

ROSANA MOURA DE OLIVEIRA

**EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, SULFATO DE ZINCO, SULFATO
DE COBRE E CITRATO DE SÓDIO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

T

O48e
2006

Oliveira, Rosana Moura de, 1978-

Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas / Rosana Moura de Oliveira. – Viçosa : UFV, 2006.

x, 73f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Jane Sélia dos Reis Coimbra.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fases e equilíbrio de sistema. 2. Partição de fases. 3. Equilíbrio líquido-líquido. 4. Sulfato de cobre. 5. Sulfato de zinco. 6. Citrato de sódio. 7. Polietilenoglicol. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.2963

ROSANA MOURA DE OLIVEIRA

**EQUILÍBRIO DE FASES DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS
COMPOSTOS POR POLIETILENOGLICOL, SULFATO DE ZINCO, SULFATO
DE COBRE E CITRATO DE SÓDIO SOB DIFERENTES TEMPERATURAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 12 de maio de 2006

Prof. Luis Antônio Minim
(Conselheiro)

Prof. Maurício Paulo Ferreira Fontes
(Conselheiro)

Prof. Edwin Elard Garcia Rojas

Prof^a. Maria Cristina B. M. de Oliveira

Prof^a Jane Sélia dos Reis Coimbra
(Orientadora)

Aos meus pais, Denilson e Cleide, aos meus irmãos Cleison e Ruben e às minhas cunhadas, Elzilene e Nadja, à minha sobrinha Camila, aos meus familiares, aos amigos e companheiros.

AGRADECIMENTO

A Deus, pelas incontáveis bênçãos e pela felicidade de ter alcançado mais esta vitória.

À Universidade Federal de Viçosa, pelo Programa de Pós-Graduação.

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra, pela orientação, incentivo e apoio durante todo o mestrado. Agradeço a confiança em mim depositada, que foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores e conselheiros Luis Antonio Minim e Luis Henrique Mendes da Silva, pela orientação, prestatividade e disponibilidade oferecidas.

Ao professor Maurício, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho e pela contribuição na conclusão do mesmo.

Ao colega e amigo Edwin, que também me ajudou muito durante todo o tempo, pelos conselhos dados e ajuda em momentos difíceis.

À Kelly em especial, por toda ajuda, paciência, disponibilidade e apoio fundamentais para a realização deste trabalho.

À Fabíola que se mostrou grande amiga e que sempre ajudou bastante.

À amiga Regina, pelo apoio constante.

À Simone que me ajudou bastante durante o trabalho.

Aos amigos e colegas do LPS Omar, Paulo Sérgio, Tarliane, Oscar, Roney, Daniele, Marcelo, Bruno, Roberta, Gisele e me perdoe alguém que por um equívoco não tenha sido citado.

Aos colegas do Laboratório de Físico-Química, pela ajuda, e também ao Marcus pela disponibilidade e prestatividade.

Aos funcionários do DTA.

Aos funcionários Ricardo (DQI), Nivaldo (DTA), Chico (DPS) e Fernando (DZO) pela ajuda nas análises.

Aos amigos, não menos importantes, Sérgio, Nivio, Vagner, Andréia, pela amizade, pelo apoio e pela força em diversos momentos.

E às pessoas que por algum equívoco não tenham sido aqui citadas, mas que em algum momento e de alguma forma estiveram do meu lado e me estenderam a mão.

Muito obrigada, a todos vocês.

INDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS GERAIS	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPÍTULO 1	4
1. REVISÃO DE LITERATURA	4
1.1 Equilíbrio de fases	4
1.2 Sistemas Aquosos Bifásicos	7
1.3 Aplicações dos Sistemas Aquosos Bifásicos	9
1.4 Diagramas de Equilíbrio de Fases	10
1.5 Determinação Experimental das Curvas Binodais	13
1.6 Efeito da Temperatura sobre o Equilíbrio de Fases	14
1.7 Efeito do Tipo de Sal sobre o Equilíbrio de Fases	16
1.8 Efeito da Massa Molar do Polímero sobre o Equilíbrio de Fases	17
1.9 Componentes dos Sistemas Aquosos Bifásicos	18
1.9.1 Polietilenoglicol (PEG)	18
1.9.2 Sulfato de Zinco, Sulfato de Cobre e Citrato de Sódio	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 Reagentes e Equipamentos	19
2.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos	20
2.2.1 Sistema PEG 4000 + Sulfato de zinco + Água	20
2.2.2 Sistema PEG 4000 + Sulfato de cobre + Água	21
2.2.3 Sistemas PEG (1500 ou 4000) + Citrato de sódio + Água	21
2.3 Coleta das Fases	22
2.4 Densidade	22
2.5 Medida do Volume das Fases	23
2.6 Quantificação do Sulfato de Cobre e Sulfato de Zinco	24
2.7 Quantificação do Citrato de Sódio	24
2.8 Polietilenoglicol (PEG)	24
2.9 Quantificação de Água	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

CAPÍTULO 2 - Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two-phase system containing polyethyleneglycol and zinc sulphate at different temperatures.....	32
Abstract.....	32
Introduction	32
Experimental Section	33
Results and Discussion.....	34
Conclusions	40
Literature Cited	41
CAPÍTULO 3 - Equilibrium data for the ternary system PEG 4000 + copper sulphate + Water at 5 °C, 10 °C, 35 °C and 45 °C	43
Abstract.....	43
Introduction	43
Experimental Section	44
Results and Discussion.....	45
Conclusions	49
Literature Cited	50
CAPÍTULO 4 - Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed by sodium citrate + PEG 1500 or PEG 4000 at different temperatures	52
Abstract.....	52
Introduction	52
Experimental Section	53
Results and Discussion.....	54
Conclusions	62
Literature Cited	63
CONCLUSÃO GERAL	65
APÊNDICE 1.....	66
APÊNDICE 2.....	69

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.....	4
Figura 1. Diagramas de fase expresso em coordenadas triangulares (a) e retangulares (b).....	11
Figura 2. Diagrama de fases de um sistema polímero-polímero.....	11
CAPÍTULO 2 - Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two-phase system containing polyethyleneglycol and zinc sulphate at different temperatures.....	32
Figure 1. Binodal curves for the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ (2) + Water (3) system at ((◻) 5 °C (◇) 10 °C (Δ) 25 °C (○) 35 °C (▢) 45 °C).....	35
Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 10 °C).	37
Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 25 °C).	38
Figure 4. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 35 °C).	38
Figure 5. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 45 °C).	39
CAPÍTULO 3 - Equilibrium data for the ternary system PEG 4000 + copper sulphate + Water at 5 °C, 10 °C, 35 °C and 45 °C.....	43
Figure 1. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 10 °C).....	47
Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO ₄ + Water (3) system from (5 to 35) °C ((●) 5 °C (▢) 35 °C).....	48
Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO ₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 45 °C).....	48
CAPÍTULO 4 - Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed by sodium citrate + PEG 1500 or PEG 4000 at different temperatures.....	52
Figure 1. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 10 °C).	56
Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 25 °C).	56
Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (▢) 35 °C).	57

Figure 4. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (◻) 45 °C).	57
Figure 5. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 10 °C (◻) 35 °C).	60
Figure 6. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 10 °C (◻) 45 °C).	61
Figure 7. Effect of PEG molecular mass for systems PEG (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) at 30 °C: (●) PEG 1500, (◻) PEG 4000.	61
APÊNDICE 1.....	66
Figura 1. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 5°C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H ₂ O (3) : (●) sulfato de cobre, (◻) sulfato de zinco.	66
Figura 2. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 10°C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H ₂ O (3) : (●) sulfato de cobre, (◻) sulfato de zinco.	56
Figura 3. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 35°C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H ₂ O (3) : (●) sulfato de cobre, (◻) sulfato de zinco.	67
Figura 4. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 45°C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H ₂ O (3) : (●) sulfato de cobre, (◻) sulfato de zinco.	68

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos	9
Tabela 2 - Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos.....	9
Tabela 3 – Biomoléculas extraídas com o uso de SABs.....	10
CAPÍTULO 2 - Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two-phase system containing polyethyleneglycol and zinc sulphate at different temperatures.....	32
Table 1. Mass fraction of the PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ (2) + Water (3) systems, at different temperatures.....	36
Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ (2) + Water ATPS at different temperatures.....	39
Table 3. Tie-Line Length for PEG 4000 (1) + ZnSO ₄ (2) + Water ATPS at different temperatures.....	40
CAPÍTULO 3 - Equilibrium data for the ternary system PEG 4000 + copper sulphate + Water at 5 °C, 10 °C, 35 °C and 45 °C.....	43
Table 1. Mass Fraction of the PEG 4000 (1) + CuSO ₄ (2) + Water (3) systems, at different temperatures.....	46
Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 + CuSO ₄ + Water ATPS at different temperatures.....	47
Table 3. Tie-Line Length for PEG 4000 + CuSO ₄ + Water ATPS at different temperatures.....	49
CAPÍTULO 4 - Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed by sodium citrate + PEG 1500 or PEG 4000 at different temperatures.....	52
Table 1. Mass Fraction of the PEG 4000 (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) systems, at different temperatures.....	55
Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 + Sodium citrate + Water ATPS at different temperatures.....	58
Table 3. Tie-Line Length for PEG 4000 + Sodium citrate + Water ATPS at different temperatures.....	58
Table 4. Mass fraction of the PEG 1500 (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) systems, at different temperatures.....	59
Table 5. Tie-Line Slope for PEG 1500 + Sodium citrate + Water ATPS, at different temperatures.....	60
Table 6. Tie-Line Length for PEG 1500 + Sodium citrate + Water ATPS, at different temperatures.....	60

APÊNDICE 2.....	69
Tabela 1. Dados de equilíbrio para sistemas PEG (1) + ZnSO ₄ (2) + H ₂ O (3) ..	69
Tabela 2. Dados de equilíbrio para sistemas PEG (1) + CuSO ₄ (2) + H ₂ O (3) .	70
Tabela 3. Dados de equilíbrio para sistemas PEG 1500 (1) + Citrato de sódio (2) + H ₂ O (3)	71
Tabela 4. Dados de equilíbrio para sistemas PEG 4000 (1) + Citrato de sódio (2) + H ₂ O (3)	72

LISTA DE SÍMBOLOS

c	Composição de soluto
Δ	Variação
\hat{f}_i	Fugacidade da espécie i
F	Número de graus de liberdade
G	Energia livre de Gibbs
H	Entalpia
μ_i	Potencial químico da espécie i
n	Número de espécies químicas
P	Pressão
S	Entropia
T	Temperatura
x_i	Fração molar da espécie i
γ_i	Coefficiente de atividade da espécie i

SOBESCRITO

α, β, π, k	Fases do sistema
*	Componente puro

SUBESCRITO

s	Solvente do sistema
i, j	Solutos do sistema
MIX	Mistura
sol.	Solução
1, 2, 3	Componentes do sistema
l	Líquido

RESUMO

OLIVEIRA, Rosana Moura de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006. **Equilíbrio de fases de sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas.** Orientadora: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Conselheiros: Luis Antônio Minim, Luís Henrique Mendes da Silva, Maurício Paulo Ferreira Fontes e José Antonio Marques Pereira.

Este trabalho apresenta o estudo de sistemas aquosos bifásicos formados por polietilenoglicol (PEG), sais inorgânicos e água. Os polímeros utilizados de diferentes massas molares foram PEG 1500 g.mol⁻¹ e PEG 4000 g.mol⁻¹. Os sais utilizados nos sistemas bifásicos foram sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio. Os sistemas PEG 1500 + citrato de sódio foram analisados nas temperaturas de (10, 35 e 45) °C, enquanto que os sistemas PEG 4000 + sulfato de zinco ou sulfato de cobre foram estudados nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C. Os sistemas compostos por PEG 4000 + citrato de sódio foram estudados nas mesmas temperaturas que os sulfatos de zinco ou cobre, e também a 25 °C. O efeito da temperatura na curva binodal foi analisado tendo sido observado um aumento da área bifásica nos sistemas PEG 4000 + sulfato de cobre e PEG 4000 + citrato de sódio. Porém, no sistema contendo sulfato de zinco este comportamento foi observado apenas entre (5 a 25) °C, sendo observada uma pequena redução entre (35 e 45) °C. Não foi observada a expansão da região bifásica com o aumento da temperatura para o sistema PEG 1500 + citrato de sódio. De maneira geral, houve um aumento da inclinação da linha de amarração com o incremento de temperatura. O efeito da massa molar do polímero foi investigado para o polietilenoglicol 1500 e 4000, sendo observado um aumento da região bifásica com o aumento da massa molar do polímero a 35 °C. O efeito do sal foi investigado nos sistemas aquosos PEG 4000 e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre, sendo observada uma maior região bifásica no sistema contendo sulfato de cobre.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Rosana Moura de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, may 2006. **Phase equilibrium of aqueous two-phase systems composed by polyethyleneglycol, zinc sulphate, copper sulphate and sodium citrate at different temperatures.** Adviser: Jane Sélia dos Reis Coimbra. Committee members: Luis Antônio Minim, Luís Henrique Mendes da Silva, Maurício Paulo Ferreira Fontes and José Antonio Marques Pereira.

This work presents the study of aqueous two-phase systems containing by polymers polyethyleneglycol (PEG), inorganic salts and water. Polymers used had two different molecular weights, PEG 1500 g.mol⁻¹ and PEG 4000 g.mol⁻¹. The salts that composed the biphasic systems were zinc sulphate, copper sulphate and sodium citrate. Systems with PEG 1500 + sodium citrate were analyzed at (10, 35 and 45) °C, while systems PEG 4000 + zinc sulphate or copper sulphate were studied at the temperatures (5, 10, 35 and 45) °C. The systems composed by sodium citrate + PEG 4000 were studied at the same temperature as zinc or copper sulphate and also at 25 °C. The effect of temperature on the binodal curve was analyzed being observed an increase in the biphasic area in the PEG 4000 + copper sulphate and PEG 4000 + sodium citrate systems. However, in zinc sulphate systems this behavior was observed only from (5 to 25) °C, being observed a small reduction from (35 to 45) °C. It was not observed an expansion in the biphasic area with an increase in temperature for the PEG 1500 + sodium citrate system. In general, there was an increase in the tie line slope with an increase in the temperature. The effect of molar mass of polymer was investigated for polyethyleneglycol 1500 and 4000, being observed an increase in the biphasic area with an increasing in polymer molar mass at 35 °C. Salt effect was investigated in the systems containing PEG 4000 and salts zinc sulphate and copper sulphate, being observed a larger biphasic area for the system containing sulphate copper.

INTRODUÇÃO

Sistemas formados por fases líquidas podem ser utilizados em diversos processos industriais como, por exemplo, na extração líquido-líquido, em que um soluto dissolvido em uma fase se difunde para outra. Vários fatores, tais como temperatura, pH, composição do sistema, entre outros, influenciam na transferência do soluto entre as fases. A extração líquido-líquido com solventes orgânicos é extensamente empregada no refino de derivados de petróleo. Na indústria de alimentos, há, por exemplo, referências à produção de lecitina de soja por extração com acetona.

Em 1896, Beijerinck observou a formação de fases ao misturar água, agar e gelatina ou amido em determinadas concentrações. Relatou também o enriquecimento da fase superior com a gelatina e da fase inferior com o agar ou amido. Mas, somente em 1956 com as pesquisas de Albertsson, teve início o emprego dos sistemas aquosos bifásicos na separação de biomoléculas.

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados pela mistura de componentes químicos, como polímeros, sais, açúcares e água, numa certa faixa de concentração, temperatura, entre outros fatores, que se dividem em duas fases aquosas imiscíveis.

Os SABs promovem a separação de partículas principalmente por diferenças nas propriedades de superfície. A separação de substâncias por meio da partição é um método clássico utilizado na química orgânica, em escala de laboratório e industrial, na química inorgânica e na bioquímica, com diversas aplicações. Esses sistemas produzem fases ricas em água permitindo uma partição reprodutível de partículas frágeis e macromoléculas.

A extração de compostos usando sistemas aquosos bifásicos se tornou uma técnica emergente importante para a separação e a concentração de proteínas, organelas celulares e outros produtos biológicos.

O alto conteúdo de água das fases dos SABs proporciona um ambiente adequado e condições amenas para a extração de biomoléculas, preservando suas principais propriedades, como densidade, viscosidade e tensão interfacial.

Os sistemas aquosos bifásicos mais comumente investigados são compostos por polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou PEG e sais inorgânicos. A dextrana apresenta elevado custo para utilização em larga escala, quando comparado ao PEG o qual apresenta baixa viscosidade, requerendo um curto

intervalo de tempo para a separação de fases, viabilizando, portanto, a sua aplicação em processos industriais.

Como o mecanismo que governa a formação de fases e a partição de solutos nos sistemas aquosos bifásicos ainda é desconhecido, a obtenção de um sistema aquoso bifásico otimizado para a extração de um determinado soluto está ainda restrita a uma abordagem de tentativa e erro. A grande quantidade e diferença entre os solutos capazes de gerar os sistemas aquosos bifásicos, além de fatores como temperatura, pH, natureza do eletrólito, concentração do polímero, etc., dificultam a predição e a interpretação da partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos. Sendo assim, é importante a aplicação de pesquisas na área visando à obtenção de dados de equilíbrio para o desenvolvimento de processos de extração de biomoléculas e de modelos que possam prever a partição entre as fases dos sistemas aquosos bifásicos.

OBJETIVOS GERAIS

- Apresentar uma breve fundamentação teórica referente aos sistemas aquosos bifásicos (SABs), diagramas de equilíbrio e alguns fatores que influenciam o equilíbrio, tais como temperatura, massa molar do polímero e tipo de sal.
- Verificar a formação de fases para os sistemas aquosos compostos por polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ e os sais sulfato de cobre e sulfato de zinco, viabilizando sua aplicação para a partição (extração ou purificação) de biomoléculas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os dados de equilíbrio de fases, para sistemas aquosos bifásicos formados por água, polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C.
- Determinar os dados de equilíbrio de fases, para sistemas aquosos bifásicos formados por água, polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ e citrato de sódio nas temperaturas de (5, 10, 25, 35 e 45) °C.
- Determinar os dados de equilíbrio de fases, para sistemas aquosos bifásicos formados por água, polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ e citrato de sódio nas temperaturas de (10, 35 e 45) °C.
- Estudar a influência da temperatura nos sistemas citados, verificando o aumento ou não da região bifásica, da inclinação e comprimento das linhas de amarração.
- Estudar a influência da massa molar do polímero sobre a curva de equilíbrio.
- Estudar a influência do tipo de sal para os sistemas compostos por polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Equilíbrio de fases

O equilíbrio implica numa situação em que não ocorrem modificações macroscópicas em relação ao tempo e não ocorrem modificações nas propriedades das substâncias (SMITH et al., 2000).

O critério geral de equilíbrio de fases afirma que a condição de equilíbrio entre várias fases, na mesma temperatura e pressão, está satisfeita quando o potencial químico de cada espécie química presente no sistema é o mesmo em todas as fases. Desta forma, para π fases e n espécies químicas (LEVINE, 1995):

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^\beta = \dots = \mu_i^\pi \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

Ao assumir que as fases em um sistema aquoso bifásico estão em equilíbrio, a predição da formação de duas fases e a predição do estado de equilíbrio (composição, densidade, etc.) podem ser feitas igualando-se os potenciais químicos dos componentes e os balanços de massa do sistema. Fazendo este cálculo assume-se, mais adiante, que os polímeros são representados por um componente simples com a massa molar média do polímero. Neste caso, para um sistema formado por um solvente s e dois solutos i e j :

$$\mu_s^{\text{sup}}(T, P, c_i^{\text{sup}}, c_j^{\text{sup}}) = \mu_s^{\text{inf}}(T, P, c_i^{\text{inf}}, c_j^{\text{inf}}) \quad (2)$$

$$\mu_i^{\text{sup}}(T, P, c_i^{\text{sup}}, c_j^{\text{sup}}) = \mu_i^{\text{inf}}(T, P, c_i^{\text{inf}}, c_j^{\text{inf}}) \quad (3)$$

$$\mu_j^{\text{sup}}(T, P, c_i^{\text{sup}}, c_j^{\text{sup}}) = \mu_j^{\text{inf}}(T, P, c_i^{\text{inf}}, c_j^{\text{inf}}) \quad (4)$$

onde μ_k^i é o potencial químico do soluto i na fase k [superior (s) ou inferior (inf)] e c_k^i é a composição (mol. kg⁻¹) de soluto i na fase k (CABEZAS, 1996).

Outra forma do critério geral de equilíbrio de fases é obtida ao se introduzir a fugacidade, que representa a pressão corrigida (na solução) na Eq 1 (SMITH et al., 2000):

$$\hat{f}_i^\alpha = \hat{f}_i^\beta = \dots = \hat{f}_i^\pi \quad (i=1,2,\dots,n) \quad (5)$$

Este critério estabelece que para haver o equilíbrio em fases múltiplas, na mesma temperatura e na mesma pressão P , a fugacidade de cada componente deve ser igual em todas as fases (SMITH et al., 2000).

O coeficiente de atividade constitui uma importante função auxiliar nas aplicações da termodinâmica ao equilíbrio de fase. Introduzindo esse conceito na Eq 5, tem-se que:

$$x_i^\alpha \times \gamma_{i(T,P,x_i^\alpha)}^\alpha \times \hat{f}_{i(T,P)} = x_i^\beta \times \gamma_{i(T,P,x_i^\beta)}^\beta \times \hat{f}_{i(T,P)} \quad (i=1,2,\dots,n) \quad (6)$$

Reduzida para:

$$x_i^\alpha \times \gamma_{i(T,P,x_i^\alpha)}^\alpha = x_i^\beta \times \gamma_{i(T,P,x_i^\beta)}^\beta \quad (i=1,2,\dots,n) \quad (7)$$

com i (número de componentes do sistema) variando entre 1 e n , em que x_i é a fração molar do componente i na fase especificada e γ_i é o coeficiente de atividade (CARVALHO, 2004).

A equação anterior pode ser utilizada com dados experimentais de equilíbrio de fases para calcular o coeficiente de atividade de um componente numa fase a partir do coeficiente conhecido do mesmo componente na outra fase (SANDLER, 1989).

Em um sistema líquido contendo n espécies químicas:

$$\gamma_i^\alpha = \gamma_i(x_1^\alpha, x_2^\alpha, \dots, x_{n-1}^\alpha, T, P) \quad (8)$$

$$\gamma_i^\beta = \gamma_i(x_1^\beta, x_2^\beta, \dots, x_{n-1}^\beta, T, P) \quad (9)$$

pode-se escrever n equações de equilíbrio com $2n$ variáveis intensivas (T , P e $n-1$ frações molares independentes em cada fase). Conseqüentemente a resolução das equações de equilíbrio para o equilíbrio líquido-líquido requer a especificação anterior dos valores numéricos de n das variáveis intensivas (SMITH et al., 2000).

Em um sistema multicomponente e multifásico, o número de variáveis necessárias que definem o estado de equilíbrio é determinado pela Regra de Fases de Gibbs, em que F pode ser alternativamente interpretado com o número de graus termodinâmicos de liberdade e definido como o número de parâmetros intensivos que podem ter uma variação independente (CALLEN, 1985).

$$F = 2 - \pi + n \quad (10)$$

em que π é o número de fases e n é o número de espécies químicas independentes que compõem o sistema. Em um sistema aquoso bifásico ($\pi = 2$), o número de variáveis a serem especificadas será igual ao número de espécies químicas independentes presentes no sistema.

As forças que governam a separação de fases são as interações entre segmentos de um polímero e de outras moléculas. Naturalmente, estas interações intermoleculares resultam na variação da energia livre de Gibbs, tendo assim, uma contribuição entálpica, bem como uma contribuição entrópica (BROOKS e SHARP, 1985). De acordo com a termodinâmica, a mistura de dois componentes formará uma solução se a variação da energia livre de Gibbs de mistura (ΔG_{mix}) for negativa; caso contrário, o sistema separará em duas fases.

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} < 0 \quad (11)$$

em que, ΔH_{mix} e ΔS_{mix} são a entalpia e a entropia de mistura, respectivamente, e T é a temperatura absoluta (ZASLAVSKY, 1995). A energia livre de Gibbs de mistura é a diferença entre a energia livre de Gibbs da solução e o somatório da energia livre de Gibbs dos componentes puros no estado líquido.

$$\Delta G_{mix} = G_{sol} - \sum G_i^* \quad (12)$$

Para que o sistema seja homogêneo a energia livre de Gibbs de solução deverá ser menor que a energia livre de Gibbs dos componentes no estado puro. A energia livre de Gibbs dos componentes puros está relacionada à energia necessária para romper a interação solvente-solvente, soluto-soluto, enquanto a energia livre de Gibbs de solução está relacionada à interação soluto-soluto (NASCIMENTO, 2003).

Até que as duas fases entrem em equilíbrio, o processo de separação de fases, sob a ação da gravidade, é extremamente complexo. A velocidade de separação dependerá da diferença de densidade entre as fases, da viscosidade e da tensão superficial na interface que, por sua vez, depende da composição do sistema (BROOKS e SHARP, 1985).

1.2 Sistemas Aquosos Bifásicos

O uso de soluções aquosas e solventes orgânicos na extração líquido-líquido convencional não é adequado para separar compostos de origem biológica como proteínas e células, pois a estabilidade destas é baixa em solventes orgânicos. Uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a partição em sistemas aquosos bifásicos, a qual vem sendo usada com sucesso no isolamento de proteínas e de outros biocompostos (COIMBRA et al., 2003).

Beijerinck, em 1896, observou a formação de duas fases líquidas, ao misturar soluções aquosas de gelatina e agar, ou gelatina e amido solúvel. A fase inferior tornou-se rica em agar (ou amido) e a fase superior rica em gelatina. Ostwald e Hertel, em estudos posteriores, verificaram que para variadas fontes de amido diferentes concentrações eram necessárias para a separação de fases. Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram a miscibilidade de pares de polímeros solúveis em água ou em solventes orgânicos e a ocorrência ou não de separação de fases (ALBERTSSON, 1960).

Em relação às técnicas tradicionais, os sistemas aquosos bifásicos são vantajosos e, por isso, têm sido aplicados com sucesso na separação e purificação de macromoléculas e partículas celulares. Apresentam boa resolução, alto rendimento e baixo custo. Adicionalmente, o alto conteúdo de

água de ambas as fases (80-90 %) implica em alta biocompatibilidade e baixa tensão interfacial, minimizando a degradação das biomoléculas (JOHANSSON, 1998, SALABAT, 2001 e GÜNDUZ, 2004). Permitem fácil aumento de escala e a reciclagem dos reagentes que formam as fases (REH et al., 2002).

Os sistemas aquosos bifásicos são formados pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal acima de certas concentrações. Uma das fases é rica em polímero e a outra fase é rica no outro polímero ou sal (SHANG et al., 2004). Em ambos os casos, duas fases líquidas são formadas e diversos solutos, como macromoléculas biológicas, podem ser distribuídas desigualmente em cada fase (GRABER et al., 2000).

As fases são regiões que possuem propriedades termodinâmicas intensivas diferentes, como densidade, índice de refração, pressão, temperatura e composição. Mas, como as duas fases dos SAB estão em equilíbrio, nenhuma propriedade termodinâmica está variando em uma dimensão temporal, ou ainda, não há troca resultante de matéria entre as fases. Estas fases estão separadas por uma interface que é a região na qual as propriedades termodinâmicas intensivas de cada fase transitam para valores diferentes, sempre tendendo para o valor daquela propriedade no seio da outra fase em equilíbrio (CARVALHO, 2004).

Existem dois tipos principais de sistemas aquosos bifásicos, os formados por dois polímeros e os que contêm apenas um polímero. Na Tabela 1, encontram-se alguns exemplos de sistemas aquosos bifásicos.

O sistema polímero-polímero mais comum é composto de dextrana e PEG, mas a dextrana é de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em larga escala. Os sistemas PEG + sais são atrativos devido ao baixo custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em altas concentrações de sais (SILVA e MEIRELLES, 2000).

Tabela 1 - Exemplos de Sistemas Aquosos Bifásicos.

Polímero	Polímero
Polipropilenoglicol	Polietilenoglicol (PEG) Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA) Maltodextrina (MD)
Polietilenoglicol	Dextrana (Dx) Ficoll Hidroxiopropil-amido (HPS) Polivinil álcool (PVA) Polivinil pirrolidona (PVP) Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietilenoglicol e copolímeros	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4
Poli etilenoglicol	Glicose, maltose
Polipropilenoglicol	K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Glicerol

Fonte: CARVALHO, 2004.

1.3 Aplicações dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Os SABs vêm sendo empregados com muito sucesso na separação de diversas biomoléculas. Encontram-se na literatura diversos trabalhos que evidenciam o seu potencial de aplicação a nível industrial e que auxiliam a identificar os sistemas mais adequados à separação de certas biomoléculas, como exemplificado na Tabela 2.

Tabela 2 - Aplicações de Sistemas Aquosos Bifásicos

Biomolécula	SAB
BSA e ovalbumina	PEG - Dex
Endopoligalacturonase	PEG - polivinil álcool
Amiloglucosidase	PEG - Na_2SO_4
β -galactosidase, lisozima	PEG - Dex
α -la, β -lg	PEG - FFP
<i>Escherichia coli</i>	PEG - FFP
Álcool desidrogenase	PEG - HPS
BSA	PEG - goma guar
Ácido láctico	EOPO - Dex
Lignina	PEG - K_2CO_3 , NH_4SO_4
α -amilase	PEG - MgSO_4
β -lg, BSA, caseína	Dex - goma guar
Glutenina	PEG - Dex
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	PEG - MD
Lisina, glisina	PEG - Dex

Fonte: COIMBRA et al., 2003.

ANTOV (2004) utilizou o sistema polietilenoglicol (PEG) 4000 + dextrana para extração de pectinase. Xilose redutase foi purificada em um sistema PEG + sais de fosfato, conforme relatado por MAYCRHOFF (2004). GÜNDÜZ (2004) empregou o sistema PEG + gel dextrana na obtenção de albumina de soro bovino (BSA). REH et al (2002), estudaram a purificação da alfa-1-antitripsina do plasma humano em SABs, verificando a viabilidade e potencialidade desta técnica.

Os SABs têm sido usados por mais de 30 anos na concentração e purificação de proteínas e na bioconversão extrativa de proteínas (MA et al., 2005). Esta técnica de separação vem sendo aplicada em outros segmentos como no tratamento de efluentes industriais e na indústria de papel e celulose (WAZIRI et al., 2003). São também utilizados na remoção de íons metálicos (GRABER et al., 2000), compostos aromáticos de óleo cru (WAZIRI et al., 2003) e poluentes orgânicos do meio ambiente (ROGERS et al., 1998).

O maior uso dos sistemas aquosos bifásicos tem sido na etapa de concentração e no processo de purificação de proteínas. Algumas das biomoléculas, já extraídas em escala piloto mediante esta técnica, são relacionadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Biomoléculas extraídas com o uso de SABs

Biomolécula	Sistema
Pululanase	PEG-Dex
Formaldeído desidrogenase	PEG-Dex
Fumarase	PEG-FFP
β – galactosidase	PEG-FFP
α - glucosidase	PEG-FFP
Superóxido dismutase	PEG-FFP
Lactato desidrogenase	PEG-aquafase

Fonte: Coimbra et al, 2003.

1.4 Diagramas de Equilíbrio de Fases

Os dados de equilíbrio de fases dos SABs podem ser representados em diagramas de equilíbrio, em uma temperatura e pressão fixas. Os diagramas de equilíbrio, ou diagramas de fase, representam graficamente a composição dos constituintes do sistema, presentes em certas concentrações, na qual ocorre a separação de fases. Podem ser apresentados no sistema de coordenadas

triangulares (Figura 1(a)) e retangulares (Figura 1(b)), sendo a concentração do solvente omitida neste último.

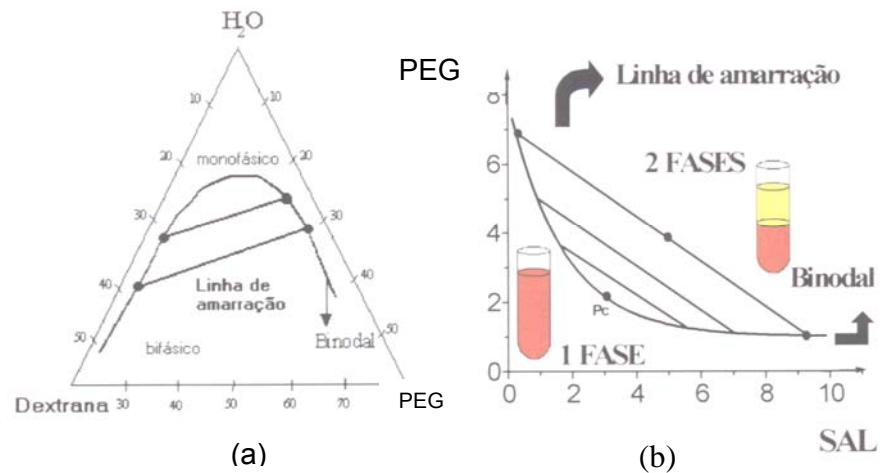


Figura 1. Diagramas de fase expresso em coordenadas triangulares (a) e retangulares (b) (NASCIMENTO et al., 2003).

A obtenção dos dados de equilíbrio e das propriedades dos sistemas de fases é necessária para o desenvolvimento de processos de extração. Os dados dos diagramas de fase são também necessários para o desenvolvimento de modelos que possam prever a partição entre as fases (SNYDER et al., 1992, GRABER et al., 2004, HAGHTALAB e MOKHTARANI, 2004).

A Figura 2 apresenta um diagrama de fases típico de um sistema aquoso bifásico polímero + polímero. A concentração de um dos componentes é representada no eixo horizontal, e o teor do outro componente, no eixo vertical. A quantidade de água (ou do terceiro componente) é calculada por diferença.

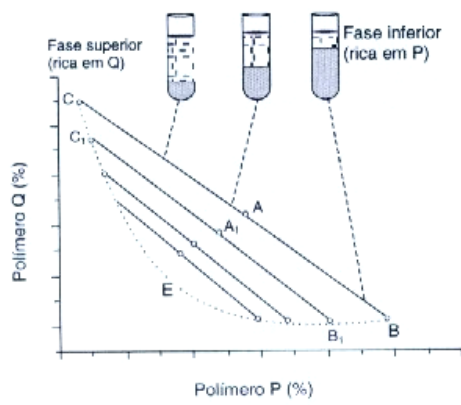


Figura 2. Diagrama de fases de um sistema polímero-polímero (COIMBRA et al., 2003).

A curva CEB, que divide a região bifásica da região monofásica, é denominada curva binodal ou curva de equilíbrio. Na região acima da curva binodal há formação de duas fases (região bifásica), e abaixo dela a mistura é totalmente miscível (região monofásica). Supondo que o ponto A represente a composição de uma solução aquosa contendo os polímeros P e Q, após o equilíbrio termodinâmico ter sido atingido, as composições das fases resultantes serão representadas pelos pontos B e C (COIMBRA et al., 2003).

Deve ser notado que misturas de diferentes composições globais representadas por diferentes pontos na mesma linha de amarração originam sistemas bifásicos com composições idênticas, porém com diferentes volumes das fases coexistentes (ZASLAVSKY, 1995).

Ao particionar um material num dado sistema aquoso bifásico, em diferentes composições globais do sistema, é conveniente usar uma medida numérica simples das composições das duas fases entre as quais este sistema é particionado. Esta medida foi determinada empiricamente como sendo o comprimento da linha de amarração (TLL), que pode ser calculado a partir das concentrações das fases coexistentes, segundo a Eq 13 (ZASLAVSKY, 1995):

$$TLL = \left\{ [C(P)_1 - C(P)_2]^2 + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^2 \right\}^{0.5} = \left\{ [\Delta C(P)]^2 + [\Delta C(Q)]^2 \right\}^{0.5} \quad (13)$$

em que $C(P)$ é a concentração de um polímero P numa dada fase, $C(Q)$ é a concentração de um polímero Q (ou sal) numa dada fase, os subscritos 1 e 2 referem-se às fases coexistentes, $\Delta C(P)$ e $\Delta C(Q)$ são as diferenças nas concentrações do componente P ou Q, respectivamente, entre as duas fases.

De acordo com ZASLAVSKY (1995), outra grandeza representativa de um diagrama de fase é a inclinação da linha de amarração (STL), dada pela Eq 14:

$$STL = \Delta C(P) / \Delta C(Q) \quad (14)$$

a qual permite inferir a proporção de compostos a serem usados na formação de duas fases (COIMBRA et al., 2003).

Dados das composições e propriedades dos sistemas aquosos bifásicos são necessários para o projeto de processos de extração e para o

desenvolvimento de modelos termodinâmicos de transferência de massa e aplicáveis na extração líquido-líquido. Adicionalmente, dados de diagramas de fases são também necessários para viabilizar a predição da partição das moléculas entre as fases (SNYDER et al., 1992; SÉ e AZNAR, 2002; GRABER et al., 2004).

1.5 Determinação Experimental das Curvas Binodais

De acordo com ALBERTSSON (1960), existem duas maneiras para a determinação experimental das binodais:

1. Colocam-se em um tubo de teste algumas gramas de uma solução concentrada de um polímero (P). Adiciona-se, gota a gota, uma solução de concentração conhecida de um outro polímero Q. Inicialmente, obtém-se uma mistura homogênea, mas, após a adição de certa quantidade do polímero Q, uma gota adicional causará turvação e o surgimento de um sistema bifásico. A composição da mistura é anotada. A adição de um grama de água torna o sistema límpido novamente. Adiciona-se novamente a solução do polímero Q, até que novamente o sistema forme duas fases e fique turvo. A composição é novamente anotada e água é adicionada para que o sistema se torne monofásico, e assim sucessivamente. Desta maneira, obtém-se uma série de composições, próximas à binodal. Este primeiro método pode ser também realizado para sistemas salinos, sendo a única diferença a utilização de um sal no lugar de um dos polímeros.
2. Outra maneira, para a determinação de binodais é através da medida das composições de fases de sistemas. A curva binodal é então desenhada através dos pontos que representam estas composições. As linhas de amarração são obtidas pela análise da composição de cada fase.

1.6 Efeito da Temperatura sobre o Equilíbrio de Fases

Segundo CARVALHO (2004), o efeito da temperatura sobre o equilíbrio de fases é analisado quanto às propriedades termodinâmicas entalpia e entropia.

Para a análise entálpica deste processo, deve-se inicialmente considerar o efeito da temperatura na constante de equilíbrio (K) da reação de formação da interação sal - PEG após a saturação do polímero (Eq 15). Segundo DA SILVA e LOH (2000), a interação entre os íons do sal e o polímero, na formação do SAB, ocorre com absorção de energia, ou seja, esta interação é endotérmica. Assim, o aumento da temperatura favorece a formação dos produtos e aumenta a intensidade da interação entre o PEG e o sal.



em que
$$K = \frac{[sal - PEG]}{[sal][PEG]}$$

Desta forma, o favorecimento da interação entre o PEG e o sal levaria ao aumento na quantidade de sal a ser adicionado ao sistema para que ocorresse a formação do sistema aquoso bifásico. Entretanto, o aumento da temperatura leva à diminuição da quantidade de sal e, conseqüentemente ao aumento da região bifásica do diagrama de equilíbrio. Assim, deve-se analisar a influência da temperatura quanto à entropia.

Quando a energia na forma de calor é fornecida ao sistema e sua temperatura aumenta, a energia interna aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas. Deste modo, as moléculas estão mais livres para se movimentarem na solução, aumentando também a sua entropia configuracional. Ao mesmo tempo, a entropia conformacional do polímero aumenta, pois o aumento da temperatura provoca o enovelamento da cadeia do polietilenoglicol. Isto ocorre devido à transição das ligações carbono-carbono da forma TRANS (caracterizada pela conformação linear da macromolécula em decorrência das suas interações com as moléculas de água) para a forma CIS (enovelada) diminuindo o número de sítios ativos disponíveis para as interações com os íons do sal. Desta forma, a quantidade

de sal necessária à saturação energética da cadeia do polímero e, conseqüentemente, à formação do sistema aquoso bifásico diminui, deslocando a curva binodal para regiões mais próximas aos eixos do diagrama de equilíbrio.

SÉ e AZNAR (2002) estudando o efeito da temperatura em sistemas PEG 4000 + fosfato de potássio + água, entre (10 e 30) °C verificaram que a elevação da temperatura aumentou tanto a inclinação quanto o comprimento das linhas de amarração. Resultados semelhantes foram obtidos por MISHIMA et al. (1995), ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2004) e MURUGESAN e PERUMALSAMY (2005). De acordo com ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2001), esse efeito ocorre porque as composições das fases no equilíbrio mudam com a variação de temperatura. O seu aumento em sistemas bifásicos PEG + sal causa um aumento da concentração de PEG na fase superior e uma diminuição da concentração de sal na fase inferior. A atração entre as moléculas de PEG aumenta com o aumento da temperatura, enquanto a interação entre as moléculas de PEG e as moléculas de água diminui. Em outras palavras, as moléculas de PEG tornam-se mais hidrofóbicas com o aumento da temperatura, e conseqüentemente as moléculas de PEG podem ser dissolvidas no mesmo número de moles de água.

Em sistemas PEG + Na₂SO₄, HO-GUTIERREZ et al. (1994) observaram um discreto aumento na região bifásica com o aumento da temperatura.

GRABER et al. (2004) estudaram o efeito das temperaturas de 5°C, 25°C e 45°C em sistemas PEG 4000 + sulfato de lítio + água, concluindo que o aumento da temperatura provocou o deslocamento da curva binodal aumentando a região bifásica, o que implica numa menor concentração do sal e do polímero necessárias para a formação dos sistemas aquosos bifásicos.

ZAFARANI-MOATTAR e GASEMI (2002) investigaram a influência da temperatura (25, 35 e 45) °C em sistemas aquosos PEG 6000 + (NH₄)₂HPO₄ e PEG 6000 + NH₄H₂PO₄, verificando também uma expansão da área bifásica com o aumento da temperatura. Conclusão semelhante foi obtida nos trabalhos de ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2001), para sistemas PEG 6000 + Na₂HPO₄ e PEG 6000 + NaH₂PO₄ e por VOROS et al. (1993), em sistemas PEG 2000 + Na₂CO₃.

Em alguns sistemas PEG + sal, o efeito da temperatura nas binodais apresentou algumas diferenças. ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2001)

verificaram o efeito do cruzamento das binodais nos sistemas PEG + NaH₂PO₄ e PEG + Na₂HPO₄ a diferentes temperaturas. Nesses sistemas, ocorre a expansão da região monofásica na região rica em PEG com o aumento da temperatura, enquanto que para a região rica em sal, o mesmo aumento provoca a expansão da região bifásica.

Outro efeito investigado nos sistemas PEG + sal é o efeito de inversão de fases. A elevação da temperatura faz com que a fase rica em PEG (fase superior), que é menos densa em temperaturas baixas, se torne a fase superior. Estudos recentes de ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2004) em sistemas PVP + Na₂HPO₄ e PVP + Na₃PO₄ mostram o efeito desta inversão de fases.

1.7 Efeito do Tipo de Sal sobre o Equilíbrio de Fases

Albertsson observou que a separação de fases em misturas contendo polieletrólitos depende fortemente da força iônica e do tipo de íon presente no sistema. Mais especificamente, verificou que a concentração de PEG necessária à separação de fases no sistema PEG + sulfato de dextrana + água, adicionado de sais, dependia do tipo de sal usado. E ainda, que se uma quantidade suficiente de sal fosse adicionada, não era necessário incorporar PEG ao sistema para que ocorresse a separação das fases. Desta forma, surgiram os primeiros sistemas aquosos bifásicos do tipo polímero + sal + água (CARVALHO, 2004).

ANANTHAPADMANABHAN e GODDARD (1987) estudaram sistemas formados por PEG 3350 e diferentes ânions em sais de sódio ou diferentes metais em sais de sulfato, concluindo que em relação à indução para formação de sistemas aquosos bifásicos os ânions dos sais de sódio são classificados na ordem decrescente: PO₄⁻³ > C₆H₅O₇⁻³ > SO₄⁻² > CO₃⁻² > OH⁻. Em relação à tendência da formação de sistemas dos sais de sulfato, a seguinte ordem decrescente foi estabelecida: Al > Na > Mg > Fe > Zn > NH₄ > Li.

ZAFARANI-MOATTAR e GASEMI (2002) verificaram em sistemas PEG + Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ e Na₃PO₄ que o aumento da região bifásica aumenta com a diminuição do tamanho do cátion.

Este comportamento pode ser analisado considerando dois cátions (ou dois ânions) da mesma valência. Considerando dois íons de diferentes raios e,

portanto diferentes densidades de carga, o íon de menor raio (e maior densidade de carga) irá interagir com o PEG em maior proporção, favorecendo a interação entre o PEG e o sal, resultando na maior quantidade de sal necessária à saturação da cadeia do polímero e na diminuição da região bifásica (CARVALHO, 2004).

ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2001) investigaram o efeito do tipo de sal nas curvas binodais em sistemas aquosos contendo PEG 6000 e os sais NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e Na_3PO_4 . Para o mesmo cátion (Na^+), foi verificado que o aumento da carga do ânion de $-1(\text{H}_2\text{PO}_4^-)$ para $-3(\text{PO}_4^{3-})$ diminuiu a concentração de sal necessária para a separação de fases. Analisaram também as curvas binodais dos sais NaH_2PO_4 e NaHSO_4 concluindo que há um aumento na tendência de formação de fases do NaHSO_4 para o NaH_2PO_4 , sendo a mesma justificada pela menor solubilidade em água do NaH_2PO_4 .

Recentemente, ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2005) verificaram o efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio de fases em sistemas aquosos PVP + Na_2HPO_4 e PVP + Na_3PO_4 , com resultados semelhantes aos dos sistemas PEG e os sais NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 e Na_3PO_4 , anteriormente mencionados. Ânions de maior valência são melhores agentes salting-out, uma vez que hidratam mais água, diminuindo a quantidade de água disponível para a hidratação do PVP. Também constataram o aumento da inclinação das linhas de amarração com o aumento da carga do ânion. Tal efeito se deve à maior capacidade de hidratação dos ânions de maior valência sobre os de valência menor.

1.8 Efeito da Massa Molar do Polímero sobre o Equilíbrio de Fases

No que se a massa molar do polímero, quanto maior a massa molar dos polímeros, menor a concentração requerida para a separação de fases, e ainda, quanto maior a diferença no tamanho molecular entre os dois polímeros, mais assimétrica é a binodal (ALBERTSSON, 1960).

TUBÍO et al (2006), verificaram em sistemas aquosos compostos por citrato de sódio + PEGs de diferentes massas molares, pH 9,2 e a 22°C, que as curvas binodais se tornaram assimétricas e mais próximas da origem com o aumento da massa molecular do PEG, e conseqüentemente menores

concentrações de PEG eram necessárias para que ocorresse a separação de fases.

ZAFARANI-MOATTAR e SADEGHI (2001) analisaram o efeito da massa molar do PEG nas curvas binodais para o sistema PEG + NaH₂PO₄ + água, a 25 °C, constatando que o aumento da massa molar do PEG provocou o deslocamento das curvas binodais para menores concentrações de PEG e sal. Resultados semelhantes também foram obtidos por VOROS et al (1993) para sistemas aquosos contendo polietilenoglicol e sais. Este efeito ocorre devido à diminuição da solubilidade do PEG em água, conforme aumenta a massa molar do PEG. Em outras palavras, o aumento da incompatibilidade entre os componentes do sistema é causado devido ao caráter mais hidrofóbico de PEGs de maior massa molar.

1.9 Componentes dos Sistemas Aquosos Bifásicos

1.9.1 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol, HO-(CH₂-CH₂-O)_n-H, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico e juntamente com outros polímeros sintéticos, constitui a base para as indústrias de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRELL e JENKINS, 1994).

Devido ao seu caráter atóxico, pode também ser utilizado em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. É empregado na separação de macromoléculas biológicas por meio da extração líquido-líquido e da precipitação. Pode ser considerado o melhor agente precipitante na produção de cristais de proteínas, etapa fundamental na determinação da estrutura molecular das mesmas (ANNUNZIATA et al., 2002).

A maioria dos polímeros sintéticos é composta por moléculas que contêm centenas ou milhares de grupos de átomos interligados chamados de unidades. A macromolécula de PEG é formada por apenas um tipo de unidade repetida e por isto é chamado de homopolímero. Quando esta é formada por mais de um tipo de unidade repetida é chamada de copolímero. Em seu estado cristalino, a cadeia de poli (óxido de etileno) apresenta conformação helicoidal

contendo sete unidades químicas (-CH₂CH₂-O-) e duas rotações em torno da cadeia a cada 19,3 Å (MURRELL e JENKINS, 1994).

1.9.2 Sulfato de Zinco, Sulfato de Cobre e Citrato de Sódio

O zinco ocorre na crosta terrestre na proporção de 132 mg.L⁻¹, em peso. É o vigésimo quarto elemento mais abundante. É usado em grandes quantidades para revestir objetos de ferro e evitar a corrosão. Os minérios de zinco (principalmente ZnS) podem ser aquecidos ao ar, para formarem ZnO e ZnSO₄ (LEE, 1999).

O cobre é moderadamente abundante, sendo o vigésimo quinto elemento mais abundante, em peso, na crosta terrestre. Ocorre na proporção de 68 mg.L⁻¹, em peso (LEE, 1999).

O sulfato de cobre forma cristais azuis de sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) perdem água acima de 150 °C e formam um pó branco anidro (CuSO₄). Ao se adicionar água, readquire a cor azul; e, de fato, o sulfato de cobre anidro tem uma atração forte pela água que tem usualmente uma cor azul-clara pela reação com a água do ar (ATKINS, 2001).

O citrato de sódio é um sal de sódio proveniente do ácido cítrico. À temperatura ambiente se apresenta como um sólido branco e inodoro. Possui densidade de 1,76 g.cm⁻³ e um valor de solubilidade, a 25°C, igual a 425g.L⁻¹ (WIKIPEDIA, 2006). É utilizado na indústria alimentícia, como seqüestrante e anticoagulante de queijos, na indústria farmacêutica como coagulante de sangue, em soluções de glicose, em fotografias, etc.. (ROSSETTI, 2006).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Processos de Separação (LPS) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa – MG.

Reagentes e Equipamentos

REAGENTES

- Polímero polietilenoglicol 1500 g.mol⁻¹ – ISOFAR, Brasil

- Polímero polietilenoglicol 4000 g.mol⁻¹ – ISOFAR, Brasil
- Sulfato de cobre – Anidro P.A. – NUCLEAR, Brasil
- Sulfato de zinco monohidratado P. A. – VETEC, Brasil
- Citrato de sódio tribásico dihidratado P.A. – VETEC, Brasil

Equipamentos

- Agitadores magnéticos – Fisaton, Brasil
- Balança analítica – Denver M-310, EUA
- Banho termostático – TECNAL, TE-184, Brasil
- Banho termostático - ThermoHAAKE B3, Alemanha
- Centrífuga – Eppendorf 5804, Alemanha
- Espectrofotômetro de absorção atômica – Varian SpectrAA – 200, Austrália
- Fotômetro de chama – FC-180, CELM, Brasil
- Liofilizador – Freezone 4.5, LABCONCO, EUA
- Refratômetro – Analytic Jena AG Abbe refractometer 09-2001, Alemanha
- Purificador de água - Milli Q System, Millipore, EUA

2.2 Preparo dos Sistemas Aquosos Bifásicos

2.2.1 Sistema PEG 4000 + Sulfato de zinco + Água

Os diagramas de equilíbrio contendo polietilenoglicol 4000, sulfato de zinco e água, foram obtidos nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C. As curvas binodais para estes sistemas foram obtidas mediante a técnica turbidimétrica, segundo metodologia de Albertsson (1960), nas temperaturas de estudo. Soluções estoque de PEG na faixa de 50 % a 60 % em massa e de sulfato de zinco a 30 % em massa foram utilizadas nos experimentos, sendo agitadas magneticamente durante uma hora. Cada sistema aquoso bifásico era composto de cinco linhas de amarração em tubos de centrífuga com tampa. Quantidades adequadas de PEG, sulfato de zinco e água foram pesadas em balança analítica até que se alcançasse uma massa final de 40 g. Por exemplo,

um sistema, a 35°C, contendo PEG 4000 a 53 % em massa, sulfato de zinco a 30 % em massa e pH = 3,66 foi preparado da seguinte forma: pesou-se em um tubo aproximadamente 22,04 g da solução de PEG 4000 previamente preparada, 7,20 g da solução de sulfato de zinco também previamente preparada e água destilada e deionizada, até que se atingiu uma massa final de 40 g. Os tubos foram inicialmente agitados manual e vigorosamente, para que todos os reagentes se misturassem. Em seguida, foram centrifugados a 720 g por 20 min e deixados em repouso, em banho termostático a 35°C, por 24 h, para que o equilíbrio fosse atingido. As massas foram cuidadosamente anotadas para que pudesse ser realizado o balanço de massa das fases e dos componentes do sistema.

2.2.2 Sistema PEG 4000 + Sulfato de cobre + Água

Os sistemas compostos por PEG 4000, sulfato de cobre e água, foram preparados nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C, segundo metodologia descrita por Albertsson (1960). Soluções estoque de PEG 4000 a 50 % em massa e de sulfato de cobre a 18 % em massa, pH = 2,73, foram utilizadas no preparo dos sistemas, sendo agitadas magneticamente por aproximadamente 1 h. Os pontos globais para este sistema foram determinados empiricamente. Definidos estes pontos, os sistemas foram preparados, medindo-se quantidades apropriadas de PEG, sal e água em balança analítica, até que se completasse uma massa de 40 g em cada tubo de centrífuga. Depois de agitar a mistura manualmente, esta foi centrifugada por 20 min a 720 g para acelerar a separação de fases. Os tubos foram subsequentemente colocados na temperatura desejada em banho termostático e mantidos em repouso por 24 h. As massas foram cuidadosamente anotadas para que pudesse ser realizado o balanço de massa das fases e dos componentes do sistema.

2.2.3 Sistemas PEG (1500 ou 4000) + Citrato de sódio + Água

As composições para os sistemas formados por PEG, citrato de sódio e água foram as obtidas por CARVALHO, (2004). A metodologia de preparo dos sistemas seguida baseia-se nos estudos de Albertsson, (1960). Foram

determinados dados de equilíbrio para sistemas PEG 1500 + citrato de sódio + água nas temperaturas de (10, 35 e 45) °C, e para o sistema PEG 4000 + citrato de sódio + água nas temperaturas de (5, 10, 25, 35 e 45) °C. Independentemente da massa molar do polietilenoglicol, os sistemas foram obtidos pela mistura de solução estoque de PEG a 50 % em massa, citrato de sódio e água, também em tubos de centrífuga para se obter uma massa total de sistema de 40 g. Os tubos foram agitados manual e vigorosamente, centrifugados por 20 min a 720 *g* e colocados em banho termostático, e mantidos em repouso na temperatura desejada por 24 h. Procedia-se então à coleta das fases. As massas foram cuidadosamente anotadas para que pudesse ser realizado o balanço de massa das fases e dos componentes do sistema.

2.3 Coleta das Fases

Depois de ser alcançado o equilíbrio, as fases foram coletadas para a análise dos componentes, utilizando-se seringas com agulhas longas. As fases superiores foram retiradas primeiramente, com o cuidado de deixar uma camada de 0,5 cm desta fase acima da interface. Introduziu-se com cuidado uma seringa para a retirada da fase inferior no tubo evitando a perturbação da interface, e esperando 1 h para a coleta da fase inferior. Uma pequena bolha de ar foi deixada na seringa e expelida antes da retirada da fase inferior. As fases foram então armazenadas apropriadamente sob refrigeração para sua posterior análise e construção dos diagramas.

2.4 Densidade

O método utilizado para cálculo da densidade foi o método do picnômetro. Inicialmente, foi registrada a temperatura ambiente para que se pudesse conhecer a densidade da água na mesma temperatura, dado utilizado na calibração do picnômetro. Este foi pesado vazio e seco e, em seguida, com água destilada e deionizada. De posse desses dados, o volume do picnômetro era calibrado, segundo a Eq16:

$$V = \frac{m_{pic1} - m_{pic}}{\rho_{H_2O}} \quad (16)$$

em que, m_{pic1} e m_{pic} correspondem respectivamente, à massa do picnômetro com água e à massa do picnômetro vazio. O termo ρ_{H_2O} corresponde à densidade da água na temperatura ambiente.

Após a calibração do picnômetro, alíquotas de 10 mL das fases superiores e inferiores foram transferidas para o picnômetro, imediatamente após a coleta, para que se obtivesse o peso do picnômetro com a amostra da fase. Finalmente, calculava-se a densidade de cada uma das fases, através da seguinte equação:

$$\rho_{fases} = \frac{m_{pic2} - m_{pic}}{V} \quad (17)$$

em que, m_{pic2} refere-se à massa do picnômetro com a amostra.

2.5 Medida do Volume das Fases

Os tubos de centrifuga utilizados foram inicialmente calibrados. Para tanto, foram construídas curvas analíticas em função do volume de água e da altura da coluna de água em cada tubo, utilizando-se a Eq 18:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad (18)$$

A altura das fases foi medida com régua antes da coleta das alíquotas das fases e o volume pôde ser calculado. Mediu-se a altura total das fases que correspondia a altura do fundo do tubo até a superfície da fase inferior, e a altura da fase inferior que era medida do fundo do tubo até a interface. A altura da fase superior foi obtida pela diferença entre a altura total e a altura da fase inferior.

2.6 Quantificação do Sulfato de Cobre e Sulfato de Zinco

As concentrações de sulfato de cobre e sulfato de zinco, nas fases dos sistemas aquosos bifásicos, foram determinadas pela quantificação do teor dos cátions zinco e cobre, via espectrofotometria de absorção atômica. A análise foi feita mediante diluição adequada de amostras das fases superiores e inferiores em triplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.7 Quantificação do Citrato de Sódio

Para o citrato de sódio, o método de quantificação utilizado foi a fotometria de chama. A determinação foi feita de maneira indireta, pela quantificação do teor do cátion sódio. Antes da análise, foi construída uma curva analítica para o sódio, que foi previamente seco em estufa por 2 h a 105°C. A curva foi preparada com soluções de 1 a 5 mg.L⁻¹, enquanto as fases foram diluídas de modo que a concentração estivesse dentro da faixa de calibração. Cada fase foi analisada em duplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.8 Polietilenoglicol (PEG)

A concentração de PEG foi determinada através de medidas do índice de refração das fases superior e inferior, a 30 °C. Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas com concentrações conhecidas de sal e PEG para a construção da curva analítica. A concentração do PEG foi obtida subtraindo-se o valor da concentração fornecido pelo índice de refração (concentração total) do valor da concentração do sal, fornecida pela absorção atômica. A análise para este componente foi feita em triplicata, sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

2.9 Quantificação de Água

A quantidade de água presente nas fases foi determinada através da técnica de liofilização. Alíquotas de aproximadamente 0,5 g foram retiradas de cada fase e transferidas para vidros previamente pesados. As amostras foram congeladas e secas no liofilizador à temperatura de -52°C por 24 h. Após a secagem, os vidros foram pesados para a determinação da diferença de massa a qual correspondente à água evaporada. As análises foram realizadas em duplicata sendo posteriormente determinado o desvio padrão.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albertsson, P. A. *Partition of cell particles and macromolecules*, 3rd Ed; John Wiley & Sons, 1960.

Alves, J. G. L. F., Chumpitaz, L. D. A., Silva L. H. M., Franco, T. T., Meirelles, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 743, 235-239.

Ananthapadmanabhan. P., Goddard, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. *Langmuir*, **1987**, 3, 25-31.

Annunziata, O.; Lomakin, A.; Pande, J.; Ogun, O.; Benedek, G. B. Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions. *Biophysics*, **2002**, 99 (22), 14165-14170.

Antov, M. G. Partitioning of pectinase produced by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system polyethylene glycol 4000/crude dextran at different initial values. *Carbohydrate Polymers*, **2004**, 56, 295-300.

Atkins, P.; Jones, L. *Princípios de química*. Trad. Ignez Caracelli, et al. Porto Alegre: Bookman, 2001.

Brooks, D. E.; Sharp, K. A. *Theoretical aspects of partitioning*. In: Partitioning in aqueous two-phase systems. Academic Press, London, vol. 2, 1985.

Cabezas, H. *Theory of phase formation in aqueous two-phase systems*. *J. Chromatogr. B*, **1996**, 680, 3-30.

Callen, H. B. *Thermodynamics and an introduction to thermostatistics*. 3rd Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1985.

Carvalho, C. P. Estudo do equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Dissertação de tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. UFV, 2004. 70 f.: il.

Coimbra, J. S. R.; Giraldo-Zuñiga, A. D.; Minim, L. A.; Meirelles, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido. Cadernos didáticos, 95. Viçosa: UFV, 2003. 43 p.il.

Da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. R.; Meirelles, A. J. A. Equilibrium phase behavior of poly (ethylene glycol) + potassium phosphate + water two-phase systems at various pH and temperatures. *J. Chem Eng Data*, **1997**, *42*, 398-401.

Graber, T. A., Taboada, M. E., Cartón, A., Bolado S. Liquid-liquid equilibrium of the Poly(ethylene glycol) + Nitrate + Water system at 298.15 K. *J. Chem Eng Data*, **2000**, *45*, 182-184.

Graber, T. A., Gálvez, M. E., Galequillos, H. R., Benedí, J. A. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at different temperatures. Experimental determination and correlation. *J. Chem Eng Data*, **2004**, *49*, 1661-1664.

Gündüz, U.; Tolga, A. Optimization of bovine serum albumin sorption and recovery by hydrogels. *J. Chromatogr. B*, **2004**, *807*, 13-16.

Haghtalab, A., Moktarani, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). *Fluid Phase Equilib.*, **2004**, *215*, 151-161.

Hu, M., Zhais Q., Jiang, Y, Lihua, J., Liu, Z. Liquid-liquid and liquid-solid equilibrium in PEG + Cs_5SO_4 + H_2O . *J. Chem Eng Data*, **2004**, *49*, 1440-1443.

Huddleston, J. G., Willauer, H. D., Boaz K. R., Rogers, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. *J. Chromatogr. B*, **1998**, 711, p. 237-244.

Lee, J. D. *Química inorgânica não tão concisa*. Trad. da 5ª ed. Inglesa. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

Levine, I. N. *Physical chemistry*. 4th Ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

Ma, B., Hu, M., Li S., Jiang, Y, Liu, Z. Liquid-liquid phase equilibrium in the ternary system Poly (ethylene glycol) + Cs₂CO₃ + H₂O. *J. Chem Eng Data*, **2005**, 50, 792-795.

Maycrhoff, Z. D. L.; Roberto, I. C.; Franco, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem. Eng. J.* **2004**, 18, 217-223.

Mishima, K.; Nakatani, N.; Nomiyama, T.; Matsuyama, K.; Nagatani, M.; Nishikawa, H. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogenphosphate. *Fluid Phase Equilib.*, **1995**, 107 (2), 269-276.

Monteiro Filho, E. S. Determinação experimental e modelagem de equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos formados por polímeros, água e sacarídeos. Dissertação de tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. UFV, 2001. 86p. : il.

Murrell, J. N.; Jenkins, A. D. *Properties of Liquids and Solutions*, Second Edition. New York: J. Wiley, 1994.

Murugesan, T.; Perumalsamy, M. Liquid-liquid Equilibria of Poly (ethylene glycol) 2000 + Sodium Citrate + Water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. *J. Chem Eng Data*, **2005**, 50, 1392-1395.

Nascimento, K. S. Estudo do equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos bifásicos formados por copolímeros triblocos e sais de fosfato. Dissertação de tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. UFV, 2003. 76p. : il.

Reh, G.; Nerli, B.; Picó, G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *J. Chromatogr. B*, **2002**, *780*, 389-396.

Rogers, R. D., Willauer, H. D., Griffin, S. T., Huddleston, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. *J. Chromatogr. B*, **1998**, *711*, 255-263.

Rossetti, Home Page: <http://www.rossetti.eti.br/dicuser/detalhe.asp?vini=3&vfim=3&offset=150&vcodigo=971>, Acesso em: 28/06/2006, 2006.

Salabat, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. *Fluid Phase Equilibria*, **2001**, *187-188*, 489-498.

Sandler, S. I. *Chemical Engineering Thermodynamics*. 2th ed. New York: Wiley series in chemical engineering, 1989.

Sé, R. A. G.; Aznar, M. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + potassium phosphate at four temperatures: Experimental determination and thermodynamic modeling. *J. Chem Eng Data*, **2002**, *47*, 1401-1405.

Shang, Q. K.; Li, W.; Jia, Q.; Li, D. Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilib.*, **2004**, *219*, 195-203.

Silva, L. H. M.; Meirelles, A. J. A. Phase equilibrium in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*, **2000**, *42*, 273-278.

Smith, J. M.; Van Ness, H. C.; Abbott, M. M. *Introdução à termodinâmica da engenharia química*. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2000.

Snyder, S. M., Cole, K. D., Szlag, D. C. Phase compositions, viscosities, and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C. *J. Chem Eng Data*, **1992**, 37, 268-274.

Tubío G.; Pellegrini, L.; Nerli, B. B.; Pico, G. A. Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene glycols) of different Molecular Weight and Sodium Citrate. *J. Chem. Eng. Data*. **2005**, 50, 1392 - 1395

Voros, N.; Proust, P.; Fredenslund, A. Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib*, **1993**, 90, 333-353.

Waziri, S. M.; Abu-Sharkh, B. F.; Ali, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.*, **2003**, 205, 275-290.

Wikipedia, Home Page: <http://it.wikipedia.org/wiki/CitratodiSodio>, Acesso em: 28/03/2006, 2006.

Zafarani-Moattar, M.; Sadeghi, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.*, **2001**, 181, 95-112.

Zafarani-Moattar, M.; Gasemi, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib*, **2002**, 198, 281-291.

Zafarani-Moattar, M.; Sadeghi, R. Phase Behavior of Aqueous Two-Phase PEG + NaOH System at Different Temperatures. *J. Chem Eng Data*, **2004**, *49*, 297-300.

Zaslavsky, B. Y. *Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications*. New York, Marcel Dekker, 1995.

CAPÍTULO 2 - Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two-phase system containing polyethyleneglycol and zinc sulphate at different temperatures

Abstract

Liquid-liquid equilibrium data of an aqueous two-phase system composed by polyethyleneglycol 4000 + zinc sulphate at (5, 10, 35 and 45) °C were measured. The effect of temperature in the systems was studied, being observed an expansion of the two-phase area with the increase of temperature, and a small reduction from (35 to 45) °C in the biphasic region. The slope of all tie-lines increased with the temperature rise. Tie line lengths increased from (5 to 25) °C and from (35 to 45) °C, with a small reduction from (25 to 35) °C.

Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPS) are an important partition technique used for separation, purification and recovery of biological materials¹. These systems are formed by adding two chemically water soluble polymers to water, or a water soluble polymer and low molecular components, like inorganic salts, to water, promoting the system separation into two immiscible water rich phases.² Such systems present several advantages when compared to other separation techniques. They show good resolution, high yield, and relatively low material costs. In addition, ATPS are easily scaled up and allow the recycle of the reagents utilized in the process. Their high water content implies high biocompatibility and low interfacial tension, minimizing the degradation of biomolecules.^{3, 4} Snyder et al.⁵ have studied several phase diagrams and their properties for polyethyleneglycol (PEG) + salt systems. Ananthapadmanabhan⁶ conducted studies of aqueous two-phase formation of PEG and inorganic salts. The effect of temperature was investigated by Ho-Gutierrez et al.⁷ for PEG + Na₂SO₄ systems and by Zafarani-Moattar and Sadeghi⁸ for PEG + Na₂HPO₄ and PEG + NaH₂PO₄ systems. They observed that temperature increase caused an expansion in the two-phase area. The same effect was observed by

Zafarani-Moattar and Gasemi⁹ in PEG + NH₄H₂PO₄ and by Graber et al.¹⁰ in PEG + (NH₄)₂HPO₄ systems.

Liquid-liquid equilibrium data for PEG + zinc sulphate aqueous systems are scarce. For these systems there is a report from Zafarani-Moattar and Hamzehzadeh¹¹, which obtained binodal data for PEG 6000 + ZnSO₄ at 298.15 K. Another study was made by Hey et al.¹², who investigated the salting-out effect and the composition of PEG 8000 + ZnSO₄ system at 298.15 K. Therefore, this work was conducted to determine the effect of temperature for the liquid-liquid equilibrium of an aqueous two-phase system PEG 4000 + ZnSO₄ system at 5 °C, 10 °C, 35 °C and 45 °C. As far as we know, there is no report about phase diagrams for this kind of system.

Experimental Section

Materials. The reagents utilized include grade poly (ethylene) glycol PEG analytical with nominal molar mass of 4000 g.mol⁻¹ (ISOFAR, Brazil), and zinc sulphate with grade purity (VETEC, Brazil). The polymer and salt were used without further purification. Water previously distilled and deionized by a Milli-Q device (Millipore, USA) was used throughout the experiments.

Experimental Procedure. The concentrations of zinc sulphate in the top and bottom phases were quantified by zinc analysis using atomic absorption spectroscopy^{10, 12} (Varian Spectr AA-200, Australia). The concentration of PEG was determined from refractive index measurements at 30 °C using a refractometer (Analytic Jena AG Abbe refractometer 09-2001, Germany). Since the refractive index of the phase samples depends on the polymer and salt concentrations, polymer concentration was obtained by subtracting the salt concentration measured by spectrophotometry from the total solution composition. The water concentration was determined by freeze drying (Freezone 4.5 – LABCONCO, USA). Salt and PEG content measurements were performed in triplicate and water content measurements were performed in duplicate.

The binodal curves were determined by the titration method. A PEG solution with known concentration was taken into the vessel and titrated with a zinc sulphate solution, also presenting known concentration, and further mixed. The amount of salt solution was recorded as the mixture became turbid.

Subsequently, water was added until the solution became clear, and the mass of the mixture was recorded. The composition of each point on the binodal curve was obtained by mass using an analytical balance (Denver Instrument, M-310, USA), with a precision of ± 0.0001 g.

For the tie-line determination, stock solutions of polymer (with mass fraction between 0.50 and 0.60) and salt ($w = 0.30$, $\text{pH} = 3.66$) were initially prepared to make up the systems. Appropriate amounts of stock solutions of PEG 4000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, zinc sulphate and water were added into 50 cm^3 centrifuge tubes using an analytical balance. The mixture was manually stirred and centrifuged (Centrifuge Eppendorf 5804, Germany) at 720 g for 20 min , in order to accelerate the phase separation. The tubes were let to stand for 24 h at the desired temperature in a water bath (TECNAL, TE-184, Brazil) with a precision of $\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$. Samples were taken in triplicate from the top and bottom phases to determine its composition, using syringes and needles. After that, the top phase was carefully sampled leaving, approximately, 0.5 cm of this phase above the interface. Syringes with long needles were used to withdraw samples from the bottom phase. The densities of both phases were determined using an analytical balance and a standard volumetric pycnometer. The pycnometer (of 10.0 mL) was previously calibrated with water.^{13, 19}

Results and Discussion

The mean standard deviation in the salt mass by this method was equal to ± 0.0024 (expressed in mass fraction). The mean standard deviation in the polymer mass was of ± 0.0006 and in the water mass was of ± 0.0006 (expressed in mass fraction).

The effect of temperature from $(5\text{ to }45)\text{ }^\circ\text{C}$ on the binodal curves, obtained from turbidimetric titrations, is shown in Figure 1. A very slight increase in the binodal region was generally observed. Nevertheless, from $(5\text{ to }35)\text{ }^\circ\text{C}$ there is a relevant increase in the binodals curves. Equilibrium data at $25\text{ }^\circ\text{C}$ in Tables 1 and 2 and Figures 1 and 4 for the mentioned system were previously determined by Francisco, 2005¹⁶. The equilibrium compositions of the aqueous two-phase system PEG + ZnSO_4 determined at $(5, 10, 35\text{ and }45)\text{ }^\circ\text{C}$ are given in Table 1. Tie lines were obtained by connecting the experimental

equilibrium phase composition data. The effect of temperature on the phase diagrams is illustrated in Figures 1 to 5.

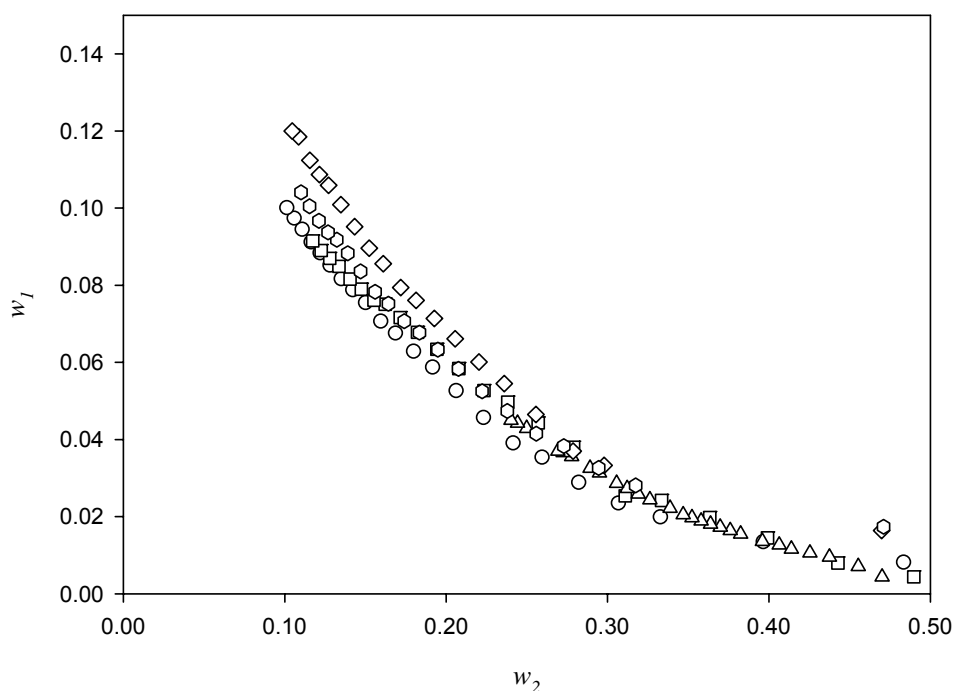


Figure 1. Binodal curves for the PEG 4000 (1) + ZnSO_4 (2) + Water (3) system at ((\diamond) 5 °C (\triangle) 10 °C (\circ) 25 °C (\square) 35 °C (\square) 45 °C).

Figure 2 shows that an increase in the temperature caused an expansion of the one-phase area in all range of concentration analyzed. The same effect was observed in PEG 1000 + NaHSO_4 systems by Zafarani-Moattar and Sadeghi⁸, and for the system PEG + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Water of Voros et al.¹⁷ In Figures 3 to 5, it can be seen that the two-phase area was expanded with the increase of temperature. From (5 to 25) °C, the concentrations of PEG in the top phase increased, and in the inferior part of the curve, the points shift to lower PEG concentrations (Figure 3).

Table 1. Mass fraction of the PEG 4000 (1) + ZnSO₄ (2) + Water (3) systems, at different temperatures

Tie-line	overall composition			upper phase			lower phase		
	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
5 °C									
1	0.1821	0.1145	0.7034	0.2854	0.0205	0.6941	0.0534	0.2016	0.7450
2	0.1980	0.1187	0.6834	0.3255	0.0138	0.6607	0.0486	0.2276	0.7239
3	0.2223	0.1276	0.6501	0.3521	0.0081	0.6399	0.0522	0.2456	0.7022
4	0.2343	0.1318	0.6339	0.3749	0.0061	0.6190	0.0559	0.2637	0.6805
5	0.2535	0.1383	0.6082	0.4144	0.0043	0.5813	0.0678	0.2746	0.6576
10 °C									
1	0.2168	0.0949	0.6883	0.3255	0.0105	0.6640	0.0565	0.2185	0.7250
2	0.2316	0.0961	0.6723	0.3431	0.0084	0.6485	0.0611	0.2210	0.7179
3	0.2481	0.1025	0.6494	0.3776	0.0064	0.6160	0.0587	0.2488	0.6925
4	0.2584	0.1053	0.6363	0.3912	0.0051	0.6037	0.0631	0.2526	0.6843
5	0.2825	0.1131	0.6045	0.4226	0.0032	0.5742	0.0650	0.2751	0.6599
25 °C*									
1	0.1314	0.1482	0.7204	0.3335	0.0205	0.6460	0.0219	0.2167	0.7613
2	0.1376	0.1748	0.6876	0.3680	0.0131	0.6190	0.0191	0.2380	0.7429
3	0.1446	0.2015	0.6539	0.4112	0.0092	0.5796	0.0276	0.2548	0.7175
4	0.1495	0.2263	0.6242	0.4441	0.0047	0.5512	0.0376	0.2674	0.6950
5	0.1551	0.2455	0.5994	0.4692	0.0042	0.5266	0.0262	0.2881	0.6857
35 °C									
1	0.1816	0.0746	0.7438	0.2660	0.0187	0.7153	0.0380	0.1562	0.8058
2	0.2003	0.0870	0.7127	0.3180	0.0110	0.6709	0.0416	0.1811	0.7773
3	0.2098	0.0930	0.6971	0.3397	0.0108	0.6495	0.0462	0.1986	0.7552
4	0.2398	0.0975	0.6627	0.3786	0.0065	0.6149	0.0530	0.2225	0.7244
5	0.2510	0.1061	0.6429	0.3949	0.0056	0.5994	0.0498	0.2433	0.7069
45 °C									
1	0.1979	0.1074	0.6947	0.3219	0.0584	0.6197	0.0534	0.1697	0.7769
2	0.2241	0.1148	0.6610	0.3577	0.0558	0.5865	0.0519	0.1930	0.7551
3	0.2360	0.1202	0.6438	0.3701	0.0582	0.5717	0.0489	0.2270	0.7242
4	0.2569	0.1262	0.6168	0.4062	0.0585	0.5352	0.0541	0.2357	0.7102
5	0.2796	0.1324	0.5880	0.4315	0.0704	0.4981	0.0573	0.2232	0.7195

* Francisco, 2005.

In the temperature of 35 °C (Figure 4), the PEG + ZnSO₄ system had higher biphasic area when compared with others temperatures. Finally, at 45 °C in the inferior part of the curve, points shift to higher PEG concentrations, causing a very small reduction of the two-phase area. The crossing of binodals from (25 to 45) °C in the PEG + ZnSO₄ systems is observed in Figures 3 to 5. This effect was observed by Zafarani-Moattar and Sadeghi⁸ in PEG 6000 + Na₂HPO₄ or NaH₂PO₄ and Mishima et al.¹⁸ in PEG 6000 + K₂HPO₄ aqueous systems, but at higher polymer concentration the crossing of binodals showed a reversed effect of temperature, with an expansion of one phase area. Similar behavior was verified in PEG 1000 + Na₂CO₃ and PEG 2000 + Na₂CO₃ systems

by Voros et al.¹⁷ However, for the systems related in this study, the crossing of binodals did not show an expansion in the one phase area. For all temperatures of the systems mentioned above, by increasing the temperature, water is driven from the salt phase to the PEG one, so the PEG phase will be somewhat more diluted while the salt phase is concentrated.

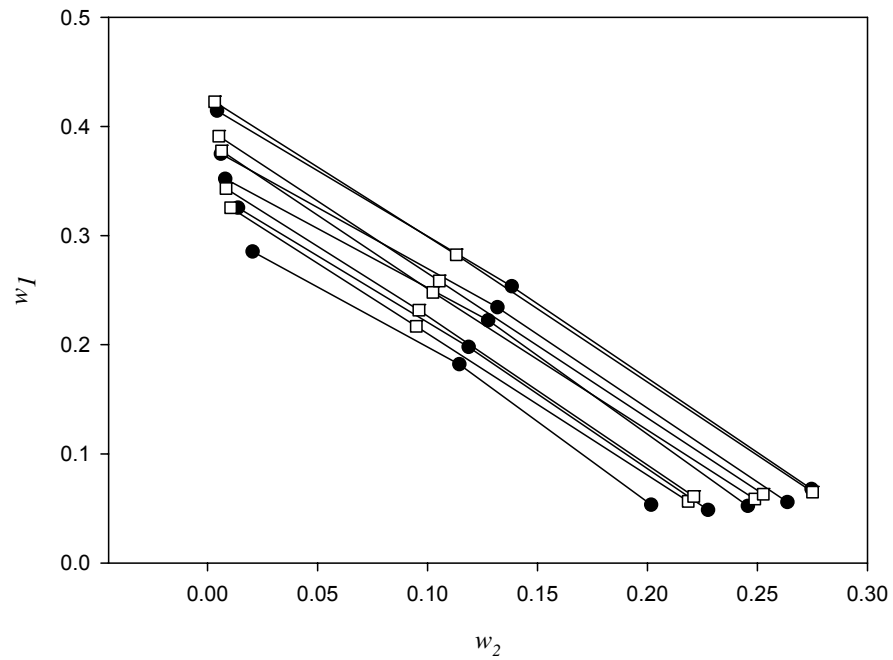


Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 10 °C).

The slope of the tie-line (STL) is given by the ratio of the variation of polymer and the variation of salt concentration, (C(P)) and (C(S)), respectively, in top and bottom phases, as presented by eq 1:

$$\text{STL} = \{[C(P)^{\text{top}} - C(P)^{\text{bottom}}]/[C(S)^{\text{top}} - C(S)^{\text{bottom}}]\} \quad (1)$$

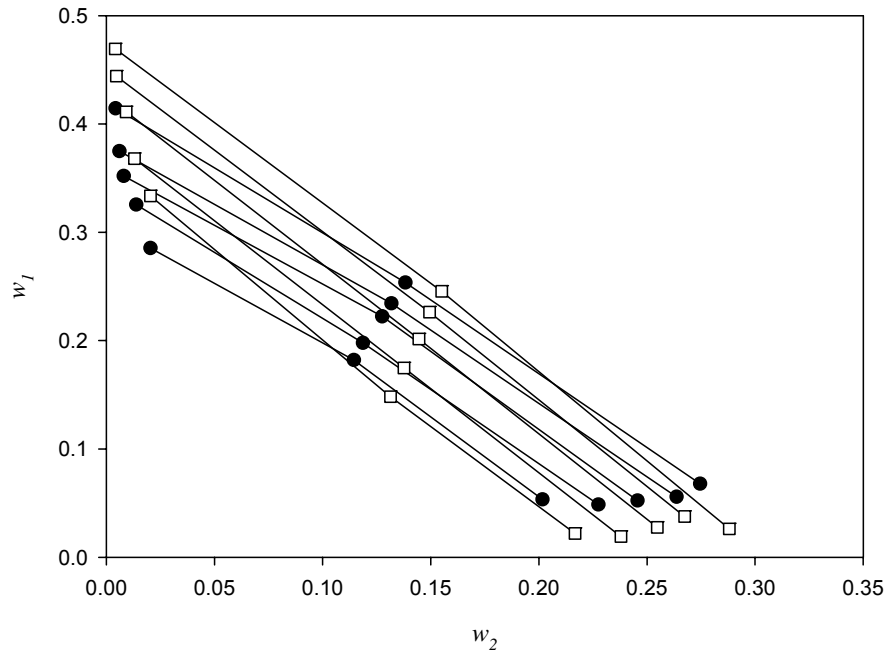


Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 25 °C).

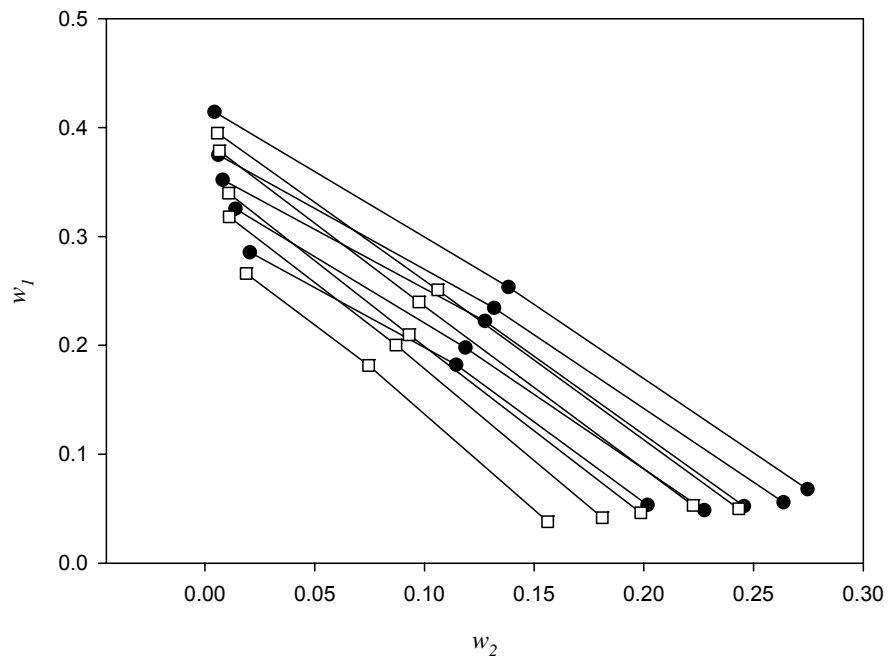


Figure 4. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 35 °C).

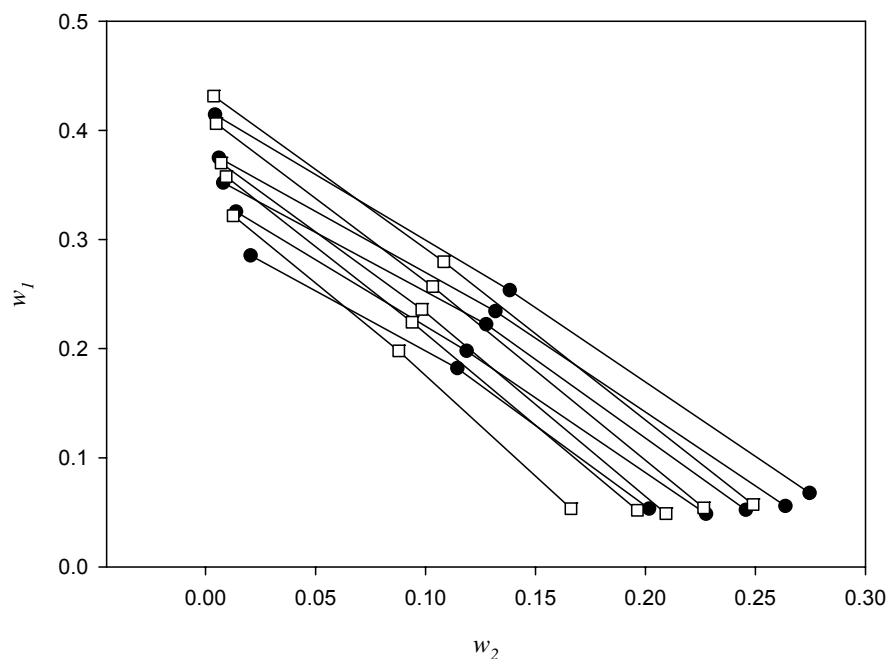


Figure 5. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + ZnSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 45 °C).

As can be seen in Table 2, there was an increase in the slope of the tie-lines with the temperature rise. Similar results were reported to other aqueous two-phase systems.^{8, 9, 14} This trend occurs because an increase in the temperature causes an increase of the polymer concentration in the upper phase, and an increase of the salt concentration in the lower phase.

Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 (1) + ZnSO₄ (2) + Water ATPS at different temperatures

Tie-Line	Temperature				
	5 °C	10 °C	25 °C*	35 °C	45 °C
1	1.28	1.29	1.59	1.66	2.41
2	1.30	1.33	1.55	1.63	2.23
3	1.26	1.32	1.56	1.56	1.90
4	1.24	1.33	1.55	1.51	1.99
5	1.28	1.32	1.56	1.45	2.45

* Francisco, 2005.

Tie-line lengths (TLL) of the systems are presented in Table 3. The tie-line length is an empirical measure of the compositions of the two phases and can be calculated through eq 2:

$$\text{TLL} = \{ [C(P)^{\text{top}} - C(P)^{\text{bottom}}]^2 + [C(S)^{\text{top}} - C(S)^{\text{bottom}}]^2 \}^{0.5} \quad (2)$$

where $C(P)^{top}$, $C(P)^{bottom}$, $C(S)^{top}$ and $C(S)^{bottom}$ are the concentrations of polymer and salt in the top and bottom phases, respectively. It is observed in Table 3 that the TLL was increased from (5 to 25) °C and from (35 to 45) °C. A reduction was observed from (25 to 35) °C.

Table 3. Tie-Line Length for PEG 4000 (1) + ZnSO₄ (2) + Water ATPS at different temperatures

Tie-Line	Temperature				
	5 °C	10 °C	25 °C*	35 °C	45 °C
1	29.44	34.01	36.83	26.62	29.06
2	34.98	35.32	41.50	32.45	33.52
3	38.26	40.06	45.55	34.84	36.29
4	41.01	41.10	48.40	39.07	39.42
5	43.93	44.92	52.62	41.90	40.42

Francisco, 2005.

Conclusions

Liquid-liquid equilibrium data for the system PEG 4000 + zinc sulphate + Water at (5, 10, 35 and 45) °C were measured. The effect of temperature was studied and it was observed that an increase in the temperature expanded the two-phase area, but from (35 to 45) °C, there was a small reduction in the biphasic area. The effect of crossing binodals was observed at higher temperatures, from (25 to 45) °C. The tie line slope of all systems increased with an increasing in the temperature.

Literature Cited

- (1) Albertsson, P. A. *Partition of cell particles and macromolecules*; Willey: New York, 1986.
- (2) Zaslavsky, B. Y. *Aqueous two-phase partitioning Physical chemistry and bioanalytical applications*; Marcel Dekker, New York, 1995.
- (3) Reh G.; Nerli, B.; Picó. G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *J. Chromatography B.* **2002**, *780*, 389-396.
- (4) Günduz; U.; Tolga, A. Optimization of bovine serum albumin sorption and recovery by hydrogels. *J. Chromatography B.* **2004**, *807*, 13-16.
- (5) Snyder, S. M.; Cole, K. D.; Sziag, D. C. Phase compositions, viscosities and densities for aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and various salts at 25°C. *J. Chem. Eng. Data.* **1992**, *37*, 268-274.
- (6) Ananthapadmanabhan, K. P.; Goddard, E. D. Aqueous biphasic formation in polyethylene oxide-inorganic salt systems. *Langmuir.* **1987**, *3*, 25-31.
- (7) Ho-Gutierrez, I. V.; Cheluget, E. L.; Vera, J. H.; Weber, M. E; Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly(ethylene glycol) with Na₂SO₄ or NaCl. *J. Chem. Eng. Data.* **1994**, *39*, 245-248.
- (8) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2001**, *181*, 95-112.
- (9) Zafarani-Moattar, M. T.; Gasemi, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *198*, 281-291.
- (10) Graber, T. A.; Gálvez, M. E.; Galleguillos, H. R. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data.* **2004**, *49*, 1661-1664.

- (11) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamzehzadeh, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium succinate or sodium formate. *Calphad* **2005**, *29*, 1-6.
- (12) Hey, M. J.; Jackson, D. P.; Yan, H. The salting out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly (ethylene glycol). *Polymer*. **2005**, *46*, 2567-2572.
- (13) Hu, M.; Zhai, Q.; Jiang, Y.; Jin, L.; Loi, Z. Liquid-liquid and liquid-liquid-solid equilibrium in PEG + Cs₂SO₄ + H₂O. *J. Chem. Eng. Data*. **2004**, *49*, 1440-1443.
- (14) Cheluget, E. L.; Gelinás, S.; Vera, J. H.; Weber, M. E. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly (propylene glycol) with NaCl. *J. Chem. Eng. Data*. **1994**, *39*, 127-130.
- (15) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Phase behavior of aqueous two-phase PEG + NaOH system at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*. **2004**, *49*, 297-300.
- (16) 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. Dissertação de tese de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. UFV, 2001. 72 p. : il.
- (17) Voros, N.; Proust, P.; Fredenslund, A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib*. **1993**, *90*, 333-353.
- (18) Mishima K.; Nakatani, N.; Nomiya, T.; Matsuyama, K.; Nagatani, M.; Nishikawa, H. Liquid liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogen phosphate. *Fluid Phase Equilib*. **1995**, *107*, 269-276.
- (19) Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R.; Minim, V. P. R. Influence of temperature and water and fat contents on the thermophysical properties of milk. *J. Chem. Eng. Data* **2002**, *47*, 1488-1491.

CAPÍTULO 3 - Equilibrium data for the ternary system PEG 4000 + copper sulphate + Water at 5 °C, 10 °C, 35 °C and 45 °C

Abstract

Phase equilibrium data for an aqueous two-phase system composed by polyethyleneglycol 4000 + copper sulphate + Water were determined at four temperatures (5, 10, 35 and 45) °C. The effect of the temperature on the equilibrium data was studied being observed an increase of the biphasic area with the increment of the temperature.

Introduction

Aqueous-two phase systems (ATPS) are an alternative method of liquid-liquid extraction, which has been used for extraction and purification of biological materials such as cells and proteins. Beijerinck first reported this liquid phase separation that was first used for extraction and separation purposes by Albertsson.¹

ATPS are formed when appropriate amounts of aqueous solutions of hydrophilic polymers or polymer and salt combinations are mixed above a defined concentration, causing the system separation into two immiscible water rich-phase.^{2, 3} For industrial applications, polymer + salt systems are preferred to the polymer + polymer systems, since they present low viscosity, low; Additionally, the phase separation in such systems occurs relatively fast.^{4, 5}

Data on the composition and properties of two phase aqueous systems are necessary for the design of extraction processes using ATPS and for the development of thermodynamics and mass transfer models. Zaslavsky⁶ reported phase equilibrium diagrams for various polymer + polymer aqueous systems. Nevertheless, for polymer + salt systems experimental data are relatively scarce. The same can be said for poly (ethylene) glycol (PEG) + salts systems. In recent years, some authors focused on the measurement of new phase equilibrium data for these aqueous PEG 4000 + salt systems. Graber and Taboada⁷ determined experimental data for systems containing PEG 4000 + sodium nitrate at 298.15 K. Haghtalab and Mokhtarani⁸ measured liquid-liquid

equilibrium for systems containing PEG + K_2HPO_4 and Na_2SO_4 at 298.15 K, for different pH values. Sé and Aznar⁹ studied the effect of the temperature for PEG + potassium phosphate systems at (283.15, 288.15, 293.15, and 303.15) K. Hu et al.¹⁰ obtained binodal data for the PEG 4000 + Cs_2CO_4 system in three temperatures, (298.15, 308.15 and 318.15) K. Graber et al.¹¹ analyzed the aqueous biphasic system formed by PEG 4000 + lithium sulphate system at (278.15, 298.15 and 318.15) K and used the (NRTL) thermodynamic model to correlate the experimental data. Ma et al.¹² measured liquid-liquid equilibrium data for the system PEG 4000 + Cs_2CO_3 at (298.15, 308.15 and 318.15) K. However, equilibrium data for PEG 4000 + copper sulphate aqueous systems have not been reported yet. The objective of this work was to obtain phase equilibrium data for the PEG 4000 + $CuSO_4$ + H_2O system at (5, 10, 35 and 45) °C.

Experimental Section

Materials. Polyethylene glycol of molar mass $4000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ was obtained from ISOFAR (Brazil). Copper sulphate with a minimum purity of 0.0098 expressed in mass fraction was obtained from NUCLEAR (Brazil). All chemicals were used without further purification. Water previously distilled and deionized by a Milli-Q device (Millipore, USA) was used in all experiments.

Experimental Procedure. Stock solutions of PEG 4000 ($w = 0.50$) and copper sulphate ($w = 0.28$) of pH = 2,73 were prepared. Aqueous biphasic systems with total mass of 40 g were prepared in 50 cm^3 centrifuge tubes by weighing appropriate quantities of PEG 4000, copper sulphate and water in an analytical balance (Denver Instruments, M-310, USA). After sufficient mixing, the tubes were centrifuged at 2000 rpm (Centrifuge Eppendorf 5804, Germany) for 20 min to accelerate the phase separation, and then allowed to settle for 24 h at the desired temperature. When the equilibrium was achieved, phases were withdrawn using syringes and needles. The top phase was carefully sampled first, being leaving a layer of solution of approximately 0.5 cm above the interface. The bottom phase was further withdrawn using a syringe with a long needle.

Densities of both phases were determined using a 10 mL pycnometer and a balance reading of $\pm 0.1 \text{ mg}$ (Ho-Gutierrez et al.¹³, Cheluget et al.¹⁴),

immediately after each sample withdrawal. The concentrations of copper sulphate in the top and bottom phases were determined by copper analysis using atomic absorption spectroscopy (AAS) (Varian SpectrAA-200, Australia). The concentration of PEG was determined by refractive index measurements at 303.15 K using a refractometer (Analytic Jena AG Abbe refractometer 09-2001, Germany). Since the refractive index of phase samples depends on PEG and salt concentrations, PEG concentration was obtained by subtracting from the total solution composition, the salt concentration measured by AAS. The water concentration was determined by the freeze-drying technique (Freezone 4.5 – LABCONCO, USA).

Results and Discussion

The experimental equilibrium data for each phase of the ternary system PEG 4000 + copper sulphate + water is shown in Table 1. The studied temperatures were (5, 10, 35 and 45) °C. It was determined five tie lines for each temperature. The same data appear in Figures 1 to 3. The mean standard deviation in the salt mass by this method was equal to ± 0.0042 (expressed in mass fraction). The mean standard deviation in the polymer mass was of ± 0.0003 and in the water mass was of ± 0.0009 (expressed in mass fraction).

Table 1. Mass Fraction of the PEG 4000 (1) + CuSO₄ (2) + Water (3) systems, at different temperatures

Tie-line	overall composition			upper phase			lower phase		
	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3
5 °C									
1	0.1151	0.1017	0.7833	0.1736	0.0611	0.7653	0.0667	0.1353	0.7980
2	0.1201	0.1039	0.7760	0.1956	0.0505	0.7539	0.0574	0.1492	0.7933
3	0.1250	0.1072	0.7678	0.2084	0.0469	0.7447	0.0552	0.1582	0.7867
4	0.1300	0.1093	0.7607	0.2263	0.0384	0.7353	0.0565	0.1635	0.7800
5	0.1341	0.1122	0.7537	0.2368	0.0365	0.7267	0.0592	0.1675	0.7733
10 °C									
1	0.1140	0.0882	0.7978	0.1507	0.0592	0.7902	0.0432	0.1344	0.8224
2	0.1201	0.0910	0.7889	0.1701	0.0514	0.7785	0.0335	0.1473	0.8192
3	0.1248	0.0929	0.7823	0.1903	0.0463	0.7635	0.0342	0.1564	0.8095
4	0.1300	0.0980	0.7720	0.2163	0.0369	0.7468	0.0317	0.1683	0.8000
5	0.1350	0.0960	0.7690	0.2177	0.0378	0.7445	0.0312	0.1702	0.7986
35 °C									
1	0.1151	0.1032	0.7817	0.2108	0.0439	0.7453	0.0538	0.1395	0.8067
2	0.1200	0.1031	0.7769	0.2195	0.0425	0.7380	0.0512	0.1441	0.8047
3	0.1251	0.1062	0.7688	0.2382	0.0371	0.7247	0.0480	0.1574	0.7947
4	0.1300	0.1083	0.7617	0.2495	0.0348	0.7158	0.0489	0.1617	0.7893
5	0.1351	0.1094	0.7555	0.2596	0.0319	0.7084	0.0506	0.1681	0.7813
45 °C									
1	0.1200	0.0959	0.7841	0.2026	0.0463	0.7511	0.0381	0.1489	0.8130
2	0.1249	0.0960	0.7791	0.2338	0.0357	0.7306	0.0333	0.1587	0.8081
3	0.1371	0.1010	0.7620	0.2594	0.0265	0.7141	0.0347	0.1685	0.7968
4	0.1479	0.1030	0.7489	0.2821	0.0217	0.6963	0.0404	0.1738	0.7858
5	0.1570	0.1059	0.7372	0.2968	0.0198	0.6833	0.0463	0.1846	0.7691

In Figures 1 to 3 it can be seen the effect of the temperature on the system phase equilibrium. The tie-lines in all equilibrium diagrams were obtained by connecting the experimental composition data. These figures show that there is a displacement of the binodal curve toward the origin with the increment of the temperature, and an increase in the biphasic region, where lower concentrations of copper sulphate and PEG 4000 were needed for the formation of the aqueous biphasic system. This result is in good agreement with the experimental results for other aqueous systems previously reported.¹⁵⁻¹⁸ At 35 °C, it was observed a slight increase in the biphasic area (Figure 3).

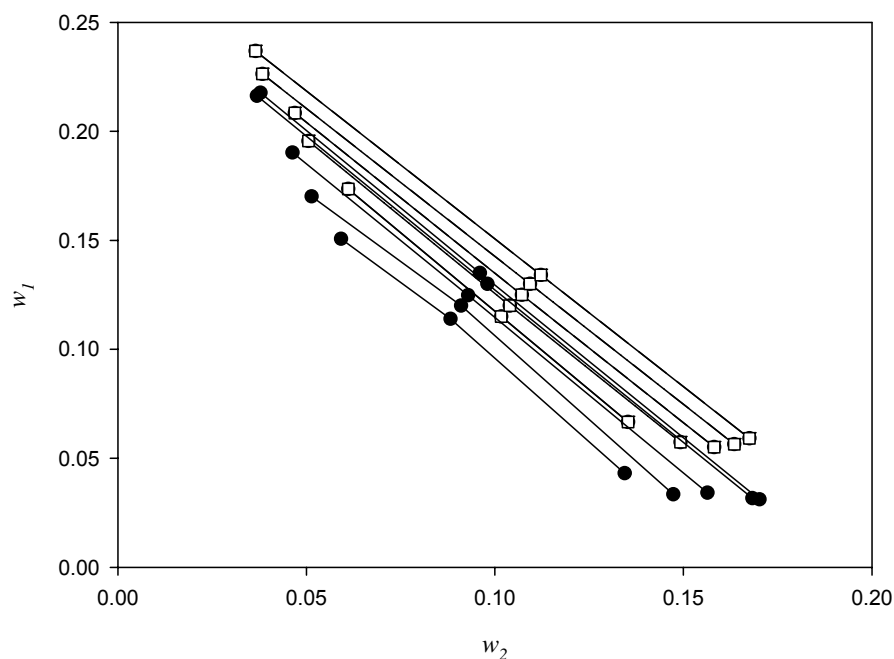


Figure 1. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 10 °C).

Tables 2 and 3 show, respectively, the effect of the temperature on the slope and length of the tie-lines. The slope of the tie-lines (STL) is given by the ratio of the variation of polymer (C(P)) and salt concentrations (C(S)) in top and bottom phases, as presented by eq 1:

$$\text{STL} = \left\{ \frac{[C(P)^{\text{top}} - C(P)^{\text{bottom}}]}{[C(S)^{\text{top}} - C(S)^{\text{bottom}}]} \right\} \quad (1)$$

Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 + CuSO₄ + Water ATPS at different temperatures

Tie-Line	Temperature			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	1.44	1.43	1.64	1.60
2	1.40	1.42	1.66	1.63
3	1.38	1.42	1.58	1.58
4	1.36	1.40	1.58	1.59
5	1.36	1.41	1.54	1.52

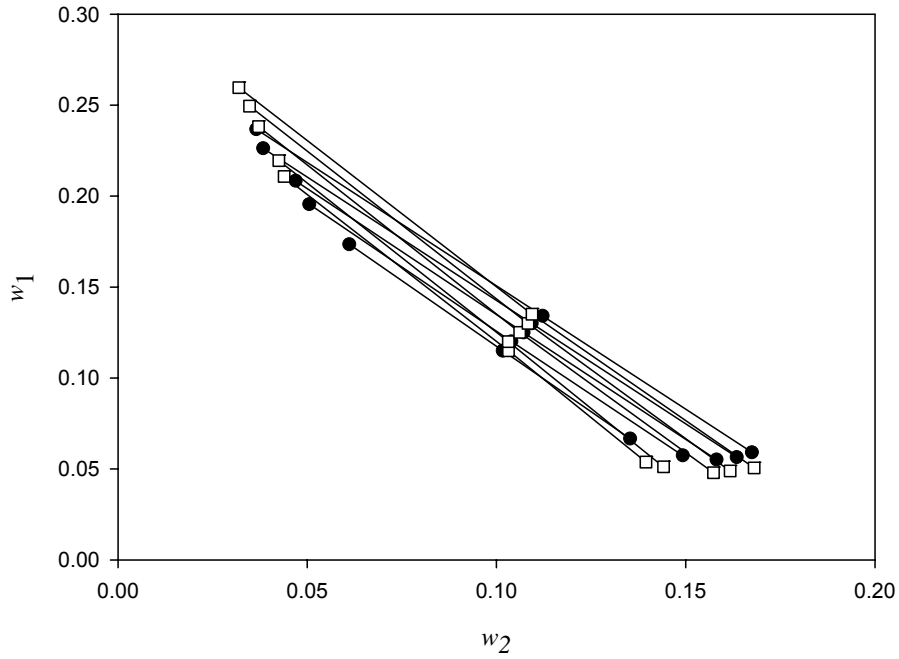


Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 35 °C).

The tie-line lengths (TLL) of the systems are presented in Table 3. The tie-line length is an empirical measure of the compositions of the two phases, which can be calculated through eq 2:

$$\text{TLL} = \{[C(P)^{\text{top}} - C(P)^{\text{bottom}}]^2 + [C(S)^{\text{top}} - C(S)^{\text{bottom}}]^2\}^{0.5} \quad (2)$$

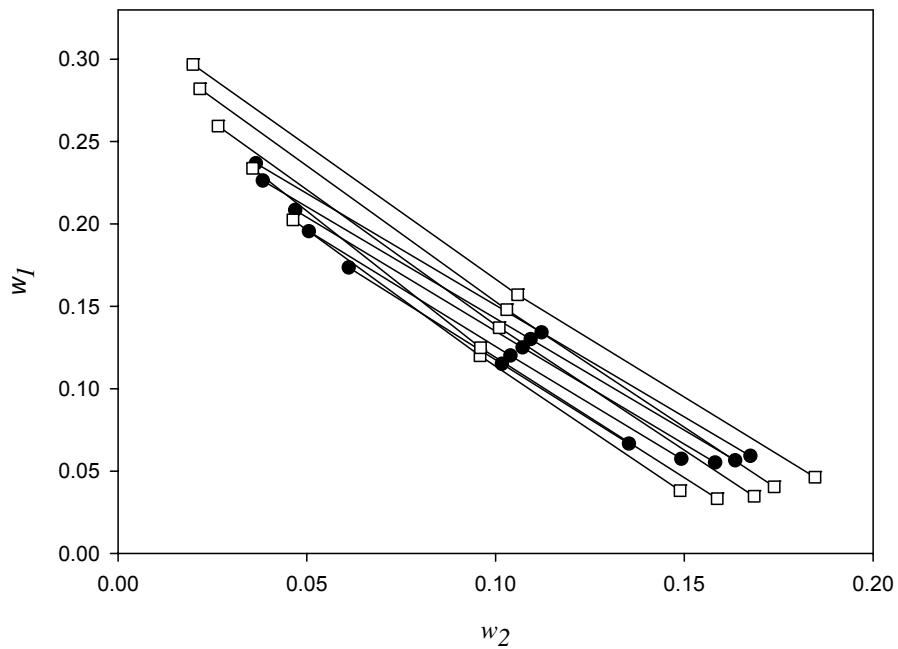


Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + CuSO₄ + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 45 °C).

where $C(P)^{\text{top or bottom}}$ and $C(S)^{\text{top or bottom}}$ are the concentrations of polymer and salt in the top or bottom phases, respectively. Relatively to Tables 2 and 3, it is observed that in the temperature range from (5 to 45) °C there was an increase in the slope and length of the tie-lines. In general, the concentration of polymer increases with an increasing in temperature in the upper phase, and the concentration of the salt increases in the lower phase. In other words, temperature increase causes an increase in the length and slope of the tie-lines. Such phenomenon occurs because the compositions of the phases in equilibrium change with the variation of the temperature. Data obtained in this work from (5 to 45) °C obeys this trend, which was also reported in other works.^{15, 17-20}

Table 3. Tie-Line Length Values for PEG 4000 + CuSO₄ + Water ATPS at different temperatures

Tie-Line	Temperature			
	5 °C	10 °C	35 °C	45 °C
1	13.02	13.12	18.38	19.38
2	16.98	16.70	19.66	23.52
3	18.94	19.10	22.50	26.59
4	21.09	22.66	23.73	28.55
5	22.07	22.87	24.94	29.99

Conclusions

The effect of the temperature in the behavior of a two-phase system containing PEG 4000 + copper sulphate + water was analyzed. Liquid-liquid equilibrium data for this system was obtained at (5, 10, 35 and 45) °C. It was observed that the temperature increase caused an increase in the biphasic area. It was observed that tie-line slope and length increased with the increment of the temperature.

Literature Cited

- (1) Albertsson, P. A. *Partition of cell particles and macromolecules*, 3rd Ed; John Wiley & Sons, 1960.
- (2) Waziri, S. M.; Abu-Sarkh; b. F.; Ali, S. A. The effect of pH and salt concentration on the coexistence curves of aqueous two-phase systems containing a pH responsive copolymer and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.*, **2003**, *205*, 275-290.
- (3) Shang, Q. K.; Li, W.; Jia, Q.; Li, D. Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilib.* **2004**, *219*, 195-203.
- (4) Costa, M. J. L.; Cunha, M. T.; Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase. *Biosseparation*, **2000**, *9*, 231-238.
- (5) Silva, M. E.; Franco, T. T.; Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing – a review paper. *Braz. J. Chem. Eng.*, **2000**, *17*, 1-17.
- (6) Zaslavsky, B. Y. *Aqueous two-phase partitioning physical chemistry and bioanalytical applications*; Marcel Dekker, New York, 1995
- (7) Graber, T. A.; Taboada, M. E. Liquid-liquid equilibrium of the poly(ethylene glycol) + sodium nitrate + water system at 298.15 K. *J. of Chem. Eng. Data.*, **2000**, *45*, 182-184.
- (8) Haghtalab, A.; Mokhtarani, B. The new experimental data and a new thermodynamic model based on group contribution for correlation liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase systems of PEG and (K₂HPO₄ or Na₂SO₄). *Fluid Phase Equilib.*, **2004**, *215*, 151-161.
- (9) Sé, R. A. G.; Aznar, M. Liquid-Liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + potassium phosphate at four temperatures: Experimental determination and thermodynamic modeling. *J. Chem. Eng. Data*, **2002**, *47*, 1401-1405.
- (10) Hu, M., Zhai Q., Jiang Y, Lihua, J., Liu, Z. Liquid-liquid and liquid-solid equilibrium in PEG + Cs₂SO₄ + H₂O. *J. Chem. Eng. Data*, **2004**, *49*, 1440-1443.
- (11) Graber, T. A.; Gálvez, M. E.; Galleguillos, H. R. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at

- different temperatures. *J. Chem. Eng. Data*, **2004**, *49*, 1661-1664.
- (12) Ma, B.; Hu, M.; Li S.; Jiang, Y.; Liu, Z. Liquid-liquid phase equilibrium in the ternary system poly (ethylene glycol) + Cs₂CO₃ + H₂O. *J. Chem. Eng. Data*, **2005**, *50*, 792-795.
- (13) Ho-Gutierrez, I. V.; Cheluget, E. L.; Vera, J. H.; Weber, M. E; Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly(ethylene glycol) with Na₂SO₄ or NaCl. *J. Chem. Eng. Data.*, **1994**, *39*, 245-248.
- (14) Cheluget, E. L.; Gelinias, S.; Vera, J. H.; Weber, M. E. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly (propylene glycol) with NaCl. *J. Chem. Eng. Data*, **1994**, *39*, 127-130.
- (15) Mishima K.; Nakatani, N.; Nomiyama, T.; Matsuyama, K.; Nagatani, M.; Nishkawa, H. Liquid liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and dipotassium hydrogen phosphate. *Fluid Phase Equilib.*, **1995**, *107*, 269-276.
- (16) Zafarani-Moattar, M. T.; Gasemi, J. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and ammonium dihydrogen phosphate or diammonium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.*, **2002**, *198*, 281-291.
- (17) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R.; Hamidi, A. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethyleneglycol and sodium citrate: experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.*, **2004**, *219*, 149-155
- (18) Murugesan, T. Perumalsamy, M. Liquid-liquid equilibria of poly (ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40 and 45) °C. *J. Chem. Eng. Data*, **2005**, *50*, 1392-1395.
- (19) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylenoglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2001**, *181*, 95-112.
- (20) Voros, N.; Proust, P.; Fredenslund, A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.* **1993**, *90*, 333-353.

CAPÍTULO 4 - Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed by sodium citrate + PEG 1500 or PEG 4000 at different temperatures

Abstract

Phase diagrams of (PEG) 1500 g.mol⁻¹ and 4000 g.mol⁻¹ + sodium citrate + water systems were determined at temperatures of (10, 35 and 45) °C and (5, 10, 25, 35 and 45) °C, respectively. The influences of the temperature and PEG molar mass on the equilibrium data of the system were analyzed. Binodal curves shifted toward to the origin with (PEG) molar mass increase.

Introduction

Extraction using aqueous two-phase systems (ATPS) is a useful technique for the separation and purification of biomaterials where the use of organic solvents would damage biocompounds of biological activities.^{1, 2} These systems can be formed by adding either two incompatible polymers, such as polyethyleneglycol (PEG) and dextran or a polymer and a salt, such as PEG and (NH₄)₂SO₄, to water. The high water content of both phases provides high biocompatibility and low interfacial tension, minimizing the degradation of biomolecules. These systems also present good resolution and yield, relatively high capacity, easy scale-up, relatively low material cost, and the possibility of polymer recycle.³

The most common polymer + polymer system is composed by PEG and dextran. However, a large scale utilization of this system has a high cost.^{4, 5} PEG + salt systems have some advantages when compared to those containing only polymers, because of their lower cost, lower viscosity, rapid phase disengagement and easy scale-up.^{6, 7} Polyethyleneglycol (PEG) is one of the most useful constituents in ATPS since it is a low cost, nontoxic and noninflammable reagent.

Several studies had combined PEG with either sulphate or phosphate salts, and in a lesser intensity, citrate has been used as an alternative to substitute phosphate or sulphate in the ATPS formation.^{8, 9, 10, 20}

Citrate is biodegradable and nontoxic and can be discharged into biological wastewater treatment plants. Nevertheless, for PEG + citrate salts + water systems, only a limited number of experimental data are reported in the literature. Zafarani-Moattar and Hamidi¹¹ report liquid-liquid equilibrium data of PEG 6000 + potassium citrate at (25, 30 and 45) °C. Vernau and Kula have measured equilibrium data at room temperature for the aqueous PEG 1550 + sodium citrate system.²⁰ Zafarani-Moattar et al.⁸ determined the phase equilibrium compositions for PEG 6000 + sodium citrate aqueous system at (25, 30 and 45) °C. Murugesan and Perumalsamy¹⁰ reported the binodal curve for PEG 2000 + sodium citrate at (25, 30, 35, 40 and 45) °C. Tubío et al.¹² determined the phase diagrams of systems compound by PEG of molar masses (600, 1000, ~1500, ~ 4000 and 8000) g.mol⁻¹ and sodium citrate at (22, 37 and 50) °C and pH values of (5.2, 8.2 and 9.2).

In the present work, we report liquid-liquid equilibrium data for aqueous PEG 1500 + sodium citrate + water system at (10, 35 and 45) °C at pH = 8,24 and for PEG 4000 + sodium citrate + water system at (5, 10, 25, 35 and 45) °C with the main objective of verifying the influence of the temperature and PEG molar mass on the equilibrium data.

Experimental Section

Materials. The reagents of analytical grade used were PEG ($M = 1500$ g.mol⁻¹ and 4000 g.mol⁻¹, ISOFAR, Brazil), tribasic sodium citrate (VETEC, Brazil). The water was deionized (Milli-Q, Millipore, USA). All reagents were used without further purification.

Experimental Procedure. Appropriate quantities of PEG aqueous stock solution ($w = 0.50$), salt aqueous solution of pH = 8,24 and water were weighed with ± 0.1 mg accuracy (analytical balance Denver M-310, USA) in 50 cm³ centrifuge tubes aiming to prepare 40 g of the biphasic systems. The mixture was vigorously stirred and then centrifuged (Eppendorf 5804, Germany) at 720 g for 20 min. The tubes were transferred to a thermostatic water bath (TECNAL, TE-184, Brazil) where the mixture was allowed to settle for 24h at the desired temperature to ensure the phase separation, indicated by the absence of turbidity in both phases. The temperature was controlled at ± 0.1 °C. After equilibrium was achieved each phase was collected using syringes and needles

to determine its composition and density. The top phase was sampled first with care being taken to leave a layer of solution with approximately 0.5 cm thick above the interface. The bottom phase was withdrawn using a syringe with a long needle.

Densities were measured using a 10 mL pycnometer and a balance reading at ± 0.1 mg (Denver M-310, USA).

The water was quantified by freeze-drying (Freezone 4.5, LABCONCO, USA). The concentration of sodium citrate and of PEG in both phases were determined, respectively, by flame photometry^{10,11} and by refractive index measurements at 30 °C (Analytic Jena AG Abbe refractometer 09-2001, Germany).^{9,10,11,14,15} The relation between the refractive index (η), salt (w_s) and PEG (w_p) mass fractions is given by equation 1:^{9,10,11,14,15}

$$\eta = a_0 + a_1 w_s + a_2 w_p \quad (1)$$

The estimated values of coefficients a_0 , a_1 and a_2 for the present systems were, respectively, of 1.3307, 1.47×10^{-3} and 1.86×10^{-3} . The parameters a_1 and a_2 were essentially independent of the polymer molar mass which was also reported for other PEG + salt systems.^{14,16} The quantification of salt and PEG were made in triplicate and of water in duplicate.

Results and Discussion

Effect of Temperature. Table 1 presents data for PEG 4000 + sodium citrate + water system. Five tie lines were also determined from temperature varying from 5 °C to 45 °C. The mean standard deviation in the quantification of the salt mass by flame photography was equal to ± 0.0036 , in the polymer mass by refractive index was of ± 0.0006 and in the water mass by freeze-drying was of ± 0.0007 (expressed in mass fraction).

Table 1. Mass Fraction of the PEG 4000 (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) systems, at different temperatures

Tie-line	overall composition			upper phase			lower phase		
	W_1	W_2	W_3	W_1	W_2	W_3	W_1	W_2	W_3
5 °C									
1	0.1832	0.1067	0.7101	0.3037	0.0370	0.6593	0.0266	0.2086	0.7648
2	0.2037	0.1157	0.6806	0.3435	0.0269	0.6295	0.0050	0.2326	0.7624
3	0.2243	0.1256	0.6502	0.3939	0.0226	0.5835	0.0093	0.2625	0.7283
4	0.2450	0.1345	0.6205	0.4307	0.0192	0.5501	0.0065	0.2888	0.7046
5	0.2624	0.1417	0.5959	0.4534	0.0146	0.5321	0.0084	0.3152	0.6764
10 °C									
1	0.1834	0.1076	0.7090	0.3114	0.0373	0.6513	0.0000	0.2514	0.7486
2	0.2039	0.1158	0.6803	0.3507	0.0287	0.6206	0.0000	0.2875	0.7125
3	0.2247	0.1254	0.6499	0.3957	0.0219	0.5824	0.0000	0.3224	0.6776
4	0.2451	0.1347	0.6202	0.4361	0.0169	0.5469	0.0000	0.3691	0.6309
5	0.2623	0.1418	0.5959	0.4665	0.0144	0.5191	0.0000	0.3773	0.6227
25 °C									
1	0.1829	0.1202	0.6969	0.3628	0.0242	0.6130	0.0019	0.2286	0.7202
2	0.2020	0.1299	0.6682	0.3875	0.0192	0.5933	0.0000	0.2562	0.6885
3	0.2221	0.1401	0.6378	0.4377	0.0126	0.5497	0.0000	0.2731	0.6771
4	0.2416	0.1500	0.6084	0.4669	0.0103	0.5228	0.0000	0.3089	0.6317
5	0.2629	0.1602	0.5770	0.5059	0.0091	0.4850	0.0000	0.3448	0.5977
35 °C									
1	0.1831	0.1201	0.6968	0.3853	0.0225	0.5922	0.0000	0.2277	0.7723
2	0.2027	0.1299	0.6673	0.4249	0.0175	0.5577	0.0000	0.2568	0.7432
3	0.2220	0.1414	0.6367	0.4465	0.0106	0.5429	0.0000	0.2831	0.7169
4	0.2422	0.1501	0.6077	0.4833	0.0108	0.5059	0.0000	0.3119	0.6881
5	0.2632	0.1605	0.5762	0.5006	0.0090	0.4905	0.0000	0.3566	0.6434
45 °C									
1	0.1831	0.1200	0.6968	0.3985	0.0145	0.5870	0.0000	0.2259	0.7741
2	0.2024	0.1300	0.6677	0.4336	0.0151	0.5513	0.0000	0.2395	0.7605
3	0.2225	0.1405	0.6370	0.4520	0.0116	0.5365	0.0000	0.2760	0.7240
4	0.2424	0.1496	0.6079	0.4998	0.0090	0.4912	0.0000	0.3053	0.6947
5	0.2633	0.1603	0.5764	0.5133	0.0070	0.4797	0.0000	0.3346	0.6654

For the PEG 4000 + citrate + water system it can be seen from Figures 1 to 4 it can be seen an expansion in the biphasic area with the temperature This behavior is in agreement with the literature data ^{4, 8-10, 12, 21} aqueous system formed by citrate and PEG of different molar mass. So it is possible to conclude to conclude that an increase in temperature, reduces the polymer quantities to phase splitting.¹⁰⁻¹²

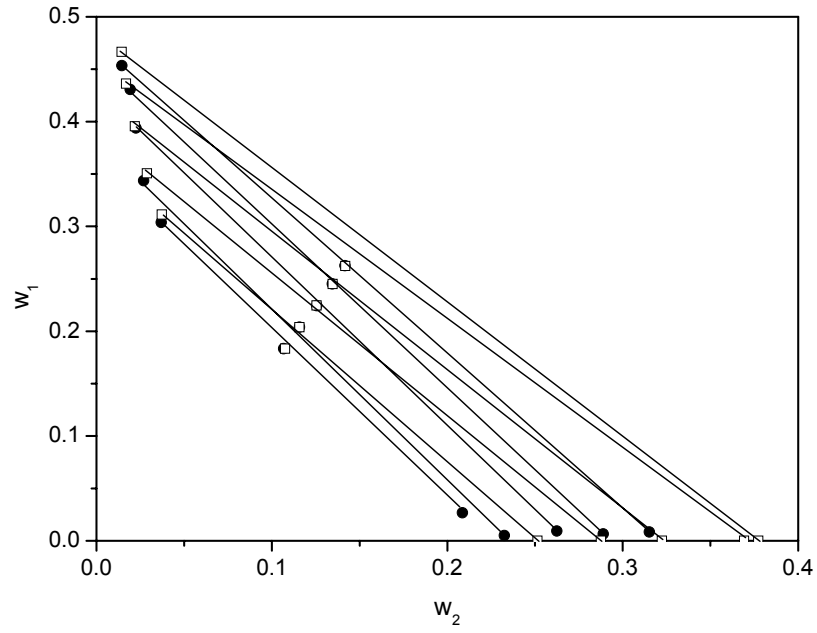


Figure 1. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 10 °C).

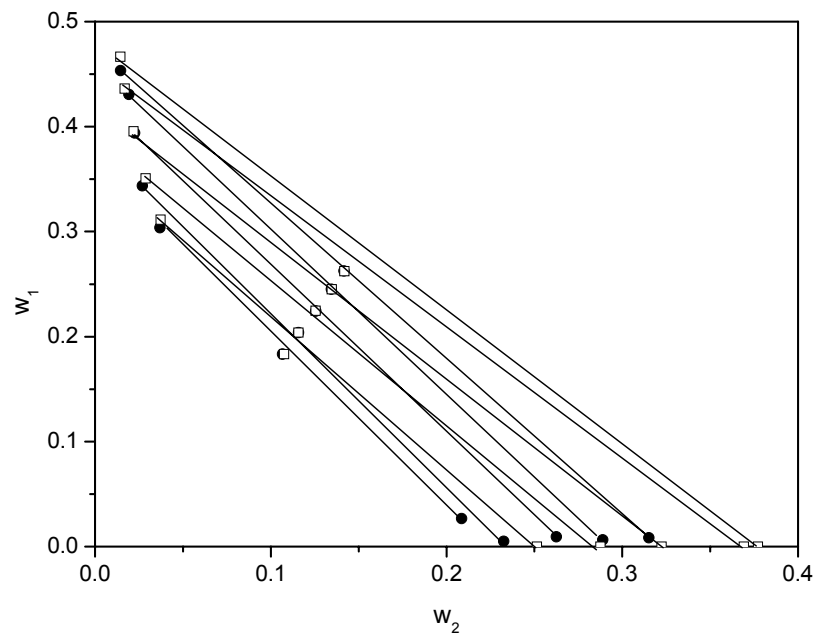


Figure 2. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 25 °C).

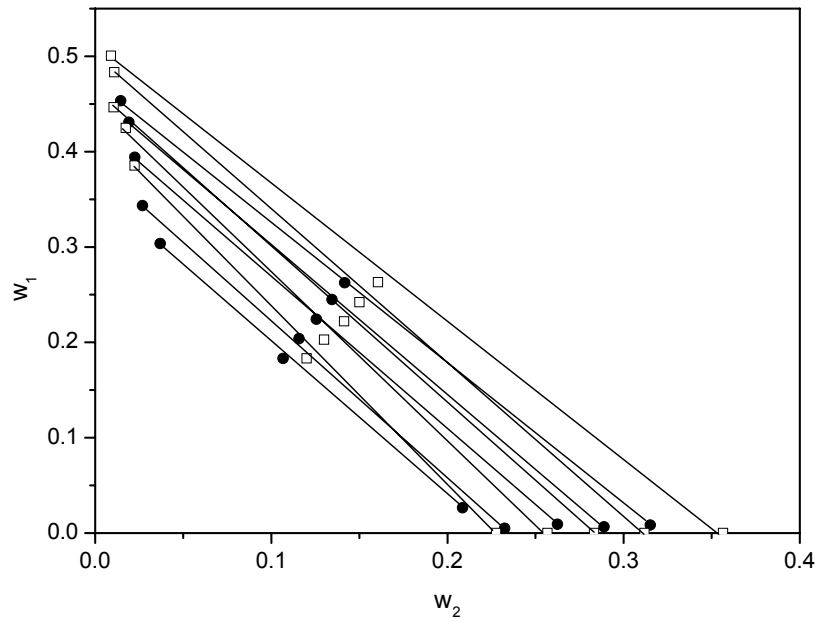


Figure 3. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 35 °C).

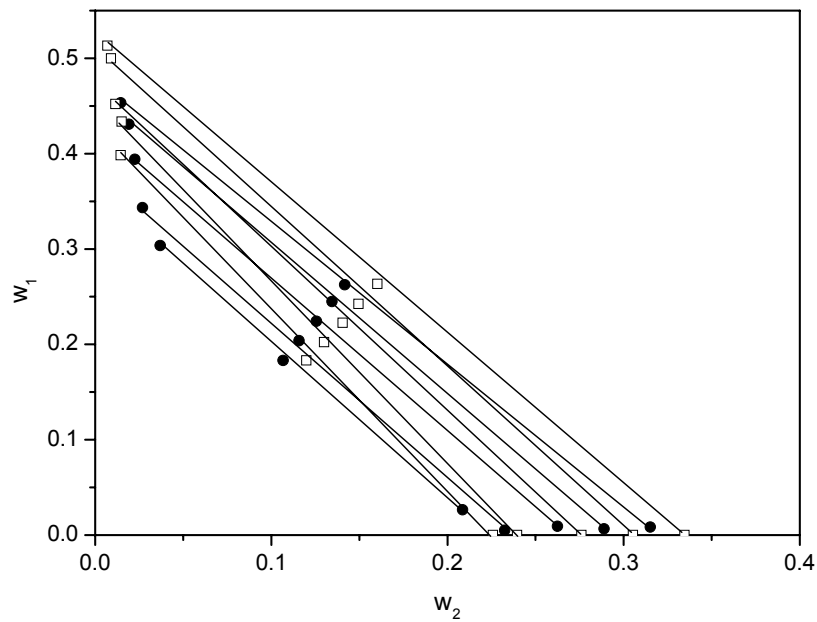


Figure 4. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 5 °C (□) 45 °C).

Tables 2 and 3 show, respectively, the slope of tie line (STL) and tie line length (TLL) for the ATPS containing PEG 4000 + sodium citrate at different temperatures. For each temperature analyzed, an increase in the TLL induced tie lines to become far from the origin. The STL increased from 10 °C to 45 °C.

Hence, the PEG + sodium citrate + water systems form two phases at high temperatures more easily, or in other words, a smaller mass fraction of polymer or salt is sufficient for phase separation. An exception was found from 5 °C to 10 °C, perhaps because a small solubility. Similar results are reported in the literature.^{11, 18-19}

Table 2. Tie-Line Slope for PEG 4000 + Sodium citrate + Water ATPS at different temperatures

Tie-line	Temperature				
	5 °C	10 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	1.61	1.45	1.77	1.88	1.89
2	1.65	1.36	1.64	1.78	1.93
3	1.60	1.32	1.68	1.64	1.71
4	1.57	1.24	1.56	1.61	1.69
5	1.48	1.29	1.51	1.44	1.57

Table 3. Tie-Line Length for PEG 4000 + Sodium citrate + Water ATPS at different temperatures

Tie-line	Temperature				
	5 °C	10 °C	25 °C	35 °C	45 °C
1	32.59	37.79	41.47	43.65	45.11
2	39.61	43.59	45.42	48.77	48.82
3	45.32	49.68	50.93	52.31	52.36
4	50.26	56.06	55.42	56.94	58.10
5	53.70	59.10	60.71	60.94	60.89

Table 4 presents equilibrium data for the system PEG 1500 + sodium citrate + water at (10, 35 and 45) °C. Five tie lines were determined for each temperature. Figures 5 and 6 show the effect of temperature on the phase diagrams. The mean standard deviation in the salt mass by this method was equal to ± 0.0045 , in the polymer mass was of ± 0.0005 and in the water mass was of ± 0.0007 (expressed in mass fraction).

From Figure 5 it can be observed a negligible effect of temperature on the displacement of the biphasic area. From 10 °C to 45 °C it was verified an increase in the monophasic region. Results obtained by Carvalho⁹ at 5 °C and 25 °C for the same type of system also showed an increase in biphasic area.

Table 4. Mass fraction of the PEG 1500 (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) systems, at different temperatures

Tie-line	overall composition			upper phase			lower phase		
	W_1	W_2	W_3	W_1	W_2	W_3	W_1	W_2	W_3
10 °C									
1	0.1843	0.1030	0.7127	0.3046	0.0303	0.6650	0.0176	0.2235	0.7588
2	0.2039	0.1157	0.6804	0.3483	0.0226	0.6291	0.0169	0.2562	0.7269
3	0.2244	0.1254	0.6503	0.3787	0.0245	0.5968	0.0123	0.2816	0.7062
4	0.2452	0.1345	0.6203	0.4171	0.0176	0.5652	0.0150	0.3014	0.6836
5	0.2625	0.1416	0.5959	0.4505	0.0204	0.5291	0.0215	0.3212	0.6573
35 °C									
1	0.1831	0.1200	0.6969	0.3029	0.0337	0.6634	0.0304	0.2171	0.7525
2	0.2025	0.1299	0.6676	0.3489	0.0254	0.6257	0.0294	0.2403	0.7303
3	0.2226	0.1400	0.6374	0.3935	0.0216	0.5849	0.0206	0.2752	0.7042
4	0.2425	0.1497	0.6078	0.4320	0.0158	0.5522	0.0141	0.3010	0.6850
5	0.2635	0.1603	0.5762	0.4645	0.0121	0.5234	0.0143	0.3267	0.6590
45 °C									
1	0.1834	0.1200	0.6966	0.3220	0.0354	0.6425	0.0363	0.2156	0.7481
2	0.2022	0.1298	0.6680	0.3552	0.0251	0.6197	0.0431	0.2330	0.7239
3	0.2226	0.1400	0.6374	0.3909	0.0206	0.5885	0.0343	0.2690	0.6966
4	0.2425	0.1496	0.6079	0.4450	0.0145	0.5405	0.0317	0.2811	0.6872
5	0.2631	0.1599	0.5770	0.4641	0.0114	0.5245	0.0351	0.3066	0.6583

Tables 5 and 6 presented, respectively, the STL and the TLL for the PEG 1500 + sodium citrate system as a function of the temperature. It can be observed the STL increase on the temperature increase. Similar results were obtained by other authors for PEG-citrate systems.^{8, 10, 18-19} For the temperature values between 10 °C to 45 °C it is observed a TLL reduction on the temperature increment.

Effect of PEG molar mass. It can be observed from Table 1 the exclusion of the PEG from the salt rich phase with an exception at 5 °C, where very small quantities of PEG were found in the bottom phase. In the polymer rich phase, the opposite behavior is observed being the salt concentration very small in top phase. Similar results were reported in the literature for systems composed by PEG (600, 1000, 1450, 3350 and 8000) + sodium citrate aqueous systems¹², and PEG + potassium phosphate + water system¹⁷, although for PEG 1500 this behavior was not verified in our work (Table 4). Figure 7 shows the binodal curves for PEG + sodium citrate ATPS, at 35 °C, as a function of PEG molar mass. It can be seen the shift of binodal curves to lower PEG and salt concentrations on the PEG molar mass increase. A similar behavior was also reported by Tubío et al.¹² for PEG 2000 + sodium citrate systems and it was attributed to the increase in the incompatibility between the system components, since the PEG with higher molar mass has a more hydrophobic character, when compared to the polymer presenting smaller molar mass.

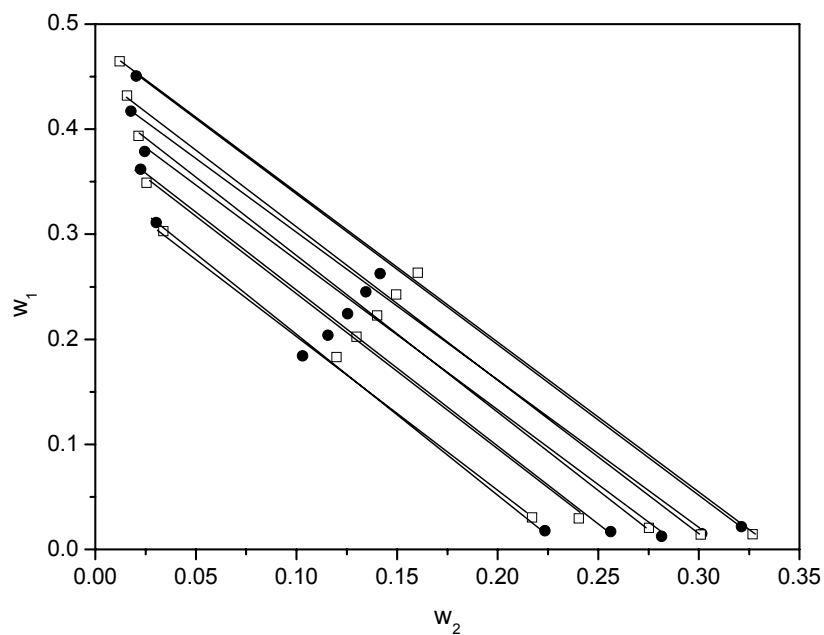


Figure 5. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 10 °C (□) 35 °C).

Table 5. Tie-Line Slope for PEG 1500 + Sodium citrate + Water ATPS, at different temperatures

Tie-lines	Temperature		
	10 °C	35 °C	45 °C
1	1.49	1.49	1.59
2	1.42	1.49	1.50
3	1.43	1.47	1.44
4	1.42	1.47	1.55
5	1.43	1.43	1.45

Table 6. Tie-Line Length for PEG 1500 + Sodium citrate + Water ATPS, at different temperatures

Tie-lines	Temperature		
	10 °C	35 °C	45 °C
1	34.60	32.85	33.78
2	40.55	38.50	37.50
3	44.76	45.10	43.46
4	49.21	50.59	49.18
5	52.39	54.92	52.07

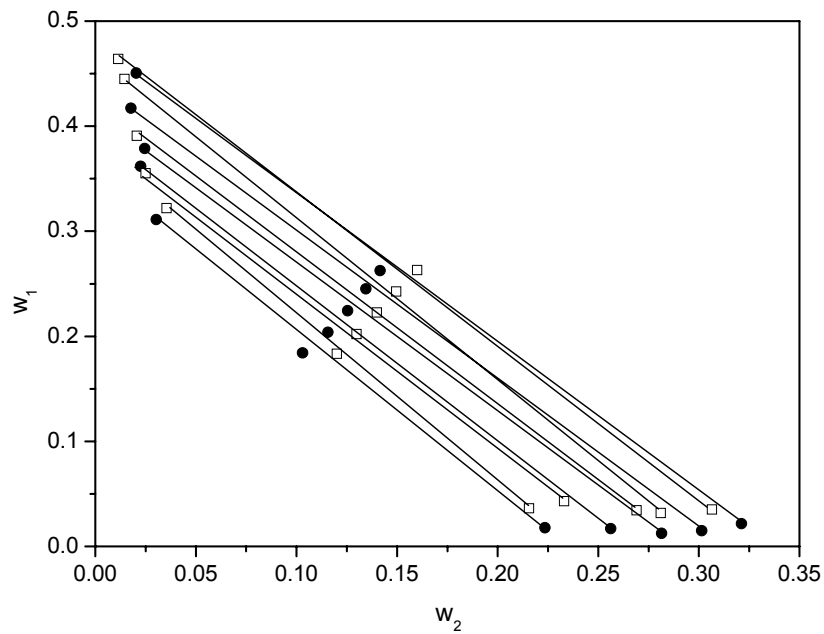


Figure 6. Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + Sodium citrate + Water (3) system at ((●) 10 °C (□) 45 °C).

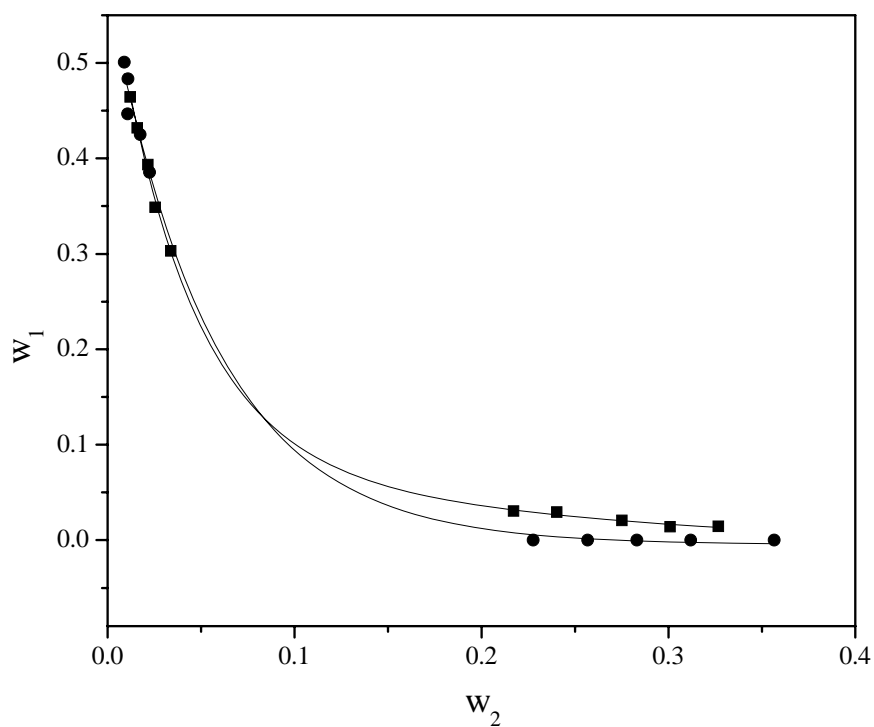


Figure 7. Effect of PEG molecular mass for systems PEG (1) + Sodium citrate (2) + Water (3) at 30 °C: (●) PEG 1500, (□) PEG 4000.

Conclusions

Equilibrium data for water + sodium citrate + polyethyleneglycol of (1500 and 4000) g.mol⁻¹ determined at different temperatures showed for the systems composed by PEG 4000 and PEG 1500 distinct behavior relative to the biphasic area. In the first, the temperature increase lead to the biphasic area increase and for PEG 1500 the biphasic area decrease on the temperature increase. The effect of polymer molar mass in the binodal curves promoted an enlargement of the biphasic area on the PEG molar mass increase.

Literature Cited

- (1) Albertsson, P. A. Partition of cell particles and macromolecules, 3rd Ed; John Wiley & Sons, 1960.
- (2) Hey, M. J.; Jackson, D. P.; Yan, H. The salting out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly (ethylene glycol). *Polymer*. **2005**, *46*, 2567-2572.
- (3) Gundüz, U.; Tolga, A. Optimization of bovine serum albumin sorption and recovery by hydrogels. *J. Chromatogr. B*, **2004**, *807*, 13-16.
- (4) Monteiro Filho, E. S.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A.; Silva, L. H. M.; Meirelles, A. J. A. Liquid-liquid equilibrium for ternary systems containing a sugar + a synthetic polymer + water. *J. Chem. Eng. Data*. **2002**, *47*, 1346-1350.
- (5) Silva, L. H. M.; Meirelles, A. J. A. Phase equilibrium and partitioning in aqueous mixtures of maltodextrin with polypropylene glycol. *Carbohydrate Polymers*. **2001**, *46*, 267-274.
- (6) Costa, M. J. L.; Cunha, M. T.; Cabral, J. M. S.; Aires-Barros, M. R. Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole broth extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase. *Bioseparation*. **2000**, *9*, 231-238.
- (7) Reh, G.; Nerli, B.; Picó, G. Isolation of alpha-1-antitrypsin from human plasma by partitioning in aqueous biphasic systems of polyethyleneglycol-phosphate. *J. Chromatogr. B*. **2002**, *780*, 389-396.
- (8) Zafarani-Moattar, M. T.; Hamidi, A. A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-potassium citrate system. *J. Chem. Eng. Data*. **2003**, *48*, 262-265.
- (9) Carvalho, C. P. Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Viçosa : UFV, 2004. 70f. : il..
- (10) Murugesan, T.; Perumalsamy, M. Liquid-liquid equilibria of poly (ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. *J. Chem. Eng. Data*. **2005**, *50*, 1392-1395.
- (11) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Hamidi, A. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib*. **2004**, *219*, 149-155.
- (12) Tubío G.; Pellegrini, L.; Nerli, B. B.; Pico, G. A. Liquid-liquid equilibria of

- aqueous two-phase systems containing poly (ethylene glycols) of different molecular weight and sodium citrate. *J. Chem. Eng. Data.* **2005**, *50*, 1392-1395
- (13) Ho-Gutierrez, I. V.; Cheluget, E. L.; Vera, J. H.; Weber, M. E; Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly(ethylene glycol) with Na₂SO₄ or NaCl. *J. Chem. Eng. Data.* **1994**, *39*, 245-248.
- (14) Cheluget, E. L.; Gelinas, S.; Vera, J. H.; Weber, M. E. Liquid-liquid equilibrium of aqueous mixtures of poly (propylene glycol) with NaCl. *J. Chem. Eng. Data.* **1994**, *39*, 127-130.
- (15) Ma, B.; Hu, M.; Li, S.; Jiang, Y.; Liu, Z. Liquid-liquid phase equilibrium in ternary system poly (ethylene glycol) + Cs₂CO₃ + H₂O. *J. Chem. Eng. Data.* **2005**, *50*, 792-795.
- (16) Gonzáles-Tello, P.; Camacho F.; Blázquez G.; Alarcón, F. J. Liquid-liquid equilibrium in the system poly (ethylene glycol) + MgSO₄ + H₂O at 298 K. *J. Chem. Eng. Data.* **1996**, *41*, 1333-1336.
- (17) Lei, X.; Diamond, A. D.; Hsu, J. T. Equilibrium phase behavior of the poly (ethylene glycol)/potassium phosphate/water two-phase system at 4°C. *J. Chem. Eng. Data* **1990**, *35*, 420-435.
- (18) Voros, N.; Proust, P.; Fredenslund, A. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol. *Fluid Phase Equilib.* **1993**, *90*, 333-353.
- (19) Zafarani-Moattar, M. T.; Sadeghi, R. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethyleneglycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate. Experiment and correlation. *Fluid Phase Equilib.* **2001**, *181*, 95-112.
- (20) Vernau, J.; Kula, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous poly (ethylene) glycol – citrate phase systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1990**, *12*, 397-404.
- (21) Sadeghi, R.; Zafarani-Moattar, M. T. Phase behavior of aqueous two-phase PEG + NaOH system at different temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2004**, *49*, 297-300.

CONCLUSÃO GERAL

- Dados de equilíbrio para sistemas PEG 1500 + citrato de sódio + água foram determinados nas temperaturas de (10, 35 e 45) °C.
- Foram também estudados os sistemas bifásicos PEG 4000 + ZnSO₄/CuSO₄ + água a (5, 10, 35 e 45) °C e PEG 4000 + citrato de sódio + água a (5, 10, 25, 35 e 45) °C.
- Para os sistemas aquosos compostos por PEG 4000 + sulfato de zinco, o aumento da temperatura causou a expansão da região bifásica, sendo observada uma pequena redução da mesma entre 35 °C e 45 °C. Também foi observado o efeito de cruzamento das binodais entre 25 °C e 45 °C.
- Verificou-se, também, um aumento da região bifásica com o aumento da temperatura nos sistemas PEG 4000 + sulfato de cobre + água.
- Os sistemas formados por PEG 1500/4000 e citrato de sódio apresentaram comportamentos distintos. No primeiro caso, não se observou o aumento da região bifásica com o aumento da temperatura. Porém, o efeito contrário foi verificado nos sistemas PEG 4000 + citrato.
- De maneira geral, ocorreu um aumento da inclinação da linha de amarração com o aumento da temperatura.
- O efeito da massa molar dos polímeros PEG 1500 e PEG 4000 foi analisado para o sistema PEG + citrato de sódio + água a temperatura de 45 °C, concluindo-se que houve aumento da região bifásica nos sistemas compostos pelo polímero de maior massa molar.
- O efeito do tipo de sal nos sistemas contendo PEG 4000 e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre foi também investigado, e o sistema contendo sulfato de cobre apresentou maior região bifásica.

APÊNDICE 1

Efeito do Tipo de Sal no Equilíbrio

Quanto ao efeito do tipo de sal sobre o equilíbrio dos sistemas compostos por PEG 4000 e os sais sulfato de zinco e sulfato de cobre, foi verificado que o sistema aquoso que contém sulfato de cobre apresentou maior região bifásica, quando comparado ao sistema contendo sulfato de zinco. As Fig 1-4 mostram o efeito do sal nos referidos sistemas, nas temperaturas de (5, 10, 35 e 45) °C.

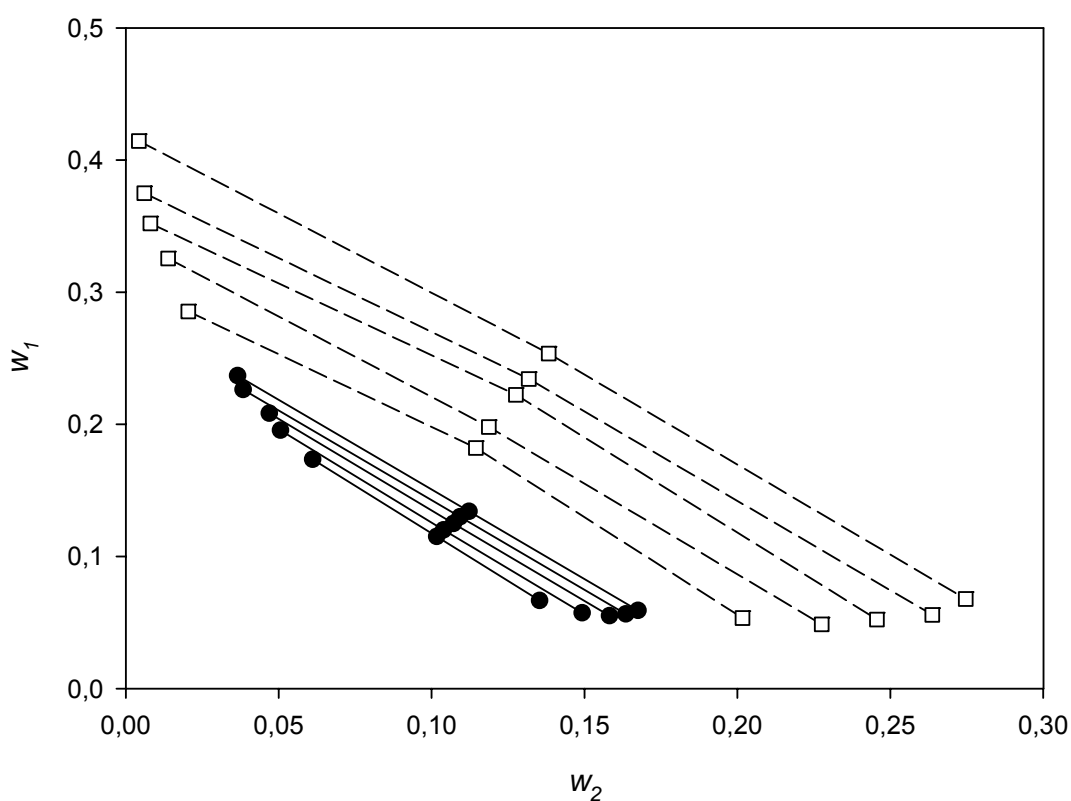


Figura 1. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 5 °C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H₂O : (●) sulfato de cobre, (□) sulfato de zinco

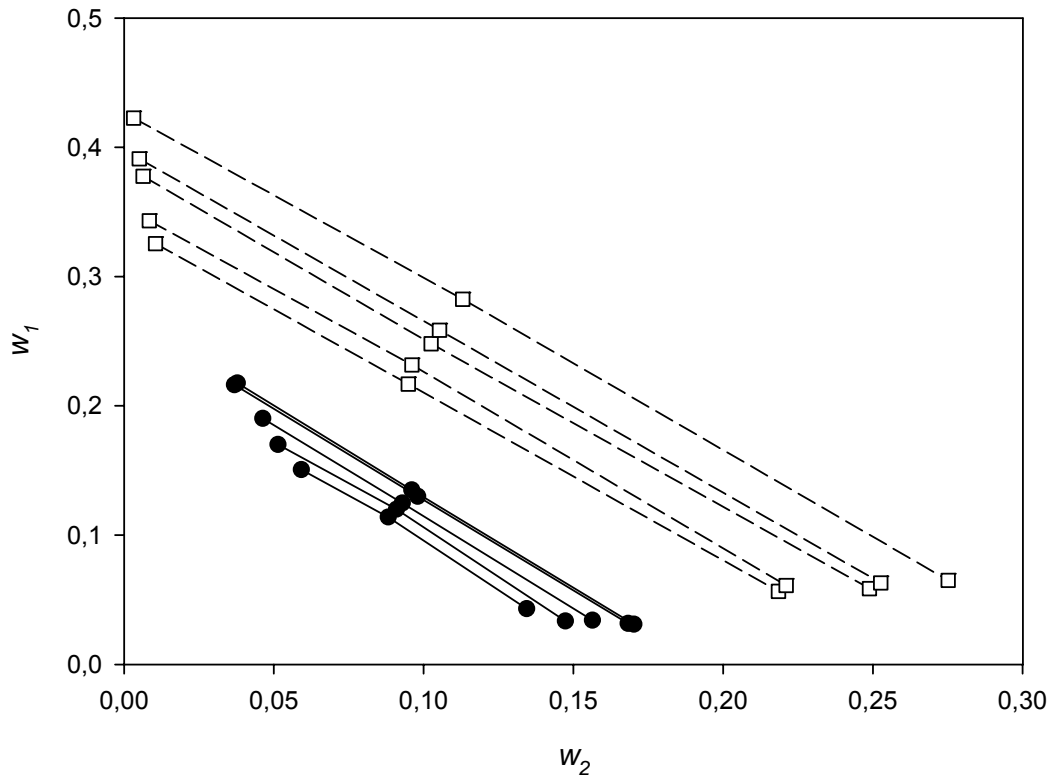


Figura 2. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 10 °C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H₂O : (●) sulfato de cobre, (□) sulfato de zinco

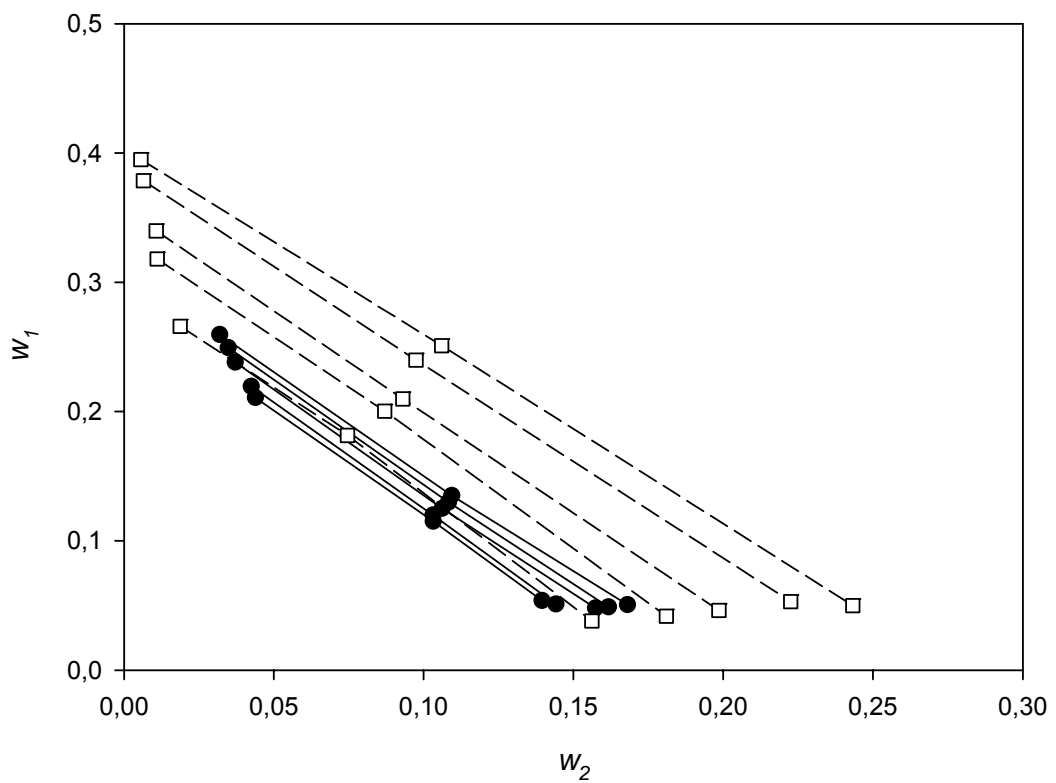


Figura 3. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 35 °C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H₂O : (●) sulfato de cobre, (□) sulfato de zinco

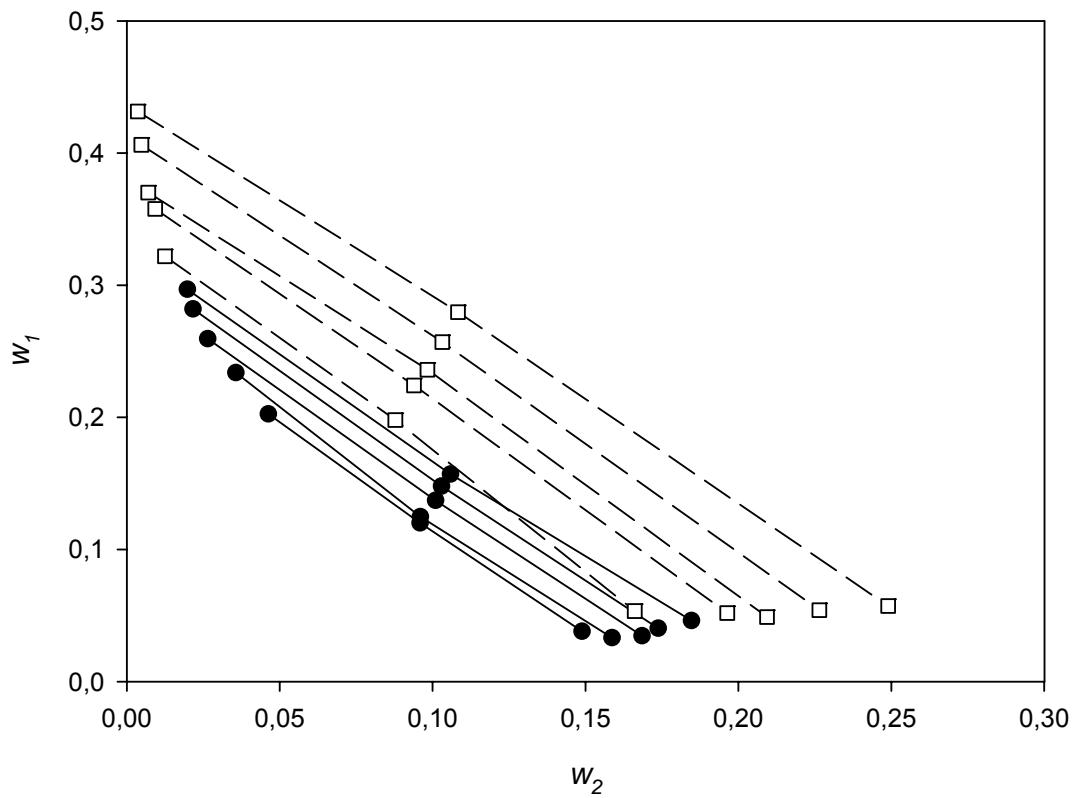


Figura 4. Efeito do tipo de sal na composição do equilíbrio de fases a 45 °C para sistemas PEG 4000 (1) + sal (2) + H₂O : (●) sulfato de cobre, (□) sulfato de zinco

APÊNDICE 2

Dados experimentais de equilíbrio para os sistemas PEG 1500 + citrato de sódio + H₂O e PEG 4000 + sulfato de zinco / sulfato de cobre / citrato de sódio, a diferentes temperaturas.

Tabela 1. Dados de equilíbrio para sistemas PEG (1) + ZnSO₄ (2) + H₂O (3)

Linha de amarração	composição global			fase superior			fase inferior		
	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
5 °C									
1	0,1821	0,1145	0,7034	0,2854	0,0205	0,6234	0,0534	0,2016	0,6836
2	0,1980	0,1187	0,6834	0,3255	0,0138	0,6006	0,0486	0,2276	0,6770
3	0,2223	0,1276	0,6501	0,3521	0,0081	0,5768	0,0522	0,2456	0,6230
4	0,2343	0,1318	0,6339	0,3749	0,0061	0,5630	0,0559	0,2637	0,6073
5	0,2535	0,1383	0,6082	0,4144	0,0043	0,5576	0,0678	0,2746	0,5779
10 °C									
1	0,2168	0,1266	0,6883	0,3255	0,0105	0,6036	0,0565	0,2185	0,6725
2	0,2316	0,1282	0,6723	0,3431	0,0084	0,5909	0,0611	0,2210	0,6523
3	0,2481	0,1368	0,6494	0,3776	0,0064	0,5639	0,0587	0,2488	0,6140
4	0,2584	0,1405	0,6363	0,3912	0,0051	0,5368	0,0631	0,2526	0,6405
5	0,2825	0,1509	0,6045	0,4226	0,0032	0,5183	0,0650	0,2751	0,6671
35 °C									
1	0,1816	0,0746	0,7438	0,2660	0,0187	0,6671	0,0380	0,1562	0,7917
2	0,2003	0,0870	0,7127	0,3180	0,0110	0,6097	0,0416	0,1811	0,7511
3	0,2098	0,0930	0,6971	0,3397	0,0108	0,5946	0,0462	0,1986	0,7448
4	0,2398	0,0975	0,6627	0,3786	0,0065	0,5480	0,0530	0,2225	0,7091
5	0,2510	0,1061	0,6429	0,3949	0,0056	0,5167	0,0498	0,2433	0,7232
45 °C									
1	0,1979	0,0878	0,7143	0,3219	0,0126	0,6197	0,0534	0,1661	0,7769
2	0,2241	0,0939	0,6820	0,3577	0,0093	0,5865	0,0519	0,1963	0,7551
3	0,2360	0,0983	0,6657	0,3701	0,0070	0,5717	0,0489	0,2093	0,7242
4	0,2569	0,1032	0,6399	0,4062	0,0048	0,5352	0,0541	0,2265	0,7102
5	0,2796	0,1083	0,6121	0,4315	0,0037	0,4981	0,0573	0,2489	0,7195

Tabela 2. Dados de equilíbrio para sistemas PEG (1) + CuSO₄ (2) + H₂O (3)

Linha de amarração	composição global			fase superior			fase inferior		
	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
5 °C									
1	0,1151	0,1017	0,7833	0,1736	0,0611	0,7275	0,0667	0,1353	0,7590
2	0,1201	0,1039	0,7760	0,1956	0,0505	0,7185	0,0574	0,1492	0,7754
3	0,1250	0,1072	0,7678	0,2084	0,0469	0,7094	0,0552	0,1582	0,7729
4	0,1300	0,1093	0,7607	0,2263	0,0384	0,7021	0,0565	0,1635	0,7468
5	0,1341	0,1122	0,7537	0,2368	0,0365	0,6967	0,0592	0,1675	0,7331
10 °C									
1	0,1140	0,0882	0,7978	0,1507	0,0592	0,7321	0,0432	0,1344	0,7546
2	0,1201	0,0910	0,7889	0,1701	0,0514	0,7277	0,0335	0,1473	0,7577
3	0,1248	0,0929	0,7823	0,1903	0,0463	0,7101	0,0342	0,1564	0,7459
4	0,1300	0,0980	0,7720	0,2163	0,0369	0,6925	0,0317	0,1683	0,7253
5	0,1350	0,0960	0,7690	0,2177	0,0378	0,6965	0,0312	0,1702	0,7358
35 °C									
1	0,1151	0,1032	0,7817	0,2108	0,0439	0,7103	0,0538	0,1395	0,7802
2	0,1200	0,1031	0,7769	0,2195	0,0425	0,7033	0,0512	0,1441	0,7723
3	0,1251	0,1062	0,7688	0,2382	0,0371	0,6901	0,0480	0,1574	0,7605
4	0,1300	0,1083	0,7617	0,2495	0,0348	0,6832	0,0489	0,1617	0,7675
5	0,1351	0,1094	0,7555	0,2596	0,0319	0,6751	0,0506	0,1681	0,7487
45 °C									
1	0,1200	0,0959	0,7841	0,2026	0,0463	0,6908	0,0381	0,1489	0,7749
2	0,1249	0,0960	0,7791	0,2338	0,0357	0,6886	0,0333	0,1587	0,7735
3	0,1371	0,1010	0,7620	0,2594	0,0265	0,6642	0,0347	0,1685	0,7454
4	0,1479	0,1030	0,7489	0,2821	0,0217	0,6557	0,0404	0,1738	0,7538
5	0,1570	0,1059	0,7372	0,2968	0,0198	0,6428	0,0463	0,1846	0,7209

Tabela 3. Dados de equilíbrio para sistemas PEG 1500 (1) + Citrato de sódio (2) + H₂O (3)

Linha de amarração	composição global			fase superior			fase inferior		
	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3	w_1	w_2	w_3
10 °C									
1	0,1843	0,1030	0,7127	0,3111	0,0303	0,6594	0,0176	0,2235	0,7237
2	0,2039	0,1157	0,6804	0,3620	0,0226	0,6129	0,0169	0,2562	0,7188
3	0,2244	0,1254	0,6503	0,3787	0,0245	0,5759	0,0123	0,2816	0,6917
4	0,2452	0,1345	0,6203	0,4171	0,0176	0,5414	0,0150	0,3014	0,6561
5	0,2625	0,1416	0,5959	0,4505	0,0204	0,5181	0,0215	0,3212	0,6665
35 °C									
1	0,1831	0,1200	0,6969	0,3029	0,0337	0,6034	0,0304	0,2171	0,7308
2	0,2025	0,1299	0,6676	0,3489	0,0254	0,5737	0,0294	0,2403	0,7129
3	0,2226	0,1400	0,6374	0,3935	0,0216	0,5378	0,0206	0,2752	0,6405
4	0,2425	0,1497	0,6078	0,4320	0,0158	0,4964	0,0141	0,3010	0,6599
5	0,2635	0,1603	0,5762	0,4645	0,0121	0,4620	0,0143	0,3267	0,6269
45 °C									
1	18.34	12.00	69.66	32.20	3.54	58.20	3.63	21.56	73.64
2	20.22	12.98	66.80	35.52	2.51	55.96	4.31	23.30	72.10
3	22.26	14.00	63.74	39.09	2.06	52.70	3.43	26.90	68.34
4	24.25	14.96	60.79	44.50	1.45	48.61	3.17	28.11	66.29
5	26.31	15.99	57.70	46.41	1.14	45.94	3.51	30.66	62.86

Tabela 4. Dados de equilíbrio para sistemas PEG 4000 (1) + Citrato de sódio (2) + H₂O (3)

Linha de amarração	composição global			fase superior			fase inferior		
	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
5 °C									
1	0,1832	0,1067	0,7101	0,3037	0,0370	0,6297	0,0266	0,2086	0,7246
2	0,2037	0,1157	0,6806	0,3435	0,0269	0,5913	0,0050	0,2326	0,6984
3	0,2243	0,1256	0,6502	0,3939	0,0226	0,5703	0,0093	0,2625	0,6620
4	0,2450	0,1345	0,6205	0,4307	0,0192	0,5339	0,0065	0,2888	0,6356
5	0,2624	0,1417	0,5959	0,4534	0,0146	0,5103	0,0084	0,3152	0,6093
10 °C									
1	0,1834	0,1076	0,7090	0,3114	0,0373	0,6677	0,0000	0,2514	0,7347
2	0,2039	0,1158	0,6803	0,3507	0,0287	0,5941	0,0000	0,2875	0,7175
3	0,2247	0,1254	0,6499	0,3957	0,0219	0,5465	0,0000	0,3224	0,6826
4	0,2451	0,1347	0,6202	0,4361	0,0169	0,5304	0,0000	0,3691	0,6437
5	0,2623	0,1418	0,5959	0,4665	0,0144	0,5054	0,0000	0,3773	0,6183
25 °C									
1	0,1829	0,1202	0,6969	0,3628	0,0242	0,5831	0,0019	0,2286	0,7202
2	0,2020	0,1299	0,6682	0,3875	0,0192	0,5572	0,0000	0,2562	0,6885
3	0,2221	0,1401	0,6378	0,4377	0,0126	0,5206	0,0000	0,2731	0,6771
4	0,2416	0,1500	0,6084	0,4669	0,0103	0,4958	0,0000	0,3089	0,6317
5	0,2629	0,1602	0,5770	0,5059	0,0091	0,4468	0,0000	0,3448	0,5977
35 °C									
1	0,1831	0,1201	0,6968	0,3853	0,0225	0,5830	0,0000	0,2277	0,7483
2	0,2027	0,1299	0,6673	0,4249	0,0175	0,5530	0,0000	0,2568	0,7057
3	0,2220	0,1414	0,6367	0,4465	0,0106	0,5200	0,0000	0,2831	0,6808
4	0,2422	0,1501	0,6077	0,4833	0,0108	0,4969	0,0000	0,3119	0,6542
5	0,2632	0,1605	0,5762	0,5006	0,0090	0,4744	0,0000	0,3566	0,5973
45 °C									
1	0,1831	0,1200	0,6968	0,3985	0,0145	0,5549	0,0000	0,2259	0,7228
2	0,2024	0,1300	0,6677	0,4336	0,0151	0,5262	0,0000	0,2395	0,7280
3	0,2225	0,1405	0,6370	0,4520	0,0116	0,5031	0,0000	0,2760	0,6877
4	0,2424	0,1496	0,6079	0,4998	0,0090	0,4717	0,0000	0,3053	0,6555
5	0,2633	0,1603	0,5764	0,5133	0,0070	0,4589	0,0000	0,3346	0,6100