencialmente, isto é, tenha o valor de W_{ia} mais negativo (ou menos positivo). Já o segundo termo da equação representa a diferença de conteúdo entálpico de cada fase, resultante das interações entre todos os componentes que formam cada uma dessas regiões, ou seja, a variação da energia associada à transferência do analito da fase inferior para a superior. Este termo energético só depende da interação que ocorre entre os componentes formadores das fases, não levando em consideração a interação devida ao analito. A dependência que o K possui em relação à diferença entre a energia total das fases superior e inferior surge do fato de que, durante a transferência do analito entre essas fases há necessariamente a quebra e formação de novas interações. Assim, a inserção do analito na fase superior implica no rompimento de interações entre polímero, sal e água para que ocorra a formação de uma cavidade capaz de alojar o mesmo, além do mais, a saída do analito da fase inferior possibilitará a formação de novas interações entre os componentes, polímero, sal e água, que se concentram na fase inferior (DA SILVA; LOH, 2000). A análise do segundo termo da equação prevê que o analito particionará para a fase que se encontra num estado termodinâmico de maior energia, isto é, para a fase que gastará menos energia para a formação da cavidade (DA COSTA, 2010).

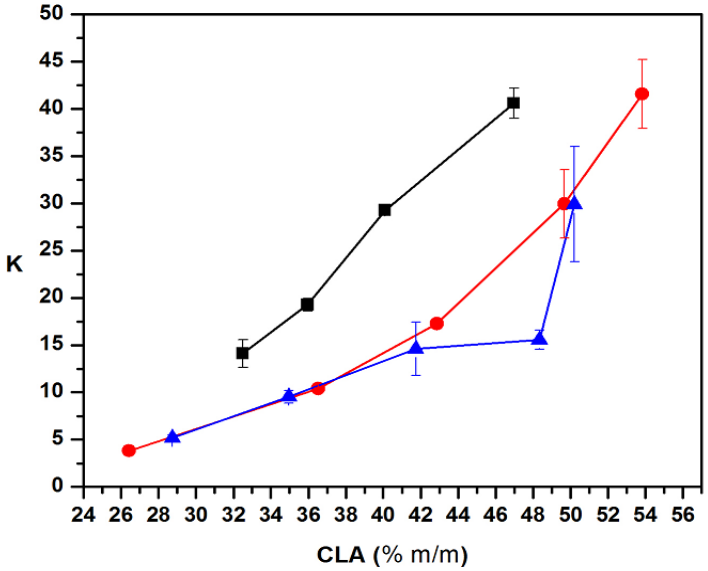
Em sistemas formados por PEO + sal, tem-se que a fase rica em polímero tem o maior conteúdo energético, visto que na fase rica em sal as interações do tipo íon-dipolo tornam menor sua energia. Assim, se o comportamento de partição de um determinado analito for governado por forças de natureza entálpica, o mesmo tende a se concentrar na fase polimérica (FRANCISCO, 2006). Portanto, quando os K's obtidos experimentalmente resultarem em valores acima da unidade, pode-se inferir que as forças efetivas atuantes na partição do analito no SAB são de natureza entálpica. Logo, pode-se inferir que nos sistemas estudados com referência à variação dos cátions formadores dos SAB's, as forças motrizes que direcionam a partição do AAS nesses sistemas são preponderantemente de natureza entálpica, pois os valores de K obtidos estão muito acima de 1.

5.2.2 Efeito da variação do ânion formador do SAB

Na sequência dos estudos, verificou-se a influência dos ânions formadores do SAB no comportamento dos valores de K para o AAS. Assim, na Figura 14 encontram-se os resultados dos experimentos com SAB's compostos de PEO 1500 em pH 6, utilizando-se os sais orgânicos

citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) e tartarato de sódio ($Na_2C_4H_4O_6$) como eletrólitos formadores dos sistemas, acrescido do estudo utilizando sulfato de sódio (sal inorgânico).

Figura 13 - Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 em pH 6,0 com diferentes sais de sódio. (-Δ- $Na_2C_4H_4O_6$; -●- $Na_3C_6H_5O_7$; -■- Na_2SO_4).

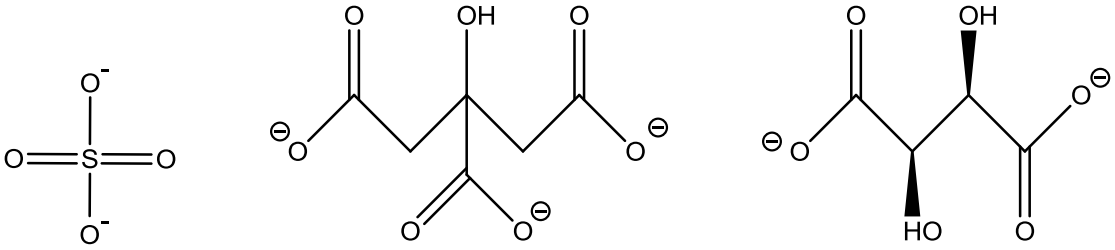


Os resultados expressos pela Figura 14 revelam que os coeficientes de partição do AAS em cada sistema seguiu também uma ordem crescente nos valores K em função do aumento nos valores de CLA. O sistema composto pelo sal orgânico $Na_3C_6H_5O_7$ apresentou valores de K entre 3.83 (± 0.30) e 41.5 (± 3.6), o SAB composto pelo $Na_2C_4H_4O_6$ apresentou valores de K entre 5.16 (± 0.32) e 29.9 (± 6.1), e valendo-se dos resultados anteriores, o sistema composto pelo Na_2SO_4 apresentou os valores de K entre 14.1 (± 1.5) e 40.6 (± 1.6). Os resultados revelam que houve uma maior partição do AAS no sistema formado por sulfato em comparação aos sistemas com ânions orgânicos.

Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que entre os 3 sais, o sulfato de sódio é o de caráter mais polar. Essa implicação pode ser reforçada ao analisar o coeficiente de partição entre os dois sais orgânicos, onde os valores de K são maiores para o citrato de sódio, pois o mesmo, apesar de ter uma cadeia carbônica maior, possui mais centros nucleofílicos além de um maior impedimento estérico entre as cadeias carbônicas, o que resulta em um maior espalhamento de centros carregados no meio deixando-o menos apolar quando comparado ao tartarato de sódio. O maior caráter apolar do tartarato de sódio comparado aos demais sais confere à fase inferior um aspecto apolar que compete com o da fase superior o que resulta em menores valores de K, pois a fase inferior torna-se um pouco mais atrativa para o AAS. Em termos termodinâmicos, as forças de natureza entrópica obtêm maior efetividade quando as

espécies formadoras das duas fases guardam maiores semelhanças, o que ocorre em SAB's formados por polímero e sais orgânicos com ânions com maiores características apolares. Na Figura 15 encontram-se as estruturas dos ânions utilizados neste estudo.

Figura 14 – Estruturas dos ânions dos sais de sódio: (a) sulfato; (b) citrato; (c) tartarato.



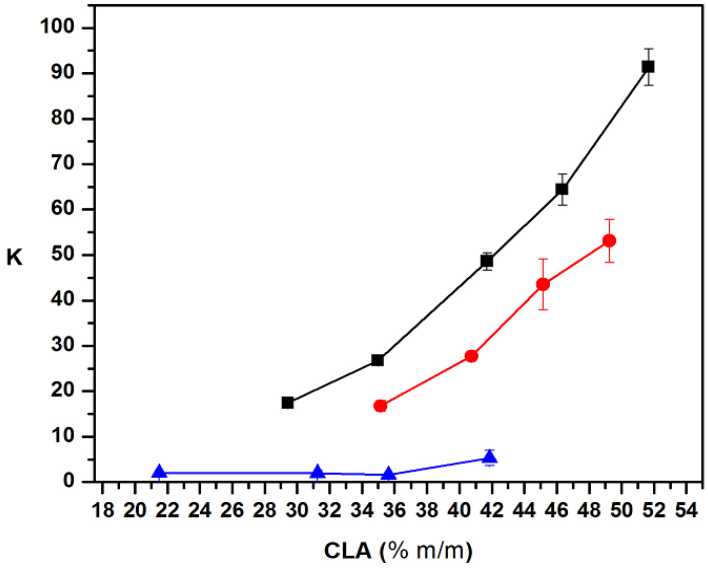
(a) (b) (c)

Verificada as tendências no comportamento de partição do AAS com as variações dos sais inorgânicos e orgânicos, bem como a diferença dentro da mesma classe desses compostos, estabeleceu-se o sulfato de lítio como o sal de melhor eficiência e referência para os experimentos seguintes.

5.2.3 Efeito da variação do polímero formador do SAB

O próximo ciclo de experimentos teve como foco observar as prováveis diferenças causadas nos valores de K do AAS com a variação dos polímeros constituintes dos sistemas, realizando uma comparação tanto em termos de variação das massas molares (PEO 1500 x PEO 4000) quanto da natureza química dos polímeros (PEO x L64). Assim, na Figura 16 encontram-se os resultados para os sistemas constituídos de sulfato de lítio e diferentes macromoléculas, em pH 6,0.

Figura 15 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por Li_2SO_4 em pH 6,0 com diferentes polímeros. (-Δ- L64; -●- PEO 4000 ; -■- PEO 1500).



Os resultados expressos na Figura 16 revelam que os sistemas compostos por PEO 1500 apresentaram valores de K entre 17.4 (± 0.1) e 91.4 (± 4.1), e os constituídos por PEO 4000 apresentaram valores de K entre 16.8 (± 1.2) e 53.1 (± 4.8). Já os sistemas formados por L64 apresentaram valores de K entre 2.03 (± 0.41) e 5.30 (1.62).

O aumento da massa molar de um polímero relega ao meio um maior efeito hidrofóbico, assim, seguindo o aumento da massa molar dos polímeros PEO 1500 < PEO 4000 pode-se inferir que o aumento no coeficiente de partição do analito se deu por relação inversa ao aumento da massa molar. Portanto, quanto maior a massa molar do polímero menor o coeficiente de partição do AAS. Esse comportamento está de acordo com o efeito do volume de exclusão devido à diminuição do volume livre disponível e a redução da solubilidade do analito na fase superior, rica em polímero (DA COSTA, 2010). O volume livre de uma solução é o volume que não está ocupado pelas moléculas, mas que lhes é acessível através do seu movimento (CUNHA, 2008). Em uma análise comparativa, os resultados sugerem que o coeficiente de partição está sob o efeito de uma hidrofobicidade relativa, pois em todos os sistemas até então analisados neste trabalho concluía-se que o AAS particionava preferencialmente para a fase mais hidrofóbica (fase superior) do sistema, porém percebe-se através dos resultados que há um limite no aumento de hidrofobicidade da fase que favoreça o particionamento do AAS para essa fase. A redução do K do sistema PEO 1500 para o PEO 4000 se dá pelo aumento do efeito hidrofóbico na fase superior, além do mais, o AAS apresenta um considerável grau de polaridade em suas moléculas devido aos grupos funcionais ácido

carboxílico e éster. Sendo assim, o aumento da hidrofobicidade da fase superior induzirá o analito para a fase inferior mais polar.

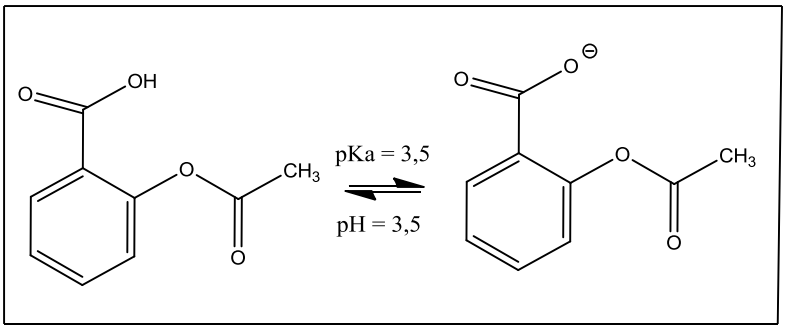
Em comparação ao sistema contendo L64, segue-se as mesmas concepções anteriormente elucidadas para o PEO 4000, com a diferença que, mesmo o L64 tendo massa molar menor do que o PEO 4000, o copolímero tribloco possui uma estrutura tridimensional ainda mais enovelada pela presença dos grupos polipropilenos nos centros das cadeias, o que confere ao polímero um alto grau hidrofóbico, o qual reduz o efeito das forças entálpicas que até então se mostravam preponderantes no particionamento do AAS, o que pode ser verificado pelos valores de K próximos de 1, nos sistemas compostos pelo L64.

Estabelecido o sistema composto de PEO 1500 e Li_2SO_4 como o melhor sistema para a partição de AAS, o próximo passo experimental foi verificar a influência do pH no coeficiente de partição do analito.

5.2.4 Efeito da variação do pH do SAB

Sabendo que o AAS tem um pKa de 3,5, foram estudados 3 valores de pH para o SAB, a saber: 1,0; 3,5; 6,0. Quando o sistema está com o pH igual ao pKa da espécie de interesse, 50% das moléculas do analito estarão na forma molecular e os outros 50% estarão na forma ionizada. Assim, como o ASS é um ácido, em pH's abaixo do seu valor de pKa as moléculas estarão em maior quantidade na sua forma molecular, ao passo que ao se igualar o pH do meio ao valor de pKa ambas as formas coexistirão em proporções iguais, e à medida que se segue aumentando o valor do pH mais moléculas se encontrarão na forma ionizada. A Figura 17 demonstra a relação da variação do pH do meio com a protonação e desprotonação do AAS.

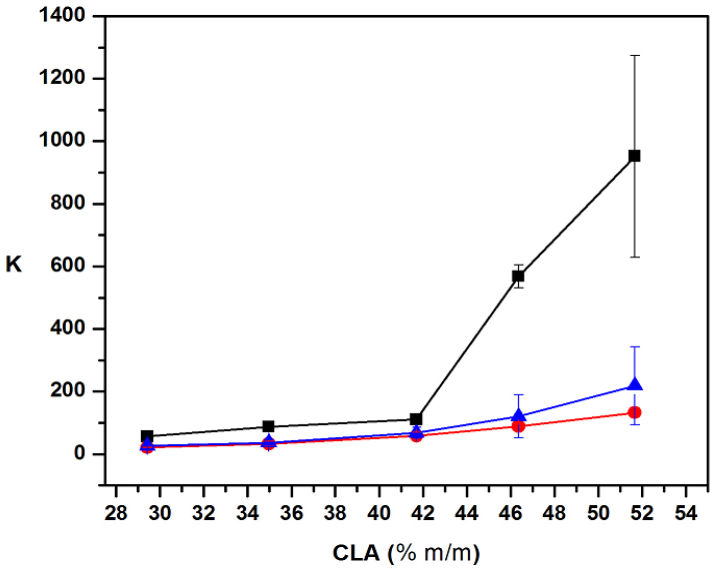
Figura 16 - Equilíbrio das formas molecular e ionizada do AAS quando o pH = pKa.



Fonte: Autor

Na Figura 18 encontram-se os resultados para os experimentos com SAB's compostos de PEO 1500 e Li_2SO_4 em diferentes valores de pH. Os valores de pH declarados para esses sistemas tiveram como base apenas a padronização da água de preparação dos mesmos, pois a medida dos valores de pH em ambas as fases apresenta dificuldades instrumentais que conduziriam a erros consideráveis, uma vez que a FS apresenta alta viscosidade e a FI possui força iônica muito intensa, causando grandes desvios quanto à calibração usual aplicada aos pH-metros.

Figura 17 – Comportamento de partição do AAS em SAB's formados por PEO 1500 e Li_2SO_4 com água em diferentes valores de pH. (-Δ- pH 6,0; -●- pH 3,5 ; -■- pH 1,0).



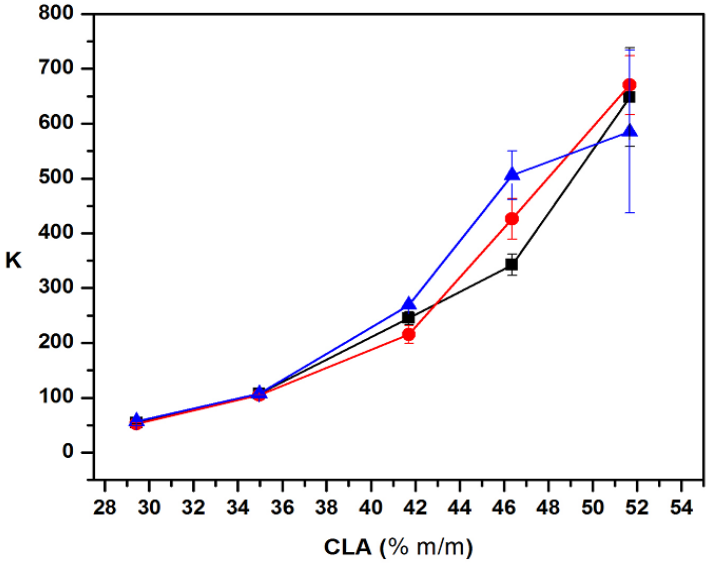
Os resultados expressos pela Figura 18 revelam que para os sistemas em que a água estava em pH 1,0, os valores de K do AAS ficaram entre 56.4 (± 3.5) e 952 (± 323); para os sistemas em que a água de composição estava em pH 3,5, os valores de K ficaram entre 21.7 (± 2.1) e 133 (± 3.5); já os sistemas em que a água de composição estava em pH 6,0, os valores de K permaneceram entre 27.3 (± 2.5) e 219 (±124.79).

Os maiores valores de K apresentados pelos sistemas em que a água estava em pH 1,0 revelam que o pH final do sistema estava, provavelmente, abaixo do valor do pKa do AAS. Assim, pode-se inferir que a maioria das moléculas de AAS estão na forma molecular e, portanto, conferem para si um caráter mais apolar, seguindo com maior intensidade para a fase superior do sistema. Para os outros valores de pH percebe-se que a variação entre os valores 3,5 e 6,0, pouco interferiram na alteração do coeficiente de partição. Isso provavelmente se deve ao fato de que nessas condições as fases ficaram com valor de pH acima do pKa do AAS. Neste contexto, a maior parte das moléculas de AAS estão em sua forma ionizada, e

consequentemente, a fase inferior passa a ser mais atrativa ao analito, pois a mesma possui alta concentração eletrolítica.

Para efeito de comparação entre o AAS e seu principal metabólito, o AS; foram realizados os mesmos experimentos com variação de pH tendo o AS como analito a ser particionado. Assim, na Figura 19 encontram-se os resultados da partição do AS em SAB composto de PEO 1500 com Li_2SO_4 em diferentes valores de pH.

Figura 18 - Comportamento de partição do AS em SAB's formados por PEO 1500 e Li_2SO_4 com água em diferentes valores de pH. (-Δ- pH 6,0; -●- pH 3,5 ; -■- pH 1,0).



Os resultados expressos pela Figura 19 revelam que para os sistemas em que a água estava em pH 1, os valores de K ficaram entre 54.5 (± 2.1) e 648 (± 90.2); para os sistemas com água de composição em pH 3,5, os valores de K permaneceram entre 52.7 (± 2.0) e 670 (± 53.8); já os sistemas em que a água estava em pH 6,0, os valores de K foram de 57.3 (± 0.3) à 585 (± 148). De modo geral, os valores do comportamento de partição do AS não se altera, independentemente do pH do meio. Nesse caso, pode-se relacionar este comportamento a duas possíveis situações. A primeira, é o fato do pH final das fases do sistema com água de composição em pH 1,0 ter ficado acima do valor de pH = 3,0, induzindo a maior parte das moléculas de AS (pKa = 3,0) à sua forma ionizada e assim, o comportamento de partição do AS nas três condições permaneceram praticamente iguais.

Uma segunda situação, menos provável a princípio, é que a ionização do AS não influencia seu comportamento de partição, já que ele possui características mais hidrofóbicas do que o AAS e particiona para a FS com mais intensidade (maiores valores de K). Portanto, o efeito de protonação não proporciona um incremento considerável nas interações desta com a

FS. Assim, pode-se inferir que a variação dos valores de pH nos sistemas compostos por PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O para partição do AS não apresentaram influência significativa nos valores de K obtidos.

5.3 Efeito da variação dos parâmetros termodinâmicos no comportamento de partição do AS por Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR.

Com o estabelecimento do sistema composto de PEO 1500 + Li_2SO_4 + H_2O como o mais eficiente na partição do AAS, utilizou-se o mesmo como sistema padrão para a partição do AS, a fim de que um processo amplo de otimização pudesse ser aplicado sobre esse sistema. Seguindo as condições de sistema determinados pelo DCCR e expressos na Tabela 3 que relaciona os valores reais e codificados das variáveis concentração de Li_2SO_4 (X_1), concentração de PEO 1500 (X_2) e valores de pH da água de formação dos sistemas (X_3), foram executados 18 experimentos, encontrando-se para cada condição de SAB analisado os respectivos valores de K do AS (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de K do AS obtidos pelo DCCR, sendo X_1 ([ ] Li_2SO_4), X_2 ([ ] PEO) e X_3 (pH).

SAB	X_1	X_2	X_3	K
1	- 1	-1	-1	142
2	1	-1	-1	229
3	- 1	1	-1	393
4	1	1	-1	646
5	- 1	-1	1	131
6	1	-1	1	226
7	- 1	1	1	335
8	1	1	1	860
9	-1,68	0	0	165
10	1,68	0	0	457
11	0	-1,68	0	110
12	0	1,68	0	565
13	0	0	-1,68	95,0
14	0	0	1,68	294
15	0	0	0	290
16	0	0	0	300
17	0	0	0	255
18	0	0	0	298

Os valores encontrados de K do AS revelam que os mesmos ficaram entre 95,0 (Ponto 13) e 860 (Ponto 8), reafirmando que assim como o AAS, o AS está sob o efeito de forças entálpicas que o conduzem preferencialmente para a fase superior. O maior valor encontrado de K (860) corresponde ao sistema composto de 27,65% de PEO 1500, 11,79 % de Li_2SO_4 em pH 5,28. Enquanto isso, o menor valor de K (94,80) corresponde ao sistema composto de 25,04 % de PEO 1500, 11,28 % de Li_2SO_4 em pH 0,5. Esses resultados revelam que a concentração de polímero e sal estão intimamente relacionadas e que o aumento (Pontos 4 e 8) ou redução (Pontos 1 e 5) proporcional de ambas variáveis simultaneamente causam efeitos maiores nos valores de K do AS do que quando apenas uma delas é alterada. Esses resultados estão em acordo com o que se definiu anteriormente para CLA. Assim, percebe-se no SAB formado no Experimento 8 que, ao aumentar as duas variáveis de maneira proporcional aos valores de CLA estabelecidos pela Tabela 2, o K encontrado apresentou maior valor do que quando apenas uma das variáveis assumiram valores mais acentuados como nos SAB's 10 e 12.

Outra consideração a ser feita, é com base nos pontos 2, 3, 6 e 7. Esses pontos indicam que as alterações de pH (-1 = 1.71 e 1 = 5.28) realizadas nestes sistemas não surtiram efeito significativo aparente sobre os valores de K do AS, uma vez que os pontos 2 e 6 apresentam as mesmas concentrações de polímero e sal, os valores de K observados foram de 229 e 226 respectivamente. Já os pontos 3 e 7, também com as mesmas relações de polímero e sal, resultaram nos valores de K de 393 e 335, respectivamente.

Após a análise dos dados da Tabela 4, os coeficientes de regressão para os valores de K do AS foram obtidos e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise estatística dos coeficientes de regressão para os K's do AS nos SAB's.

	Coef. Regre.*	Erro Padrão	t (8)	p	-95,%	+95,%
Média/Interc.	282	41,1	6,80	0,000131	186,82	376,40
(1)SAL (% m/m) (L)	**106**	**22,3**	**4,77**	**0,001414**	**54,82**	**157,58**
SAL (%m/m) (Q)	28,3	23,2	1,22	0,256440	-25,10	81,68
(2)PEO (% m/m) (L)	**166**	**22,3**	**7,46**	**0,000072**	**114,88**	**217,63**
PEO (%m/m) (Q)	37,7	23,2	1,63	0,142598	-15,74	91,02
(3)pH (L)	34,8	223	1,56	0,156676	-16,60	86,20
pH (Q)	-13,1	23,2	-0,56	0,588368	-66,43	40,33
1L by 2L	**75,0**	**29,1**	**2,56**	**0,033511**	**7,47**	**141,72**
1L by 3L	35,3	29,1	1,21	0,260405	-31,87	102,38
2L by 3L	21,2	29,1	0,73	0,486058	-45,87	88,38

* Coeficiente de Regressão.

A análise dos dados da Tabela 5 revela que, em relação aos coeficientes de regressão para os valores de K do AS, os termos lineares das variáveis PEO e SAL e a interação entre as mesmas obtiveram efeito estatístico significativo ao nível de 95% de confiança com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9224, podendo-se inferir que essas variáveis e a correlação entre as mesmas são diretamente influentes sobre as variações nos valores de K e que na ausência de erros sistemáticos o desvio apresentado pelo R^2 em relação a unidade está relacionado à erros aleatórios. O fato da variável pH e suas interações não apresentarem efeito estatístico significativo na faixa estudada reafirmam a baixa influência dessa variável e suas interações nos mecanismos de partição do AS. Entretanto, é preciso considerar que a pequena influência do pH nesses sistemas está diretamente relacionada ao analito estudado, sendo que na partição do AAS a variação do pH foi altamente relevante.

Com a desconsideração da variável pH e suas interações, a análise de variância (ANOVA) para os modelos foi executada, e a significância do modelo foi aferida pelo teste estatístico de Fisher (teste F), buscando conferir se há diferenças significativas entre as fontes de variação nos resultados experimentais e o coeficiente de determinação múltipla (R^2). Nessas condições, a variável pH e suas interações foram transferidas ao Erro de Modelo, levando-se em consideração apenas a variáveis PEO, SAL e a interação entre as mesmas. Os resultados da ANOVA estão expressos na Tabela 6.

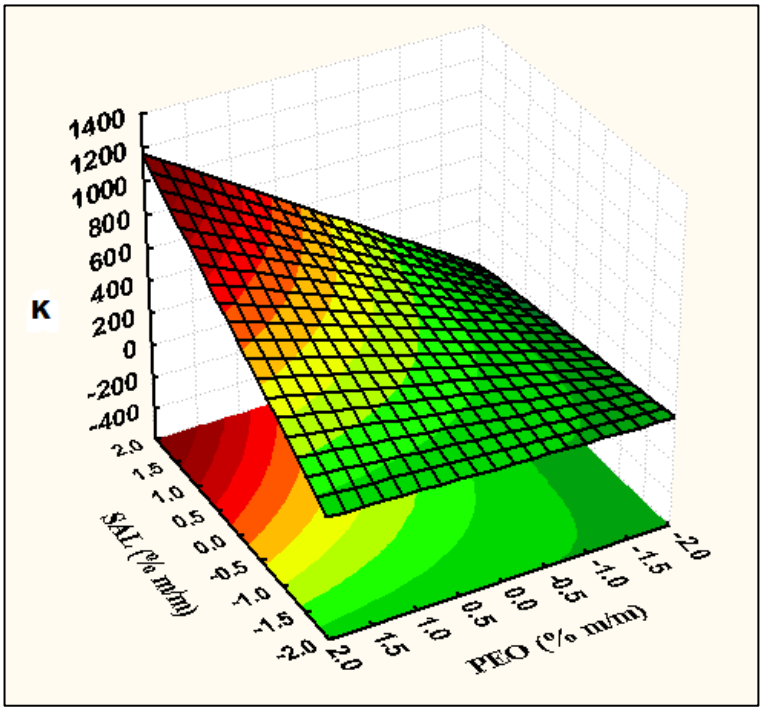
Tabela 6 - ANOVA dos resultados para os coeficientes de partição do AS.

	SS	df	MS	F	p
(1)SAL (L)	154029	1	154029	18,5983	0,000716
(2)PEO (L)	377468	1	377468	45,5776	0,000009
1L by 2L	44515,0	1	44515,3	5,37501	0,036068
Error	115947	14	8281,90		
Total SS	691959	17			

F tab. 5%, 1:14 = 4,60

Os valores de F encontrados para as variáveis PEO, Sal e a interação entre as mesmas revelaram-se maiores do que o valor tabelado de F a 5% de significância (4,60), podendo-se inferir a partir dessas condições que o ajuste do modelo para os valores de K aos dados experimentais foram bons e a superfície de resposta pôde ser gerada e está demonstrada na Figura 20.

Figura 19 - Superfície de Resposta em função das variáveis: [ ] PEO 1500 e [ ] Li_2SO_4.



A superfície de resposta gerada pela interação entre as variáveis concentração de PEO e SAL indica que o valor ótimo desse sistema quanto à partição do AS está entre os valores codificados 1,5 e 2,0 dos experimentos. Entretanto, sistemas com valores codificados acima de 1,68 mostraram-se impossíveis de serem experimentados, pois nessas condições o polímero e sal apresentaram considerável insolubilidade. Assim, a fim de encontrar valores adequados para essas variáveis e que obedeçam às condições de preparo do sistema, foram utilizados os dados codificados da Tabela 3 como parâmetros de referência nos limites inferiores e superiores na aplicação da Função de Desejabilidade.

A execução da função determinou que os valores desejáveis para as variáveis resultam em um sistema composto por 29,06% de PEO 1500 e 11,94% de Li_2SO_4 em pH 6.1, sob essas condições o valor esperado para K é de ± 940. Oito réplicas desse sistema foram testadas e os resultados obtidos estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Réplicas do sistema determinado pela função de Desejabilidade.

Réplicas	K
1	$1{,}11x10^3$
2	$1{,}10x10^3$
3	753
4	$1{,}05x10^3$
5	762
6	883
7	$1{,}02x10^3$
8	898

As análises estatísticas acerca dos valores encontrados reportam um valor médio de K = 949 (± 147). O valor médio encontrado para K experimentalmente revela que o valor predito de 940 pelo modelo foi satisfeito, porém não se pode deixar de levar em consideração o alto valor do desvio padrão. Essa alta imprecisão nos resultados de K pode estar relacionado ao fato de que quando se leva um SAB ao seu máximo efeito de extração/separação, a fase pela qual o analito tem pouco afinidade ficará com uma concentração muito baixa do mesmo, ficando muitas vezes essa concentração próxima ao limite de detecção do equipamento de medida. Assim, mesmos erros aleatórios menores podem aumentar consideravelmente os erros no sinal analítico.

A proximidade entre o valor predito e o valor real do *K* obtido revelam que a aplicação do DCCR com o auxílio da Função de Desejabilidade conduziram o processo de otimização do sistema a um SAB com elevado valor de partição do AS, sob condições experimentais possíveis. Assim, todos os objetivos vislumbrados para a execução desta etapa do trabalho foram alcançados e resultaram em um sistema mais eficiente de partição para o analito alvo.

6 CONCLUSÕES

Os estudos de partição do AAS e do AS no presente trabalho visaram entender o comportamento de partição desses analitos em Sistemas Aquosos Bifásicos, bem como encontrar uma composição de sistema que resultasse em um valor ótimo de o Coeficiente de Partição (K) para os analitos estudados.

Os estudos quanto aos efeitos da variação dos sais (Li_2SO_4, Na_2SO_4, $MgSO_4$, $Na_2C_4H_4O_6$ e $Na_3C_6H_5O_7$) formadores dos SAB's sobre o comportamento de partição do AAS revelaram que a utilização do Li_2SO_4 gera os maiores valores de K 91.4 (± 4.1). Em relação a variação da massa molar (PEO 1500 e 4000) e natureza química (PEO x L64) do polímero, as melhores condições de partição foram alcançadas para os sistemas formados por PEO 1500. Para este sistema, os estudos dos efeitos da variação nos valores pH (1,0; 3,5; e 6,0) indicaram que o valor de pH 1,0 resultou em valores otimizados de K que vão desde 56.4 (± 3.5) a 952 (± 323). Entretanto, os estudos comparativos de pH para o AS, nas mesmas condições do AAS, revelaram que esta variável não teve influência significativa sobre os valores de K. Tal resultado, foi confirmado pelo estudo multivariado das condições ótimas de partição do AS através de um Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR ajustado pela Função de Desejabilidade. Essa análise avaliou o efeito das variáveis concentração de polímero, concentração de sal e o pH da água no K do analito, indicando que apenas os termos lineares das variáveis concentração de PE e SAL e a interação entre as mesmas obtiveram efeito estatístico significativo ao nível de 95% de confiança. Por fim, a Função de Desejabilidade indicou um sistema ótimo para partição do AS composto de 29,06 % m/m de PEO 1500 e 11,94 % m/m de Li_2SO_4 em pH 6.1; sob essas condições o valor esperado para K era de ± 940. Oito réplicas desse sistema reportaram um valor real de K = 949 (± 147).

Todos os estudos realizados no presente trabalho ampliaram o entendimento de como as variáveis independentes e suas interações influenciam sobre o K desses analitos. Para ambos fármacos, fica constatado que os mesmos particionam preferencialmente para a fase superior dos SAB, podendo-se concluir que as forças motrizes que conduzem a partição dessas substâncias estão sob efeitos entálpicos preponderantes. De um modo geral, os resultados finais indicam que o SAB pode ser utilizado como uma técnica de extração/pré-concentração do AAS e do AS, e todas as vantagens em relação a química verde dessa técnica reforçam sua aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÀFICAS

ALEJANDRO, N. .; LING, T. C. .; LYDDIATT, A. . Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4. **Journal of Chromatography B**, v. 854, n. 1–2, p. 13–19, 2007.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, p. 301–312, nov. 2010.

ANVISA. **Bula do Ácido Acetilsalicílico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9023672015&pIdAnexo=2891796>. Acesso em: 3 fev. 2017.

ARIAS, D. G. **Contaminantes emergentes, seus efeitos no meio ambiente e desafios para novos mecanismos de purificação de água**. Disponível em: <http://www.ib.unicamp.br/dep_biologia_animal/BE310>. Acesso em: 2 jan. 2018.

ASENJO, J. A. .; ANDREWS, B. A. . Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 1–10, 2012.

BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A.; SABARINATH, C.; UPADHYAY, S. N... Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 4, p. 337–348, 2003.

BAYER; **Sobre Aspirina: História.** Disponível em: <http://www.aspirina.com.br/pt/sobre-aspirina/historia/>. Acesso em: 8 jun. 2017.

BERMUDEZ, J. A. Indústria farmacêutica, estado e sociedade: critica da política de medicamentos no Brasil. **Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamnetos.**, 1995.

BRASIL. **Mercado farmacêutico: Entenda o seu crescimento expressivo.** Disponível em: <http://www.superabrasil.com.br/blog/mercado-farmaceutico-entenda-seu-crescimento-expressivo/>. Acesso em: 8 jun. 2017.

BRASIL, I. T. **Situação do saneamento no Brasil**. Disponível em: <http://www.tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil>. Acesso em: 2 fev. 2017.

CARVALHO, C. P.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. A.; DA SILVA, L. H. M.; MAFFIA, M. C. Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278 . 15 to. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 52, n. 1, p. 351–356, 2007.

CAVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R. FILHO, J. R. de F. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: Um experimento de análise orgânica na graduação. **Educacion Quimica**, v. 26, n. 4, p. 319–329, 2015.

CUNHA, E. V. C. **Equilíbrio Líquido-Líquido Em Sistemas Aquosos Bifásicos Água + Peg 8000 + Sal : Determinação Experimental E Modelagem.** 2008. 94 f. Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. UNICAMP, Campinas, 2008.

DA COSTA, A. R. **PARTIÇÃO DE LACTOFERRINA EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**. 2010. 56 f. Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de ―Mestre‖. UESB, Itapetinga, 2010.

DA SILVA, F. M.; DE LACERDA, P. S. B.; JUNIOR, J. J. Desenvolvimento sustentável e Química Verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103–110, 2005.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Calorimetric Investigation of the Formation of Aqueous Two-Phase Systems in Ternary Mixtures of Water, Poly(ethylene oxide) and Electrolytes (Or Dextran). **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 43, p. 10069–10073, 2000.

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, jun. 2006.

DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1332–1339, jun. 2006.

DA SILVA, M. DO C. H.; DA SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J. A Novel Micellar Medium Using Triblock Copolymer for Cobalt Determination. **Analytical Sciences**, v. 21, n. 8, p. 933–937, 2005.

DAUDT; **Laboratório Daudt: História.** Disponível em: <http://www.labdaudt.com.br/br/a-empresa/historia>. Acesso em: 12 jun. 2017.

DE AGUIAR, J. L. N.; LEANDRO, K. C.; ABRANTES, S. de M. P.; ALBERT, A. L. M. Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 723–727, 2009.

DE BRITO, G. M. **Termodinâmica de partição do ânion [Co(NO2)6]-3 em sistemas aquosos bifásicos**. 2007. 91 f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Magister Scientiae. UFV, Viçosa, 2007.

DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (lpme): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 637–644, fev. 2008.

DE SOUZA, R. L.; CAMPOS, V. C.; VENTURA, S. P. M.; SOARES, C. M. F.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, Á. S. Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes. **Fluid Phase Equilibria**, v. 375, p. 30–36, 2014.

DE TEVES, M. L. U. **Ficha Técnica: Ácido ACetilsalicílico**. Disponível em : <https://www.oswaldocruz.br/download/fichas/%C3%81cido%20acetilsalic%C3%ADlico2003.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2017.

DIAMOND, A. D. .; HSU, J. T. . Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 47, p. 89–135, 1992.

DUARTE, A.; RESENDE, C.; DENIS, M.; VASCONCELOS, F. **Análise da Indústria Farmacêutica - Perspectivas e Desafios.** Disponível em: <www.senado.leg.br/estudos.>. Acesso em: 8 jan. 2017.

DUARTE, L. J. N. .; CANSELIER, J. P. EXTRAÇÃO NO PONTO NUVEM DE COMPOSTOS ORGÂNICOS HOMÓLOGOS E ISÔMEROS. **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 426–432, fev. 2005.

E SÁ, É. DA S. **Determinação espectrofotométrica de ácido salicílico em produtos dermatológicos**. 2006. 38 f. Monografia apresentada ao Curso de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química.UFSC. Florianóplois, 2006.

EVERBEG, H.; CLOUGH, J.; HENDERSON, P.; JERGIL, B.; TJMELD, F.; RAMIREZ, I. B. R. Isolation of Escherichia coli inner membranes by metal affinity two-phase partitioning. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 2, p. 244–252, 2006.

FARIA, A. M. .; QUEIROZ, M. E. L. R. .; NEVES, A. A. . Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: recotoxicol e meio ambiente**, v. 15, p. 29–42, dez. 2005.

FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G.; MACHADO, I. S.; TAMBOURGI, E. B. Purificação da Enzima Bromelina Presente no Curauá (Ananas erectifolius L . B . SMITH) Variedade Roxa, por Sistema Bifásico Aquoso. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 197–202, 2011.

FOGAÇA, J. R. V. **"Ácido Acetilsalicílico (AAS)"**. Disponível em: <http://brasilescola.uol.com.br/quimica/Acido-acetilsalicilico-aas.htm>. Acesso em: 26 jun. 2017.

FONSECA, M. S. R.; MEJIA, D. P. M. **Benefício do ácido salicílico na acne grau I**. Disponível em: <http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/39/10_-_BenefYcio_do_Ycido_salicYlico_na_acne_grau_I.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2017.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. **Princípios das Operações Unitárias.** 2 ed. Rio de Janeiro. LTC. 1982. p. 670.

FRANCISCO, K. R. . **Estudo das forças motrizes que regem a partição dos complexos [fe(cn)5no]2- e [cr(cn)5no]3-em sab's formados por poli(óxido de etileno) e sulfatos.** 2006. 72 f. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de "Magister Scientiae". UFV, Viçosa, 2006.

FREIX, A.; SCHONEWALD, M.; GEILENKIRCHEN, P.; MULLER, M.; KULA, M. R.; HUBBUCH, J. Exploitation of the Coil−Globule Plasmid DNA Transition Induced by Small Changes in Temperature, pH Salt, and Poly(ethylene glycol) Compositions for Directed Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. **Langmuir**, v. 22, n. 9, p. 4282–4290, 2006.

GARGANO, L. B. A.; SHASHIKI, A. T.; KOBAYASHI, A. K. Partição de ácido lático em sistemas aquosos bifásicos com peg / sulfato de sódio. **Encontro Brasileiro sobre o Ensino de Engenharia Química.**, n. 16, p. 1–7, 25 set. 2016.

GTHEALTHCARE. **Panorama do mercado farmacêutico no Brasil.** Disponível em: <http://gtthealthcare.com.br/blog/index.php/panorama-farmaceutico-no-brasil/>. Acesso em: 5 jun. 2017.

HAGHTALAB, A. .; MOKTHTARANI, B. .; MAURER, G. . Experimental results and thermodynamic modeling of the partitioning of lysozyme, bovine serum albumin, and α-amylase in aqueous two-phase systems of PEG and (K3HPO4 or Na2SO4). **J. Chem. Eng. Data.**, v. 48, p. 1170–1177, 2003.

HALVORSEN, T. G. .; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci**, v. 760, n. 2, p. 219–226, 2001.

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. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 237–244, 1998.

JÚNIOR, J. A. **Efeito hidrofóbico de macromoléculas sobre a partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos**. 2006. 67 f. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de 'Magister Scientiae".UFV, Viçosa, 2006.

KALAIVANI, S.; REGUPATHI, I. Synergistic extraction of α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin from acid whey using aqueous biphasic system: Process evaluation and optimization. **Separation and Purification Technology**, v. 146, p. 301–310, 2015.

KIHARA, E.; ORLANDO, M.; CARVALHO, C.; AQUINO, V.O setor farmacêutico no Brasil: Panorama do mercado brasileiro. **PWC**, p. 615–634, 2008.

KRAMER, R. D. **Poluentes emergentes: Os "novos" contaminantes ambientais.** Disponível em: <https://www.sinergiaengenharia.com.br/poluentes-emergentes-os-novos-contaminantes-ambientais/>. Acesso em: 22 set. 2017.

LACERDA, V. G.; MAGESTE, A. B.; SANTOS, I. J. B.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H.. Separation of Cd and Ni from Ni–Cd batteries by an environmentally safe methodology employing aqueous two-phase systems. **Journal of Power Sources**, v. 193, n. 2, p. 908–913, 2009.

MAGESTE, A. B.; DE LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7623–7629, 2009.

MARTINS, J. P. **Partição de cianocomplexos em sistemas aquosos bifásicos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílicos**. 2008. 74 f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de Magister Scientiae. UFV, Viçosa, 2008.

MARTINS, J. P. et al. Liquid – Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly (ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures. **J. Chem. Eng. Data 2008,** v. 53, n. 1, p. 238–241, 2008.

MASSABNI, A. C. . **Aspirina Um velho medicamento com novos usos**. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/quimica_viva__aspirina>. Acesso em: 23 Fev. 2017.

MOREIRA, J. C.; GONÇALVES, E. S. **Contaminantes Emergentes - Desafios e Perspectivas**: 733. São Luís - MA. 2011.

NOVATO, R. **O Consumo de Medicamentos no Brasil - a tênue linha entre o remédio e o veneno**. Disponível em: <http://fenafar.org.br/fenafar/index.php/item/7966-o-consumo-de-medicamentos-no-brasil-a-tênue-linha-entre-o-remédio-e-o-veneno-por-rilke-novato*>. Acesso em: 3 fev. 2017.

OLIVEIRA, M. C. de; ABREU, M. A. N. de; PESSÔA FILHO, P. de A. Determinação do coeficiente de partição de proteínas em sistemas aquosos bifásicos formados por sais voláteis e copolímeros-bloco PEO-PPO-PEO. **VII COBEQ-IC: programação e resumos,** 2007.

PADILHA, G. D. S.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Partição da lipase de Burkholderia cepacia em sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato. **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 193–199, 2010.

PATRICIO, P. da R.; MAGESTE, A. B.; DE LEMOS, L. R.; DE CARVALHO, R. M. M.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. do C. H. Phase diagram and thermodynamic modeling of PEO + organic salts + H2O and PPO + organic salts + H2O aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 305, n. 1, p. 1–8, 2011.

PATRÍCIO, P. R.; MESQUITA, M. C.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H..Application of aqueous two-phase systems for the development of a new method of cobalt(II), iron(III) and nickel(II) extraction: A green chemistry approach. **Journal of Hazardous Materials**, v. 193, p. 311–318, 2011b.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid−Liquid−Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Anal. Chem.**, v. 71, n. 14, p. 2650–2656, 1999.

PIATTI, I. **Peelings com ácidos na estética**. Disponível em: <http://negocioestetica.com.br/site/peelings-com-acidos-na-estetica/>. Acesso em: 23 nov. 2017.

PIMENTA, C. D.; SILVA, M. B.; SALOMON, V. A. P.; PENTEADO, R. B.; GOMES, F. M.. Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados. **Production**, n. x, p. 598–610, 2014.

PINTO, C. G.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. Cloud point preconcentration and high-performance liquid chromatographic determination of organophosphorous pesticides with dual electrochemical detection. **Anal. Chem.**, v. 67, p. 2606–2612, 1995.

POWELL, H. A. .; KERBY, N. W. .; ROWELL, P. . High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide glyphosate and its metabolite (aminomethyl)phosphonic acid and their extraction from cyanobacteria. **Journal of Chromatography A**, v. 502, p. 201–207, 1990.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatograp hica Microextração**, v. 1, n. 3, p. 11–19, 2009.

RAMOS, T. R.; Santoro, M. I. R. M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.; SINGH, A. K. Validação de um método analítico para a determinação de substâncias ativas em formulações farmacêuticas empregadas em “peelings” químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, 2005.

RIBEIRO, M. A. R. . Saúde pública e as empresas químico-farmacêuticas. **Hist. Cienc. Saúde**, v. 7, n. 3, p. 607–626, 2001.

RICHARDSON, S. D. .; TERNES, T. A. . Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4614–4648, 2011.

RIGAZZO, J. N.; VIANA, R. da S.; FIGUEIREDO, P. A. M. de; LISBOA, L. A. M.; JÚNIOR, R. S. **Efeitos de diferentes doses de Ácido salicílico sobre características fisiológicas no**

desenvolvimento inicial de sorgo sacarino. Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário. **Anais**...1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas, 2016

RODRIGUES, G. D.; HESPANHOL, M. do C. DA SILVA, L. H. M. TEIXEIRA, L. da S. ANDRADE, Vi. M. de 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**, v. 54, n. 6, p. 1894–1898, 2009.

RODRIGUES, G. D.; DE LEMOS, Leandro Rodrigues; DA SILVA, Luis Henrique Mendes; DA SILVA, M. do C. H.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. dos R. A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system. **Talanta**, v. 80, n. 3, p. 1139–1144, 2010.

SAMPAIO, D. D. A.; MAFRA, L. I.; YAMAMOTO, C. I.; DE ANDRADE, E. F.; DE SOUZA, M. O.; MAFRA, M. R.; DE CASTILHOS, F. Aqueous two-phase (polyethylene glycol + sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 98, p. 86–94, 2016.

SANTESSON, S.; RAMIREZ, I. B. R.; VIBERG, P.; JERGIL, B.; NILSSON, S. Affinity two-phase partitioning in acoustically levitated drops. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 303–308, 2004.

SANTOS, J. H.; E SILVA, F. A.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; DE SOUZA, R. L.; SOARES, C. M. F.; Ionic liquid-based aqueous biphasic systems as a versatile tool for the recovery of antioxidant compounds. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 1, p. 70–77, 2015.

SILVA, M. dos S.; SILVA, R. P. da; SOUZA, A. V. L. de; XAVIER, Y. P. M.; OLIVEIRA, A. C. de; COQUEIRO, D. S. O. Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos TT - Exogenous application of salicylic acid in yellow passion fruit for the control of fruit woodiness virus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1–7, 2016.

SIROK, D.; PÁTFALUSI, M.; SZELECZKY, G.; SOMORJAI, G.; GRESKOVITS, D.; MONOSTORY, Ka. Robust and sensitive LC/MS-MS method for simultaneous detection of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma. **Microchemical Journal.**, v. 612, n. 02, p. 9, 2016.

SMITH, J. M. .; VAN NESS, H. C. .; ABOTT, M. M. . **Introdução à termodinâmica da engenharia química.** 5 ed. Rio de Janeiro: L. Científicos. 2000. p. 640.

UHDRE, D. F.; NEZI, S. M.; ROMERO, A. L. Utilização de um spot test para o monitoramento de ácido salicílico em produtos à base de ácido acetilsalicílico (aas). **Encontro de produção Científica e Tecnológica**, n. 6, p. 1–7, 24 out. 2011.

YOKOMIZO, V. M. F.; BENEMOND, T. M. H.; CHISAKI, C. BENEMOND, P. H. Peelings químicos: Revisão e aplicação prática. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 1, p. 58–68, 2013.

ZHOU, X. Y.; ZHANG, J.; XU, R. P.; MA, X.; ZHANG, Z. Q. Aqueous biphasic system based on low-molecular-weight polyethylene glycol for one-step separation of crude polysaccharides from Pericarpium granati using high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1362, p. 129–134, 2014.