



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Análisis y Control de Calidad Químicos...**

**APLICACIÓN DE SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS
EN LA EXTRACCIÓN DE BIOMOLÉCULAS A
PARTIR DE BIOMASA ALGAL**

Autor: Jaime Alcalde Mento

Tutores: David Moldes Plaza / Patricia Fernández Requejo

2023

RESUMEN

La creciente demanda de proteínas y la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero están impulsando la búsqueda de procesos sostenibles de biorrefinería basados en la valorización de los residuos. En este contexto, las microalgas se presentan como una solución prometedora, ya que pueden crecer rápidamente en aguas residuales, convirtiendo los nutrientes en biomasa rica en proteínas y otras biomoléculas. Los métodos tradicionales de extracción de proteínas requieren largos tiempos, utilizan reactivos perjudiciales y pueden dar lugar a la coextracción de otras biomoléculas. Por lo tanto, se necesitan métodos sostenibles y selectivos para la separación de proteínas de la biomasa microalgal.

En este trabajo, se ha evaluado el potencial de distintos sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) para la extracción selectiva de proteínas, procedentes de una biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis* crecida en purín de cerdo. Para ello, se han estudiado seis ATPSs formados por la combinación de dos disolventes con eutéctico profundo (ChCl:2Urea y Bet:2LA), cloruro de colina (ChCl) o betaína (Bet) con dos sales de fosfato. Primero, se construyeron los diagramas de fases de los ATPSs a 25 °C y presión atmosférica (ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₃PO₄, ChCl/K₂HPO₄, ChCl/K₃PO₄, Bet:2LA/K₃PO₄ y Bet/K₃PO₄). Después, se llevó a cabo un diseño factorial completo 6x3 por duplicado, para estudiar el efecto de dos factores: el tipo de ATPS (a seis niveles) y el tiempo de reposo (a tres niveles), monitorizando tres variables respuesta: el rendimiento en la recuperación de proteínas (% PRY), de carbohidratos (% CRY) y la ratio de las dos anteriores (PCR). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, siendo el tipo de ATPS un factor muy significativo y, en menor medida, el tiempo de reposo. Los ATPSs que proporcionaron mejores ratios fueron los de Bet/K₃PO₄ (PCR = 1,038) y Bet:2LA/K₃PO₄ (PCR = 1,001).

Por tanto, se puede concluir que los ATPSs presentan un gran potencial para la recuperación de proteínas a partir de biomasa microalgal.

Palabras clave: proteínas, biorrefinería, microalgas, extracción, ATPS.

ABSTRACT

The growing demand for proteins and the need to reduce greenhouse gas emissions are driving the search for sustainable biorefinery processes based on waste valorization. In this context, microalgae present a promising solution since they can grow rapidly in wastewater, converting nutrients into biomass rich in proteins and other biomolecules. Traditional protein extraction methods require long times, use harmful reagents, and can lead to co-extraction of other biomolecules. Therefore, sustainable and selective methods are needed for protein separation from microalgal biomass.

In this work, the potential of different aqueous two-phase systems (ATPSs) for the selective extraction of proteins from a biomass of the microalga *Scenedesmus almeriensis* grown in pig slurry. To this end, six ATPSs formed by combining two deep eutectic solvents (ChCl:2Urea and Bet:2LA), choline chloride (ChCl) or betaine (Bet) with two phosphate salts has been studied. First, phase diagrams of the ATPSs were constructed at 25 °C and atmospheric pressure (ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₃PO₄, ChCl/K₂HPO₄, ChCl/K₃PO₄, Bet:2LA/K₃PO₄ y Bet/K₃PO₄). Then, a 6x3 full factorial design was carried out in duplicate to study the effect of two factors: the type of ATPS (at six levels) and rest time (at three levels) for three response variables: the proteins recovery yield (% PRY), the carbohydrates recovery yield (% CRY) and the ratio of the two previous ones (PCR). The results obtained were analyzed using a two-way ANOVA, with the type of ATPS being a highly significant factor and, to a lesser extent, the rest time. The ATPSs that provided the best ratios were Bet/K₃PO₄ (PCR = 1,038) and Bet:2LA/K₃PO₄ (PCR = 1,001).

Therefore, it can be concluded that ATPSs have a great potential for protein recovery from microalgal biomass.

Keywords: proteins, biorefinery, microalgae, extraction, ATPSs.

TABLA DE ABREVIATURAS

ANOVA: *ANalysis Of VAriance* (análisis de varianza)

ATPSs/ABS: *Aqueous Two-Phase Systems/Aqueous Biphasic Systems* (sistemas bifásicos acuosos)

BCA: *Bicinchoninic acid* (ácido bicinconínico)

Bet: Betaína

BSA: *Bovine serum albumin* (albúmina de suero bovino)

ChCl: Cloruro de colina

CHs: Carbohidratos

CP: *Critical Point* (punto crítico)

CRY: *Carbohydrates recovery yield* (rendimiento de carbohidratos recuperados)

DESs: *Deep eutectic solvents* (disolventes eutécticos profundos)

FTIR: *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopía de infrarrojos por Transformada de Fourier)

H₀: Hipótesis nula

H₁: Hipótesis alternativa

HBA: *Hydrogen bond acceptor* (aceptor de enlaces de hidrógeno)

HBD: *Hydrogen bond donor* (donador de enlaces de hidrógeno)

ILs: *Ionic liquids* (líquidos iónicos)

LA: Ácido levulínico

LSD: *Least significant difference* (diferencia mínima significativa)

Modelo VFT: Modelo Vogel-Fulcher-Tamman

PCR: *Proteins/carbohydrates ratio* (relación entre las proteínas extraídas respecto a los carbohidratos recuperados)

Prot: Proteínas

PRY: *Proteins recovery yield* (rendimiento de proteínas recuperadas)

RSD: *Relative standard deviation* (desviación estándar relativa)

STL: *Slope of tie line* (pendiente de la línea de reparto)

TL: *Tie line* (línea de reparto)

TLL: *Tie line length* (longitud de la línea de reparto)

Tpc: *Top phase component* (composición de la fase superior)

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1-	Microalgas como fuente de proteínas	1
1.2-	Biorrefinería de microalgas	1
1.3-	Métodos convencionales de obtención de proteínas.....	4
1.4-	Disolventes con eutéctico profundo (DESS).....	6
1.5-	Sistemas bifásicos acuosos (ATPSs).....	8
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1-	Materiales, equipos y reactivos	13
3.2-	Preparación de DES y disoluciones de HBA.....	14
3.3-	Caracterización física de los DESs.....	16
3.3.1-	Densidad y viscosidad	16
3.3.2-	Contenido en agua	16
3.3.3-	Análisis espectroscópico	17
3.4-	Determinación de los diagramas de fases de los ATPSs	17
3.4.1-	Curvas binodales	17
3.4.2-	Rectas de reparto	19
3.5-	Caracterización de la biomasa	19
3.5.1-	Análisis de proteínas	20
3.5.2-	Análisis de carbohidratos	20
3.5.3-	Análisis de lípidos	21
3.5.4-	Análisis de humedad y cenizas.....	21
3.6-	Procedimiento de extracción	21
3.7-	Análisis de los extractos. Método de determinación de proteínas y de carbohidratos	22
3.7.1-	Método de determinación de proteínas: método del BCA.....	22
3.7.2-	Método de determinación de CHs: método del Fenol-Sulfúrico	24
3.8-	Diseño experimental	25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1-	Caracterización de la biomasa	28
4.2-	Caracterización de los DESs.....	28
4.3-	Diagramas de fase de los ATPSs	33
4.4-	Resultados del diseño experimental.....	37
4.4.1-	Matriz de diseño.....	37

4.4.2- ANOVA de dos vías.....	39
5. CONCLUSIONES	42
6. BIBLIOGRAFÍA	44
7. ANEXOS.....	47
7.1- Composiciones experimentales de las curvas binodales	47
7.2- Tablas de ANOVA	48
7.3- Tablas de medias.....	49
7.4- Prueba LSD de rangos múltiples.....	52
7.5- Gráficos de interacción	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Microalgas como fuente de proteínas

El aumento de la población mundial y el consumo de reservas de combustible naturales ha llevado a la búsqueda de nuevas materias primas alternativas para reemplazar las fuentes actuales sobreexplotadas. Una de las materias primas de base biológica más prometedoras son las microalgas. Su aplicación para el tratamiento de aguas residuales y la valorización de la biomasa generada podría resultar en múltiples beneficios: recuperación de nutrientes, recuperación del agua para su uso, producción de biomasa beneficiosa, etc. La valorización integral y fraccionada de la biomasa podría minimizar o incluso aprovechar los flujos de residuos, promoviendo una bioeconomía circular. Por tanto, la fracción proteica extraída de la biomasa puede ser un recurso aprovechable como péptidos funcionales en la industria, bioestimulantes en la agricultura o aminoácidos para la alimentación animal. La composición de aminoácidos y el tamaño de estos compuestos son parámetros clave para sus posibles usos y aplicaciones. Finalmente, los residuos producidos al final del proceso de valorización podrían ser utilizados para la producción de biogás y fertilizantes mediante digestión anaerobia [1].

Las microalgas son los organismos más simples del reino vegetal que con una gran adaptación al medio han dado origen a unas 100000 especies descubiertas [2]. Son unos organismos unicelulares muy variados en tamaño y forma, son eucariotas principalmente y viven la mayoría en ambientes acuáticos. Además, son fotoautótrofos, capaces de utilizar el carbono inorgánico en forma de CO₂ y la energía del sol para generar biomoléculas para su alimentación [2],[3]. Algunas de las ventajas de las microalgas son las siguientes: crecimiento celular rápido, mayor productividad y en condiciones climáticas adversas respecto a los cultivos tradicionales, gran sostenibilidad (son capaces de almacenar el CO₂ y producir O₂ para reducir el efecto invernadero), producción de biomasa para productos de valor añadido o capacidad de eliminar (absorber) nutrientes de aguas residuales [4],[5].

Por otro lado, también presentan algunas desventajas: El cultivo de microalgas es costoso porque se realizan en sistemas específicos y complejos para mantener las células de microalgas a altas tasas de productividad de biomasa y biocompuestos. Esos costes también se asocian al alto consumo energético [6]. Además, otras limitaciones son la dificultad de la extracción proteica debido a la pared celular tan rígida que posee [7], el desconocimiento relacionado con la seguridad alimentaria por la presencia de contaminantes o alérgenos generados durante su procesamiento o los largos tiempos requeridos [5],[8]

1.2- Biorrefinería de microalgas

El concepto de biorrefinería utilizando microalgas para el tratamiento de aguas residuales ha surgido como una alternativa prometedora a las actuales plantas de tratamiento ya que permite la producción de químicos verdes o biocombustibles (biodiesel, bioetanol) a partir

de la biomasa microalgal generada así como la valorización de los biocompuestos presentes en la biomasa [6].

Una biorrefinería se define como el proceso para obtener biocombustible, energía y productos de alto valor a través de la transformación de la biomasa y equipos de proceso [9]. Este concepto es similar a la refinería tradicional del petróleo, pero las principales diferencias están en términos de la materia prima (biomasa respecto al petróleo crudo) y de la tecnología empleada [9],[10]. Además, la biorrefinería es una forma prometedora para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), donde las emisiones de las refinerías de los combustibles fósiles han contribuido bastante al calentamiento global [9].

En el caso de las biorrefinerías basadas en microalgas, el principal objetivo se basa en la explotación máxima de la biomasa microalgal usando la energía mínima. No obstante, la principal desventaja que presentan, aparte de los costes energéticos y económicos, es la separación de las diferentes fracciones sin dañar al resto. Este problema se puede solventar mediante procesos de separación más simples, de bajo consumo energético, económicos y fácilmente escalables [9],[11].

Las microalgas están compuestas principalmente por proteínas, lípidos y carbohidratos y, en menor medida, de pigmentos, vitaminas y ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) [9]. Los lípidos pueden ser usados como fuente de biocombustibles, como bloques de construcción en la industria química o aceites comestibles para la alimentación, los carbohidratos pueden utilizarse como una fuente de carbono en industrias de fermentación o para producir etanol, mientras que las proteínas pueden usarse como péptidos útiles en la industria, bioestimulantes en la agricultura o aminoácidos para la alimentación animal [9],[11]. Y en menor medida, los pigmentos se emplean como precursores de vitaminas en alimentación o en la industria farmacéutica y las vitaminas y los PUFAs se utilizan como suplementación en la industria alimentaria [9]. Por todo esto, la biomasa microalgal se puede considerar como una potencial alternativa como fuente renovable [9],[11].

En general, los procesos implicados en la valorización de la biomasa (ruptura de la pared celular de las materias primas, desarrollo de nuevas plantas y de nuevas tecnologías centradas en las materias primas) se dividen en cuatro grupos: procesos físicos (implica la homogenización, destrucción o separación de las partículas de biomasa), procesos térmicos (gasificación para obtener biogás o la pirólisis para producir biocombustible), procesos químicos (hidrólisis, esterificación y transesterificación) y procesos bioquímicos (digestión anaeróbica por bacterias o fermentación por enzimas/microorganismos) [10].

Hay dos etapas principales de la biorrefinería:

- “Procesamiento ascendente” (USP): se basa en el crecimiento de la biomasa. La eficiencia depende de cuatro factores: la cepa de la microalga, suministro de CO₂, fuente de nutrientes de N y P, y una fuente de iluminación (intensidad y fuente influyen en la velocidad de fotosíntesis) [9], aunque también afecta la temperatura, el pH, y el O₂ disuelto [12].

Dentro de los sistemas de producción de microalgas, destacan dos (*Figura 1*):

- a) Fotobiorreactores abiertos: son grandes estanques con poca profundidad, aumentando la productividad mediante una mejor penetración de la luz. Los

más extendidos a nivel mundial son de tipo *raceway*. Éstos se dividen en tres partes: un foso bajo el suelo (2-3 metros) para la inyección de gases, un canal en forma de U por donde circulan las microalgas para su crecimiento y unas palas para impulsar el cultivo a lo largo del canal. Sus principales ventajas son el bajo coste y fácil escalado, pero por contra se relacionan con una mayor posibilidad de contaminación junto a la escasez de control de las condiciones de operación.

- b) Fotobiorreactores cerrados: estos requieren de una barrera física de separación del cultivo de las microalgas con el ambiente que lo rodea. Hay diferentes modelos como: paneles planos, columnas de burbujeo, pero los más extendidos son los de tipo *tubular*. A diferencia de los abiertos, sus principales ventajas son la minimización de la contaminación y mayor control de las condiciones de operación. En cuanto a sus desventajas, destacan sus elevados costes económicos y energéticos, y un difícil escalado. [12].

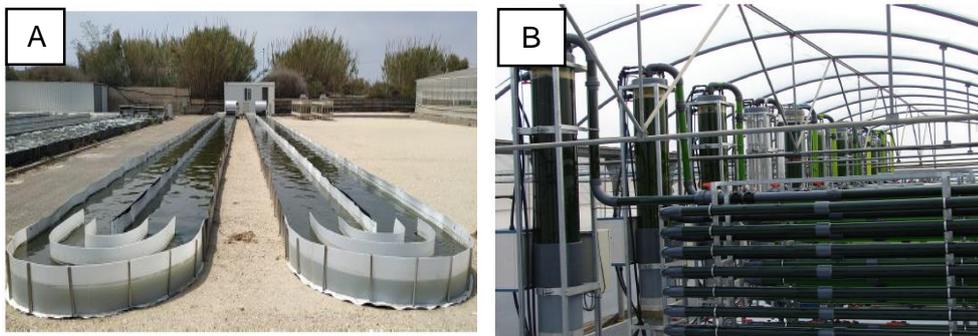


Figura 1: Fotobiorreactor abierto tipo Raceway (A) y fotobiorreactor cerrado de tipo tubular (B) [12]

- “Procesamiento descendente” (DSP): son los procesos unitarios que ocurren dentro del fotobiorreactor para obtener compuestos valiosos. Éstos se llevan a cabo en unas condiciones suaves, que no implican presiones elevadas y disolventes que afecten a los productos deseados sin dañar otras fracciones [9], o que puedan desnaturalizar a la fracción proteica [11]. En general, este procesamiento se divide en tres etapas:
- 1) Ruptura específica de la pared celular seguida de los orgánulos: se propone primero romper la célula para liberar los componentes del citoplasma (lípidos, proteínas, carbohidratos...), y segundo, fraccionar sus diferentes orgánulos (lisosomas, mitocondrias, etc).
 - 2) Extracción y fraccionamiento de los componentes obtenidos: todos los componentes necesitan ser funcionales después de la separación [11]. Según estudios recientes, la mejor secuencia para la valorización de la biomasa es extraer primero las proteínas seguido de los carbohidratos y lípidos porque en este orden se disminuye la pérdida de proteína y puede mejorar la recuperación de los disolventes empleados en la etapa de extracción de lípidos [6].
 - 3) Separación de las diferentes fracciones para obtener los productos específicos: aislamiento y purificación [11].

1.3- Métodos convencionales de obtención de proteínas

La extracción de proteínas de microalgas está influenciada por la naturaleza propia de la microalga y sus condiciones de cultivo, ya que pueden influir en la composición y rigidez de su pared celular entre otros aspectos. Para llevar a cabo la liberación de los componentes internos de la célula, hay que romper primero la pared celular (*Figura 2*). El progreso límite en la caracterización proteica está asociado a las dificultades en romper la pared celular y las pobres eficiencias de extracción y rendimientos [7]. Además, el grado de complejidad para recuperar proteínas aumenta a medida que lo hace la pureza deseada que queramos obtener. Un gran número de técnicas han sido evaluadas para la ruptura celular de las microalgas, dividiéndose en métodos mecánicos (homogeneizadores de alta presión, etc.), o métodos no mecánicos basados en agentes químicos, enzimas o métodos físico-químicos (microondas, campo eléctrico pulsado, líquidos iónicos -ILs-, etc.) [6].

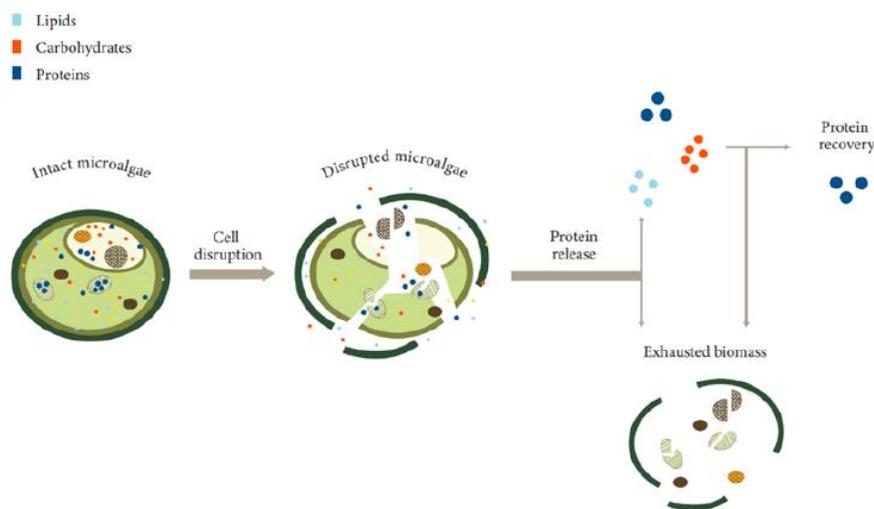


Figura 2: Esquema general de obtención de proteínas a partir de biomasa algal [13].

Después de romper la pared celular, se procede a la recuperación de proteínas. Tanto los factores intrínsecos (la especie, la rigidez de la pared celular, composición o condiciones de cultivo) como los extrínsecos (pH, tiempo de contacto y temperatura que influyen en la solubilización de las proteínas y bioactividad) afectan a la extracción de proteínas [7]. Para la recuperación de proteínas se emplean diferentes técnicas como: precipitación química, electroforesis, filtración por membrana, cromatografía o extracción con disolventes. Estos métodos presentan varias desventajas tales como uso de disolventes tóxicos, alto contenido en impurezas, tiempos largos o uso de altas temperaturas que conllevan el consiguiente gasto energético [13]. A continuación, se detallan brevemente:

➤ Precipitación

La precipitación es un proceso que consiste en la obtención de un sólido desde una disolución, añadiendo un agente precipitante. Según éste, se puede hablar de precipitación de punto isoeléctrico (se emplea NaOH o HCl para el cambio del pH), *salting-out* (se usa sales de elevada concentración como NaCl) y de precipitación con disolventes orgánicos,

(ácido tricloroacético o mezclas etanol/acetona) [13],[14]. Éste último es uno de los más usados y presenta la ventaja de una buena recuperación de proteínas crudas manteniendo su actividad, pero también tiene como inconvenientes: bajas eficiencias en las de purificación y la toxicidad de los disolventes utilizados [13].

➤ Filtración por membrana

Las membranas (semipermeables) actúan como un filtro que dejará pasar el agua, mientras que retiene los sólidos suspendidos a través de: alta presión, manteniendo un gradiente de concentración a ambos lados de membrana o aplicando un potencial eléctrico. Presenta ventajas como: una alta selectividad, no precisan del uso de disolventes, ni de condiciones agresivas para las proteínas. Sin embargo, suelen implicar largos tiempos de filtración y la necesidad de acondicionar las membranas tras varios usos lo cual hace que su aplicación esté poco extendida en la industria. Los últimos estudios hablan del uso de micro y ultrafiltración, basados en una fuerza de presión externa, como mejora al actual sistema de filtración por membrana [13].

➤ Electroforesis y técnicas cromatográficas

La electroforesis separa analitos según su movilidad en un tampón acuoso en respuesta a un campo eléctrico, siendo la electroforesis capilar la técnica más común. Tiene como ventaja identificar y cuantificar aminoácidos, pero como desventaja, los largos tiempos y baja ingesta de muestras (poca aplicación industrial).

En cambio, las técnicas cromatográficas permiten separar moléculas químicamente muy similares en mezclas complejas [13]. En la purificación de proteínas se utiliza la cromatografía permeable en gel, de intercambio iónico, de afinidad y/o de interacción hidrofóbica, pudiendo llegar a combinarse [13],[14]. Estas técnicas presentan una serie de inconvenientes: son costosas, difíciles de escalar a nivel industrial e implican el consumo de grandes cantidades de disolventes orgánicos que son contaminantes para el medio ambiente [13].

➤ Surfactantes

Los surfactantes/tensioactivos pueden separar proteínas específicas, provocando su transferencia entre una disolución acuosa y fase orgánica micelar inversa. La eficiencia en la extracción depende del pH, fuerza iónica y el tipo de sal usada en la fase acuosa, así como del tipo de surfactante y disolvente. La transferencia a la fase orgánica se consigue gracias a las interacciones electrostáticas entre los grupos cabeza de los surfactantes y las proteínas. Recientemente, el empleo de surfactantes aniónicos, capaces de unirse a proteínas específicas para hacerlas insolubles, ha reducido la cantidad de surfactante empleada y la energía aplicada a la recuperación proteica en comparación con la extracción de surfactantes micelar inversa [11].

➤ Extracción con disolventes

La extracción con disolventes es capaz de liberar las proteínas desde dentro de la célula de la biomasa mediante una extracción sólido-líquido. Como disolventes, se emplean hidrocarburos, álcalis, acetona, alcoholes y cloroalcanos. Estas técnicas son ampliamente utilizadas, pero presentan ciertos inconvenientes como: largos tiempos operacionales,

elevado consumo de disolventes y energía, además los disolventes utilizados suelen ser compuestos orgánicos volátiles derivados del petróleo.

Como posible solución, se propone reemplazar estos disolventes convencionales y contaminantes por otros compuestos más sostenibles tanto química como medioambientalmente. En este contexto, en las últimas décadas se está investigando el uso de dos nuevos tipos de disolventes como agentes de extracción: los líquidos iónicos (ILs) y los disolventes con eutéctico profundo (DESS). Otra alternativa de llevar a cabo la extracción de proteínas es mediante técnicas de separación basadas en los sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) [13]. En este Trabajo Fin de Master se ha estudiado la aplicación de diferentes ATPSs formados por DESS para la recuperación de proteínas a partir de biomasa algal.

1.4- Disolventes con eutéctico profundo (DESS)

Hoy en día en la industria se emplean en gran medida los métodos de extracción con disolventes. Los disolventes más comúnmente utilizados son derivados del petróleo que presentan cierta toxicidad y no son biodegradables. Por ello, los ILs y DESS se proponen como una alternativa sostenible a esos disolventes tradicionales en los procesos de extracción por sus interesantes propiedades físico-químicas [13].

Los DESS son compuestos formados a partir de una mezcla eutéctica de ácidos y bases de Lewis o Brønsted que pueden contener diversas especies aniónicas y/o catiónicas debido a la formación de un complejo de enlace de hidrógeno entre uno o más donadores de enlace de hidrógeno (HBDs) y uno o más aceptores de hidrógeno (HBAs), con unas proporciones estequiométricas bien definidas [15],[16]. En cambio, los ILs son compuestos formados por iones grandes y asimétricos, y son líquidos a temperaturas < 100 °C [16].

En 2003, Abbot et al. utilizaron por primera vez el término de DES para describir la mezcla entre una sal de amonio cuaternario (cloruro de colina, ChCl) con un punto de fusión de 302 °C y una amida (urea), con un punto de fusión de 133 °C, en proporción molar (1:2). El resultado fue un líquido con un punto de fusión de 12 °C [15],[17]. Los DESS comparten muchas de las propiedades interesantes de los ILs, como alta estabilidad térmica, baja volatilidad, baja presión de vapor, compatibilidad con el agua, no inflamabilidad y una polaridad modificable. Sin embargo, los ILs convencionales tienden a ser caros, no biodegradables y pueden tener altas toxicidades mientras que los DESS, suelen ser baratos, biodegradables, no tóxicos y fáciles de preparar. Por tanto, se consideran una alternativa más barata y verde que los ILs [15],[16],[17]. De hecho, hay un subgrupo de DESS que son una alternativa más verde y que están formados por compuestos naturales (ácidos, aminoácidos, azúcares o alcoholes) que se conocen como disolventes con eutéctico profundo formados por productos naturales (NADES) [15]. En este trabajo en el que se presenta el uso de dos NADES como compuestos formados de sistemas bifásicos acuosos para la extracción de proteínas de biomasa algal, siempre se usará el acrónimo de DES por simplicidad. Además, a ambos disolventes se les conocen como disolventes de diseño porque sus propiedades físico-químicas pueden ser adaptadas a una aplicación específica mediante la combinación de distintos aniones y cationes en el caso de los ILs y la combinación de distintos HBA y HBD, así como la modificación de la relación molar en la mezcla en el caso de los DESS [13].

Una de las principales características de los DESs es que presentan un punto de fusión mucho menor que el de sus compuestos de partida y el de la mezcla teórica o ideal. El concepto de “eutéctico” (fusión fácil o más baja en griego) fue usado por F. Guthrie en 1884 para describir “una temperatura más baja de licuefacción que la dada por otra proporción”, donde el punto eutéctico es un punto isobárico invariante del sistema, el cual representa la composición y la temperatura de fusión mínima en la intersección entre dos curvas de fusión. Esta temperatura mínima de la mezcla es menor que el de los constituyentes puros por separado. En la *Figura 3*, se representa este comportamiento, representando la temperatura en función de la fracción molar: la ΔT_2 es la diferencia de temperatura entre la ideal ($T_{E, ideal}$) y la real (T_E) mientras ΔT_1 es la diferencia de temperatura entre la temperatura de fusión combinada de cada componente puro (T_m) y la real (T_E) [15].

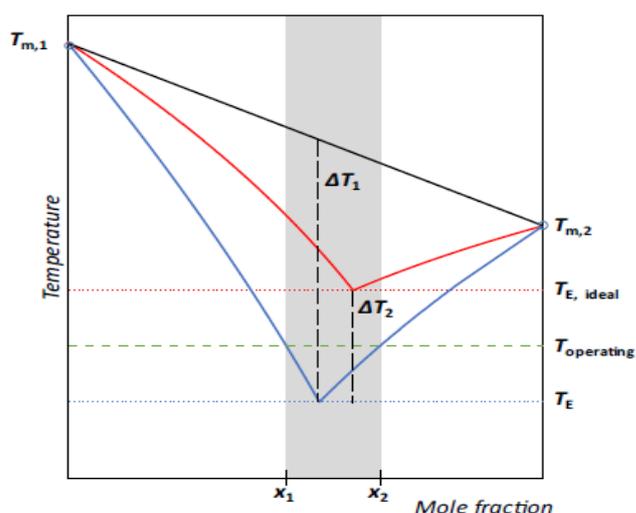


Figura 3: Comparación entre el punto eutéctico de una mezcla ideal (rojo) respecto al eutéctico profundo de una mezcla no ideal [15].

Los DESs se pueden describir mediante la fórmula $Cat^+ X^- zY$, donde Cat^+ es un catión, X^- es una base de Lewis y zY es el n^o (z) de Y moléculas de ácido de Brønsted o Lewis. La clasificación de los DESs, recogida en la *Tabla 1*, depende de la naturaleza del agente complejante usado, donde la mayoría de sistemas emplean el cloruro de colina (ChCl) como HBA [16].

Tabla 1: Clasificación de los DESs [13],[16]

Tipo	Fórmula general	Términos
I-HBA y cloruros metálicos	$Cat^+ X^- zMCl_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II-HBA y cloruros metálicos hidratados	$Cat^+ X^- zMCl_x \cdot yH_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III-HBA y HBD	$Cat^+ X^- zRZ$	Z = $CONH_2$, $COOH$, OH
IV-Cloruros metálicos y HBD	$MCl_x + RZ = MCl_{x-1}^+ \cdot RZ + MCl_{x+1}$	M = Al, Zn y Z = $CONH_2$, OH
V-Compuestos moleculares	DESs no iónicos	Sustancias moleculares

Cat⁺: catión amonio, sulfonio o fosfonio; X⁻: base de Lewis (anión haluro); z: coeficiente estequiométrico; M: metal; HBA: aceptor de enlace de hidrógeno; HBD: donador de enlace de hidrógeno; R: resto alquilo.

Concretamente, en este trabajo se han empleado DESs de tipo III, ya que son particularmente versátiles y fáciles de preparar [16] y son ampliamente utilizados como agentes de extracción en diferentes aplicaciones [13].

La caracterización termodinámica, es decir, la información acerca de los diagramas de fase líquido-sólido y de las interacciones en la fase líquida, es esencial en la selección de un DES para una aplicación dada [15]. Caben destacar para aplicaciones de acabado metálico (deposición, disolución o procesamiento del metal), de síntesis orgánica y de nanomateriales, de procesamiento de la biomasa, etc. [16],[17]. Y, específicamente, para los DES, se está investigando su aplicación en la industria alimentaria, cosmética, agroquímica o farmacéutica [15]. No obstante, debido a la multitud de posibilidades para formar nuevos DESs (10^6 - 10^8 combinaciones estimadas) [17] y con estudios en mayor profundidad sobre sus interacciones, nos conducirá a un mejor conocimiento respecto a las propiedades y nuevas aplicaciones serán mejoradas en un futuro.

1.5- Sistemas bifásicos acuosos (ATPSs)

Como alternativa a las técnicas convencionales de extracción líquido-líquido, Per-Åke Albertsson propuso en 1986 el uso de sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) para recuperar y purificar biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos [18].

Los ATPSs están compuestos por dos fases líquidas que son inmiscibles a partir de una composición crítica de sus componentes. Algunos de los compuestos utilizados en la formación de ATPSs son polímeros (polietilenglicol (PEG), dextrano...), sales (fosfatos, carbonatos...), alcoholes de cadena corta (propanol, glicerol, ...) [18],[19] o nuevos disolventes como los ILs o DESs [13]. Esta técnica de separación presenta muchas ventajas sobre otros procesos de extracción convencionales como: simplicidad, biocompatibilidad, facilidad de escalado, bajo coste o ser una técnica de separación respetuosa con el medio ambiente debido a su alto contenido en agua (presencia de más del 80% en ambas fases). Sin embargo, su aplicación industrial es aún escasa debido al desconocimiento de los mecanismos que rigen la partición de biomoléculas en este tipo de sistemas [18],[19]. En la *Tabla 2* se recogen algunos ejemplos de formación de ATPSs:

Tabla 2: Ejemplos de sistemas bifásicos acuosos.

Tipo de ATPS	Composición	Producto	Resultados	Ref.
Polímero/Polímero	PEG 20000/ Dextrano T500	Quitinasa	Recuperación (fase bottom) = 85,2%	[20]
Polímero/Sal	PEG/K ₂ HPO ₄	B-ficoeritrina	Recuperación = 90% Factor de purificación = 4	[18]
Alcohol/Sal	Etanol/K ₂ HPO ₄	2,3- butenodiol	Recuperación = 98%	[18]
ATPSs basados en ILs	Yoduro de 1,3- dietilimidazolio/ K ₂ HPO ₄	Curcuminoide s	Extracción = 96% Pureza ≥ 51%	[21]
ATPSs basados en DESs	ChCl/Glicerol	Seroalbúmina bovina (BSA) y Tripsina (Try)	Extracción BSA = 98,16% Extracción Try= 94,36%	[22]
	Betaína/Urea	BSA	Extracción BSA = 99,82%	[23]

El comportamiento de los ATPSs se puede caracterizar mediante un diagrama de fases construido bajo condiciones específicas de presión y temperatura. Este diagrama aporta información sobre la distribución de los distintos componentes en las dos fases formadas [18],[19]. Los sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) son sistemas ternarios ya que están formados por agua (su componente principal), y de otros dos componentes solubles en agua. Aunque tiene tres componentes se suelen representar en dos dimensiones para una mejor visualización, por ello la composición del agua no se suele representar [24].

En los diagramas de fases de los ATPSs, como el ejemplo que se encuentra en la *Figura 4*, se puede observar lo que se denomina curva binodal (TCB), que es la línea que marca el límite entre las dos regiones: miscible e inmisible. En el *eje x* se representa la composición de la fase inferior (*bottom, B*) mientras que en el *eje y*, la composición de la fase superior (*top, T*). Por encima de la curva binodal, nos encontramos con la región bifásica, es decir, las composiciones a las que la mezcla forma una mezcla inmisible (dos fases) y por debajo de la curva nos encontramos con la región monofásica, donde las composiciones forman una sola fase [18],[19].

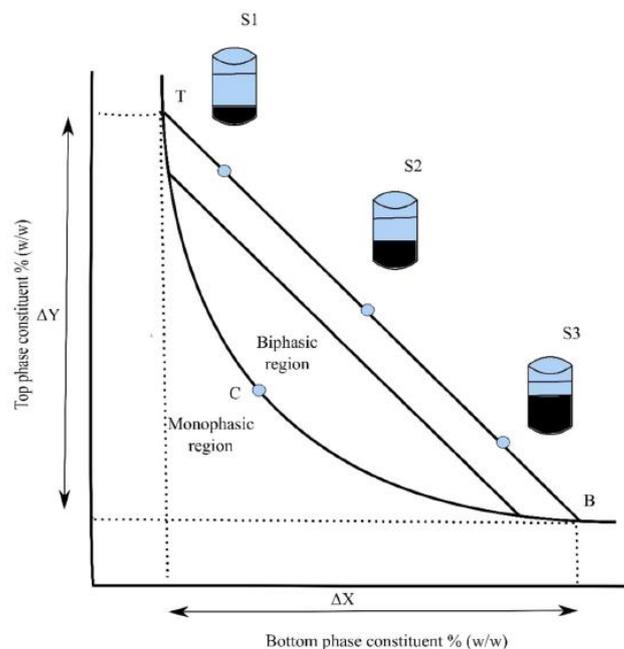


Figura 4: Representación esquemática de un diagrama de fases de ATPS [18]

Para entender el comportamiento de los componentes de un ATPS, además de la curva binodal, es necesario conocer cómo se distribuyen los componentes en la región inmisible. Para ello, se determinan las líneas de reparto. La línea T-B es una línea de reparto (tie-line en inglés, TL) que conecta dos puntos sobre la curva binodal. En la Figura 4 se observan diferentes sistemas (S1, S2, S3) que tienen la misma composición de equilibrio de las fases superior e inferior por pertenecer a la misma TL [18]. Otro punto característico del diagrama de fases es el punto CP que se denomina punto crítico, justo por encima de este punto el volumen de ambas fases es teóricamente igual. En el punto CP, la longitud de la línea de reparto (TLL) es igual a cero [18],[19],[24].

Experimentalmente, la curva binodal se puede obtener mediante tres métodos: el método de valoración turbidimétrico, el método de determinación de nodo y el método del punto de niebla (“cloud point method”), siendo éste último el utilizado en este trabajo [18].

Dos parámetros característicos de las rectas de reparto son la longitud, TLL (ec. 1), y la pendiente de las TLs, STL (ec. 2), que pueden calcularse mediante las siguientes expresiones [24]:

$$TLL = \sqrt{([dv]^T - [dv]^B)^2 + ([sal]^T - [sal]^B)^2} \quad (1)$$

$$STL = \frac{[dv]^T - [dv]^B}{[sal]^T - [sal]^B} = \frac{\Delta[1]}{\Delta[2]} \quad (2)$$

donde $[dv]$ es la concentración del disolvente utilizado, $[sal]$ es la concentración de la sal, T se refiere a la fase superior (*top*) y B es la fase inferior (*bottom*) de la línea de reparto.

La TLL tiene unidades de concentración y es un parámetro ampliamente utilizado para caracterizar ATPS porque proporciona información relevante de la amplitud de la región bifásica. Cuanto mayor sea el valor de la TLL, mayor es la separación y la diferencia entre las composiciones del disolvente y la sal en las dos fases. Por otro lado, la STL tiene unidades adimensionales y suelen ser paralelas en este tipo de sistemas ternarios.

Cuando el ATPS se aplica a la separación de biomoléculas (en nuestro caso proteínas), la relación de equilibrio entre las dos fases inmiscibles del ATPS determinan el reparto de las biomoléculas, definiéndose el coeficiente de partición para un soluto A (K):

$$K = \frac{C_{AT}}{C_{AB}} \quad (3)$$

donde C_{AT} es la concentración del componente A en la fase superior y C_{AB} es la concentración de la del componente A en la fase inferior en el equilibrio dando así una idea de cómo se reparte el soluto entre las dos fases del ATPS [18],[19].

Las separaciones de fases en los ATPSs dependen de varios factores, entre ellos:

- ✓ Naturaleza de los compuestos formadores del ATPS: Uno de los tipos de compuestos más usados para la formación de ATPS son los polímeros. En este caso el peso molecular (P_M) y su concentración influye enormemente en la separación de fases. A mayor P_M , más baja es la concentración de polímero necesaria para la separación de fases; a mayor diferencia entre los PM de los polímeros, mayor asimetría de la curva binodal. El tipo de compuesto usado, IL, DES, sales...influye en la distribución de los componentes entre las fases formadas y en el reparto de los solutos a extraer.
- ✓ Hidrofobicidad y presencia de sales neutras: tanto el efecto hidrofóbico como el *salting-out* (transferencia de la biomolécula de la fase rica en sal a la fase rica en polímero o disolvente influyen en la interacción hidrofóbica. La adición de sales tipo NaCl en alta concentración (> 1 M) provoca que los iones hidrofóbicos fueren la transferencia de los contraiones a la fase más hidrofóbica, y viceversa.
- ✓ pH: puede modificar la carga y las propiedades de la superficie del soluto. En el caso de las proteínas, cuando el $pH > pI$ (punto isoeléctrico de la proteína), aumenta el K y las biomoléculas se transfieren preferiblemente a la fase rica en disolvente (polímero, IL...). Esto se explica por las interacciones electrostáticas que se establecen entre la biomolécula y las unidades del disolvente [18],[19].

- ✓ Temperatura: en principio, la separación de fases se obtiene a temperaturas bajas en los ATPS polímero/polímero mientras que a temperaturas altas en ATPSs tipo polímero/sal. El reparto de las biomoléculas y la separación de fases se pueden explicar en base a las propiedades físico-químicas de los ATPSs (densidad, viscosidad y tensión superficial)[18].

Los ATPSs no solamente se utilizan para la recuperación de biomoléculas tales como proteínas, enzimas, aminoácidos, ADN, etc. También tienen otras aplicaciones como: la purificación de anticuerpos monoclonales, la fermentación extractiva, el acoplamiento de ATPS con extracción con membrana o flotación de dos fases acuosas (ATPF), entre otras [18],[19].

Con todo lo comentado anteriormente, el uso de ATPSs basados en disolventes biodegradables y no tóxicos como los DESs parece presentarse como una alternativa económica y medioambientalmente viable para la extracción de biomoléculas a partir de diferentes matrices [19],[22]. Sin embargo, el número de trabajos publicados sobre la aplicación de ATPSs basados en DES en la extracción de proteínas aún no es elevado [22],[23] hasta la fecha no se ha encontrado ningún trabajo publicado sobre su aplicación en biomasa algal.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad de varios sistemas bifásicos acuosos (ATPSs), basados en disolventes con eutéctico profundo (DESs) y sales de fosfato, para la recuperación de proteínas presentes en una biomasa liofilizada de la especie de microalga *Scenedesmus almeriensis* crecida en purín de cerdo.

En la experimentación, se ha planteado un diseño factorial completo de 6x3, evaluando el efecto de dos factores para determinar las condiciones óptimas del proceso de extracción: un factor (tipo de ATPS) a seis niveles y otro factor (tiempo de reposo, en min) a tres niveles. Como cada experimento se hizo por duplicado, se realizaron un total de 36 experimentos, cuyos resultados se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías. Previamente, se caracterizaron los ATPS empleados mediante la determinación de la curva binodal junto con varias líneas de reparto para cada sistema.

Los objetivos planteados en este trabajo se detallan a continuación:

1. Caracterizar la biomasa algal calculando, en porcentaje, el contenido en proteínas, carbohidratos, lípidos, humedad y cenizas.
2. Caracterizar los DESs preparados a partir de la determinación experimental de la viscosidad (η), la densidad (ρ), el contenido en agua y su espectro (FTIR).
3. Caracterizar los seis ATPS seleccionados mediante la determinación experimental de sus curvas binodales y rectas de reparto.
4. Diseñar la matriz de diseño 6x3 totalmente aleatorizada, a partir de la cual se llevaron a cabo los experimentos de extracción de proteínas.
5. Estudiar tres variables de respuesta: el porcentaje de proteína extraída (% PRY), porcentaje de carbohidratos extraídos (% CRY) y la ratio proteínas/carbohidratos extraídos (PCR).
6. Evaluar la eficiencia de coextracción de proteínas y carbohidratos de la biomasa tanto en la fase rica en DES (fase superior) como en la fase rica en sal (fase inferior) de cada experimento.
7. Analizar los resultados obtenidos mediante una tabla de ANOVA de dos vías, evaluando si los factores: ATPS y tiempo en reposo, ejercen un efecto significativo sobre el rendimiento de recuperación de proteínas. Además, se calculará la desviación estándar relativa (RSD) para cada variable de respuesta para un valor límite del 15% y la menor diferencia significativa (LSD), en caso de rechazar la hipótesis nula (H_0).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Materiales, equipos y reactivos

General:

- Material volumétrico de vidrio: matraces aforados, matraces Erlenmeyer, frascos de 150 mL, viales de 5 mL con tapón y septum.
- Material general de laboratorio: núcleos agitadores, vortex, placa agitadora calefactora, cristizador, jeringas de 5 mL...
- PURELABR Classic para agua ultrapura de tipo I con resistividad de 18.2 MΩ.cm.

Preparación de DES y disoluciones de HBA:

Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Balanza analítica Precisa 600C ($\pm 0,01$ g).
- Incubador con agitación orbital Optic Ivymen System.
- Cloruro de colina; pureza $\geq 98\%$.
- Betaína; pureza $\geq 98\%$.
- Urea; pureza $\geq 99\%$.
- Ácido levulínico; pureza $\geq 98\%$.

Caracterización de los DES:

Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Densímetro-Viscosímetro Anton Paar *SVM 3000 Stabinger*
- Culombímetro Karl Fisher *C20 Mettler Toledo*.
- Espectrofotómetro *FTIR-Bruker Tensor 27*.
- Etanol.

Determinación de los diagramas de fases de los ATPS:

Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Balanza ENTRIS[®]224-1S Santorius ($\pm 0,0001$ g).
- Placa agitadora calefactora con sonda de temperatura.
- Jeringas de 5 mL y agujas.
- Tubos cónicos tipo Falcon de 15 mL.
- Disoluciones de ChCl y Bet.
- DESs preparados de ChCl:2Urea y Bet:2LA.
- Fosfato potásico; pureza $\geq 98\%$.
- Hidrogenofosfato potásico; pureza $\geq 98\%$.

Procedimiento de extracción:

Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Rotor de brazo rotatorio *ELMI, mod. Intelli-Mixer RM-2M*.
- Incubador con agitación orbital *Optic Ivymen System*.
- Balanza ENTRIS®224-1S Santorius ($\pm 0,0001$ g).
- Gradillas.
- Tubos cónicos tipo Falcon de 15 y 50 mL.
- Filtros de membrana nylon de $0,45 \mu\text{m}$
- Microalga liofilizada *Scenedesmus almeriensis*.
- DESs y disoluciones de HBA y de las sales de fosfato.

Método BCA: determinación proteínas:

Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Espectrofotómetro UV/Vis *Thermo Scientific GENESYS 20*.
- Incubador con puestos para tubos Eppendorfs.
- Micropipetas de 100 y 1000 μL .
- Tubos de microcentrífuga Eppendorf™ 2 mL.
- Cubetas de plástico de 1 cm.
- *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, que contiene 2 disoluciones:
 - disolución A, compuesta por Na_2CO_3 , NaHCO_3 , tartrato de sodio, BCA (ácido bicinónico). Todo en medio NaOH 0,1 M.
 - disolución B de Cu^{2+} al 4%.
- Ampollas de 1 mL con disolución acuosa de BSA de 2000 mg/L.

Método fenol-sulfúrico: determinación de carbohidratos:

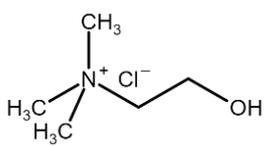
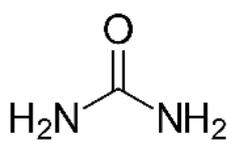
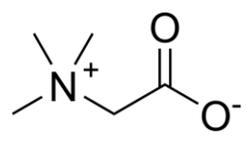
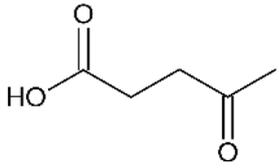
Los equipos y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Espectrofotómetro UV/Vis *SPECTRONIC®GENESYS™ 5*.
- Balanza ENTRIS®224-1S Santorius ($\pm 0,0001$ g).
- Micropipetas de 200 y 1000 μL .
- Cubetas de vidrio de 1 cm.
- Disolución de fenol al 80% (m/m).
- Ácido sulfúrico concentrado; pureza $\geq 96-98\%$.
- D(+)-Glucosa anhidra; pureza PRS.

3.2- Preparación de DES y disoluciones de HBA

Para la preparación de los dos disolventes con eutéctico profundo usados en este trabajo, se utilizó cloruro de colina (ChCl) y betaína (Bet) como aceptores de puentes de hidrógeno (HBA) y urea y ácido levulínico (LA) como dadores de puentes de hidrógeno (HBD), ambos en la relación molar 1:2. En la *Tabla 3* se muestra la estructura de los HBA y HBD, así como la relación molar entre ellos de los DES usados.

Tabla 3: DESs usados en este trabajo; HBA, HBD y relación molar

Abreviatura	HBA	Relación molar	HBD
ChCl:2Urea		1:2	
Bet:2LA		1:2	

Los dos DES se prepararon pesando las cantidades adecuadas de cada uno de los compuestos formadores del DES en un Erlenmeyer tapado con papel de aluminio. A continuación, la mezcla se introdujo en un incubador con agitación orbital a una temperatura de 60 °C durante 2 h, para favorecer la mezcla de los componentes y formación del DES (*Figura 5*). Una vez se formado un líquido incoloro y transparente sin la presencia de partículas sólidas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente.



Figura 5: Etapa de preparación de los DESs dentro del incubador

Por otro lado, se prepararon distintas disoluciones acuosas de los HBA usados para la formación de los DESs: una del 75% ChCl y otra del 59% Bet, ambos porcentajes en peso. Para ello, se pesaron las cantidades adecuadas de HBA y agua desionizada en un frasco cerrado. Las mezclas se calentaron durante 1 hora a temperatura controlada y con agitación para asegurar la completa y homogénea disolución de los HBA.

3.3- Caracterización física de los DESs

Los DESs preparados en el laboratorio se caracterizaron mediante la determinación experimental de las propiedades físicas: densidad (ρ) y viscosidad (η), y la medida del contenido en agua. Estas medidas se realizaron en las instalaciones del Departamento de Ingeniería Energética y Fluidomecánica de la Escuela de Ingenierías Industriales. Además, para verificar la formación de los DESs se registraron sus espectros de infrarrojo (ATR-FTIR) en las instalaciones del Departamento de Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía.

3.3.1- Densidad y viscosidad

La densidad y viscosidad de los DESs preparados en el laboratorio se midieron a diferentes temperaturas $T = 20-40^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica. Para ello se utilizó un Densímetro-Viscosímetro *Anton Paar SVM 3000 Stabinger* con una incertidumbre en la medida de $\pm 0.0005 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ y $\pm 0.35\%$ para la densidad y viscosidad, respectivamente. Este equipo dispone de un controlador de temperatura que mantiene las muestras a la temperatura de trabajo con una incertidumbre en medición de $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$ (*Figura 6*).

La calibración se comprobó con compuestos puros de densidad y viscosidad conocidas. El equipo da simultáneamente la medida de viscosidad y densidad, y corrige automáticamente el efecto de la viscosidad sobre la densidad. Antes y después de cada medida, el capilar del densímetro y el émbolo del viscosímetro se lavaron con agua y etanol para evitar la contaminación entre medidas.

3.3.2- Contenido en agua

El contenido de agua de los DESs usados se midió con un método de valoración Karl-Fisher en un Valorador Culombimétrico KF Mettler Toledo C20 con una incertidumbre en la medida de $\pm 5\%$ (*Figura 6*). La cantidad de agua de la muestra se determina a partir de la cantidad de corriente necesaria para la generación de yodo (reactivo valorante) en el transcurso de la valoración culombimétrica [25].



Figura 6: Densímetro-Viscosímetro SVM 3000-Anton Paar y Valorador culombimétrico Karl-Fischer

3.3.3- Análisis espectroscópico

El análisis mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier de reflexión atenuada (ATR-FTIR) es una de las técnicas más útiles y usadas para reconocer la presencia de grupos funcionales y enlaces químicos en las moléculas.

Para ello, se analizaron tanto los compuestos formadores de los DESs como los dos DESs preparados con el fin de visualizar una banda ancha perteneciente a un grupo –OH, debido a la formación de los enlaces de hidrógeno entre el aceptor (HBA: ChCl o Bet) y el donador de puentes de hidrógeno (HBD: urea o ácido levulínico). Además, destacan otras ventajas como: tiempo de respuesta rápido (pocos segundos), no es destructivo, no necesita preparación previa de la muestra y que permite medir muestras tanto en estado sólido como líquido. Las medidas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro FTIR-Bruker Tensor 27 con un detector ATR, en un rango de 4000-500 cm^{-1} y con el software OPUS (Optics User Software).

3.4- Determinación de los diagramas de fases de los ATPSs

Para poder aplicar los sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) para la extracción de proteínas primero hay que conocer su correspondiente diagrama de fases, es decir, conocer la región bifásica del ATPS, la composición inicial de la mezcla y la composición de las fases individuales en el equilibrio.

Para ello, primero se obtuvieron experimentalmente las curvas binodales y las rectas de reparto de cada uno de los seis sistemas estudiados: Bet/ K_3PO_4 , Bet:2LA/ K_3PO_4 , ChCl:2Urea/ K_2HPO_4 , ChCl:2Urea/ K_3PO_4 , ChCl/ K_2HPO_4 y ChCl/ K_3PO_4 .

Se determinaron experimentalmente estos seis ATPSs con el objetivo de comparar la capacidad de extracción de los ATPSs formados por los distintos DESs (ChCl:2Urea y Bet:2LA) y los formados por sus compuestos dadores de puentes de hidrógeno (HBA: ChCl y Bet) de partida.

Todas las disoluciones acuosas necesarias fueron preparadas por pesada. Se prepararon disoluciones acuosas de sal (fosfato potásico e hidrógenofosfato potásico) de composición conocida (50 % K_3PO_4 y 60% K_2HPO_4 , ambos porcentajes en peso). Estas concentraciones se eligieron para obtener la máxima solubilidad de la sal en el agua, lo que garantiza la homogeneidad de la mezcla. También, se utilizaron disoluciones de concentración conocida de los DESs para facilitar su manejo durante el procedimiento experimental.

3.4.1- Curvas binodales

Las curvas binodales o curvas de solubilidad se determinaron experimentalmente a 25°C y presión atmosférica siguiendo el método de punto de niebla o “cloud point method” [18], [24] que es ampliamente utilizado en este tipo de estudios.

Para ello, se introdujo una cantidad conocida de disolución de sal en un vial, se pesó y se llevó a un baño colocado en una placa agitadora calefactora con control de temperatura, para asegurar la determinación de la curva binodal a la temperatura seleccionada. A continuación, se añadió gota a gota el DES o disolución de DES correspondiente mientras

se agitaba el vial en un agitador vórtex, para conseguir un contacto completo entre los compuestos, hasta que se observó una ligera turbidez. Se introdujo el vial de nuevo en el baño, transcurridos unos minutos, si la turbidez de las muestras desaparecía, se añadió gota a gota el DES/disolución de DES correspondiente hasta que se observó una turbidez permanente (*Figura 7A*). Esta turbidez indica que se ha alcanzado el límite entre la región miscible y la inmisible del sistema. A continuación, las muestras se pesaron para calcular su composición. Después, se añadieron gotas de agua hasta obtener mezclas homogéneas, una sola fase (*Figura 7B*), y se repitió el procedimiento hasta obtener un número de datos suficientes. Para asegurar que se cubría todo el rango de composiciones, se valoraron disoluciones acuosas de DES de composición conocida con las disoluciones salinas correspondientes, siguiendo el procedimiento descrito y viceversa. Estos datos experimentales, se combinaron para construir la curva binodal completa. De la misma manera se construyeron las curvas binodales de los ATPS formados por los HBA, cloruro de colina y betaína con las sales indicadas anteriormente.

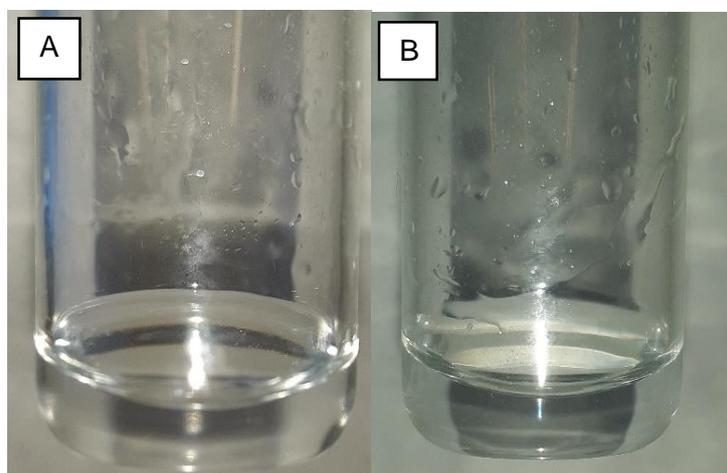


Figura 7: Método Cloud Point Titration. En la figura A, se muestra la disolución turbia al añadir DES mientras que en la figura B, la turbidez desaparece al añadir agua.

Con los datos de masa recopilados se representa la curva binodal para cada sistema, donde en el eje y se representa la fracción en masa del componente 1 y en el eje x, la del componente 2. La fracción en masa de cada componente se calcula como:

$$w_i = \frac{m_i}{m_{total}} \quad (4)$$

donde w_i es la fracción en masa (adimensional) de cada componente, m_i es la masa (g) de cada componente en un punto dado y m_{total} es la suma de las masas (g) del componente 1, componente 2 y del agua en un punto concreto.

Todas las curvas binodales se ajustaron mediante la ecuación de Merchuk [24],[26]:

$$[dv] = A \cdot e^{[B \cdot [sal]^{0.5} - C \cdot [sal]^3]} \quad (5)$$

donde $[dv]$ y $[sal]$ son las composiciones del disolvente, en este caso DES o HBA, y la sal en porcentaje en peso, respectivamente, y A, B y C son los parámetros de ajuste obtenidos mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados.

Una vez obtenido los diagramas de fase para los seis sistemas, se procede a su caracterización mediante las tie-lines o líneas de reparto (TL).

3.4.2- Rectas de reparto

Una vez conocida la curva binodal de cada ATPS, se llevó a cabo la determinación experimental de tres rectas de reparto (TL) para cada sistema. Para ello, mezclas ternarias inmiscibles de DES/HBA + K₃PO₄/K₂HPO₄ + H₂O de composición conocida se introdujeron en tubos Falcon cónicos y se cerraron. Para garantizar un contacto íntimo entre las fases, las mezclas se agitaron con un agitador vórtex durante unos minutos. A continuación, se dejaron reposar en un baño a 25°C hasta que se alcanzó la completa separación de las fases. Una vez alcanzado el equilibrio, ambas fases se separaron cuidadosamente y se pesaron por separado. Todas las TLs determinadas experimentalmente se realizaron por duplicado.

El cálculo de las composiciones de las TLs se realizó siguiendo el método propuesto por Merchuk [27]. Es un método gravimétrico para determinar las composiciones de las TLs de sistemas basados en polímeros utilizando el ajuste de los datos de la curva binodal mediante la ec. (5) combinada con los balances de materia (conocidas las masas de las fases formadas y la mezcla inicial). Utilizando la regla de la palanca se pueden determinar las composiciones de las fases superior e inferior y las composiciones globales del sistema. Este método es ampliamente utilizado en la determinación de las composiciones de las TL en ATPS basados en polímeros e ILs [28]. Cada TL se determina resolviendo el siguiente sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas [24]:

$$Y_T = A \cdot e^{[(B \cdot X_T^{0.5}) - (C \cdot X_T^3)]} \quad (6)$$

$$Y_B = A \cdot e^{[(B \cdot X_B^{0.5}) - (C \cdot X_B^3)]} \quad (7)$$

$$Y_T = \frac{Y_M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} \cdot Y_B \quad (8)$$

$$X_T = \frac{X_M}{\alpha} - \frac{1 - \alpha}{\alpha} \cdot X_B \quad (9)$$

donde T, B y M designan la fase superior, la fase inferior y la mezcla inicial, respectivamente; X e Y representan el porcentaje de fracción en peso de la sal y del DES o HBA usado, respectivamente; α es la relación entre la masa de la fase superior y la masa total de la mezcla y A, B y C son las constantes de ajuste obtenidas mediante la aplicación de la ec. (5).

3.5- Caracterización de la biomasa

En el trabajo experimental de este TFM se ha utilizado como biomasa algal un lote liofilizado de la especie de microalga verde *Scenedesmus almeriensis*, cultivada en un fotobiorreactor de tratamiento de aguas residuales de la ganadería porcina (purín líquido). Este lote procede de La Estación Experimental Las Palmerillas de la Universidad de Almería. Para caracterizarla, se determinó el contenido proteínas, carbohidratos, lípidos, humedad y cenizas, tal y como se detalla a continuación:

3.5.1- Análisis de proteínas

El análisis de proteínas se llevó a cabo mediante el método Kjeldahl [29]. Es un método volumétrico en el que se cuantifica el “nitrógeno Kjeldahl”, correspondiente a la suma del nitrógeno orgánico (proteico) y del nitrógeno amoniacal. Este procedimiento consta de tres etapas:

- 1) Digestión de ~0,1 g de biomasa liofilizada de la microalga en 6 mL de H₂SO₄ al 96% y con un catalizador de CuSO₄. Se aplica un programa de calentamiento hasta la conversión de nitrógeno proteico en amonio (NH₄⁺).
- 2) Destilación del NH₄⁺ hasta NH₃: se añade un exceso de NaOH 6 M y se calienta, recogiendo el NH₃ destilado en un matraz Erlenmeyer, que contiene un exceso de H₃BO₃ en presencia de un indicador mixto (mezcla de rojo de metilo y azul de metileno). El resultado es la formación de H₂BO₃⁻, donde la disolución vira de color morado a verde.
- 3) Valoración del H₂BO₃⁻ con H₂SO₄ 0,1 N hasta la formación de H₃BO₃, donde la disolución vira de verde a morado.

El nitrógeno total se calcula a partir de la siguiente expresión (ec. 10):

$$\% \text{ Proteínas} = f \cdot \%N = \frac{2 \cdot C_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4} \cdot P_{at}(N)}{m_{muestra} \cdot 1000} \cdot 100 \quad (10)$$

donde C es la concentración de H₂SO₄ (en mol/L), V es el volumen gastado de H₂SO₄ (en mL), P_{at}(N) es el peso atómico del nitrógeno (en g/mol), m_{muestra} es la masa inicial de la muestra (en g) y f es un factor de conversión que depende del tipo de proteínas.

3.5.2- Análisis de carbohidratos

Para el análisis de carbohidratos se ha empleado un método de hidrólisis de la biomasa [30]:

- 1) Se toman ~0,03 g de la microalga y se añaden 2 mL de H₂SO₄ al 72%, calentando durante 1 hora a 30 °C.
- 2) A continuación, se añaden 34 mL de agua y se calienta de nuevo durante 2 horas a 100 °C.
- 3) La disolución resultante se filtra con filtros de Nylon o politetrafluoroetileno (PTFE) 0,45 μm y se enrasa en un matraz aforado.

Para la determinación de carbohidratos se aplicó el método Fenol-Sulfúrico. Este método es idéntico al que se utiliza para medir carbohidratos en las fases resultantes de los ATPS después de la extracción, el cual se detalla más adelante en 3.7.2- *Método de determinación de CHs: método del Fenol-Sulfúrico*.

3.5.3- Análisis de lípidos

Para el análisis de lípidos se ha aplicado el método de extracción Soxhlet [31], que determina la grasa (lípidos) por gravimetría y utilizando hexano como agente extractante. Se resumen las etapas brevemente:

- 1) Para empezar, se coge un matraz de fondo redondo, se anota su peso (debe estar previamente limpio y seco) y se añade hexano como disolvente. Se pesan ~3 g de la microalga pulverizada, se mete en un cartucho fabricado con papel de filtro, se cubre con algodón y se introduce en el cuerpo del extractor. Se coloca sobre el matraz de fondo redondo, lleno de hexano.
- 2) Se calienta el extractor Soxhlet provocando la volatilización del hexano y cuando llega al refrigerante, se condensa y así permitiendo el contacto con la muestra sólida y, en consecuencia, su extracción. Por efecto sifón, se repite el proceso de extracción varias veces.
- 3) Al cabo de unas 9 horas y finalizada la extracción, se destila el hexano y el residuo sólido se pesa. Por diferencia de pesada se obtiene la cantidad de grasa de la microalga.

3.5.4- Análisis de humedad y cenizas

La humedad (cantidad de agua) y de cenizas o fracción mineral se determinó también en base a métodos gravimétricos:

- 1) Se pesa entre 1-10 g de la microalga (dependiendo de su densidad) en un crisol de porcelana y se seca en estufa a 105 °C hasta peso constante. Por pérdida de masa se obtiene el contenido de agua.
- 2) Después, el residuo seco se transfiere a un horno de mufla donde se calcina a 550 °C durante 24 horas. En frío, se determinan el contenido de cenizas por gravimetría.

3.6- Procedimiento de extracción

Una vez caracterizados los seis ATPS mediante sus diagramas de fases, se realizaron los experimentos de extracción de proteínas a partir de biomasa algal en las rectas de reparto con mayor longitud de cada sistema. Se eligieron estas TLs dado que una mayor longitud de la recta de reparto implica un mayor grado de separación de fases, es decir, mayor diferencia entre las composiciones del disolvente (DES/HBA) y la sal en las dos fases. Ésto suele ir asociado a mejores rendimientos en la extracción de biomoléculas utilizando ATPS [32].

Para cada sistema, se añadió 0,03 g de microalga (morturada previamente, para minimizar el tamaño de partícula) a la mezcla inicial de la TL seleccionada. Esta mezcla ternaria inicial fue preparada por pesada en tubos Falcon cónicos y cerrados, añadiendo las cantidades necesarias de DES o HBA, disolución de sal y agua desionizada correspondientes para cada sistema. Con el objeto de asegurar un buen contacto entre los componentes, las

mezclas se agitaron utilizando un rotor de brazo rotatorio durante 10 min a 99 rpm con agitación orbital y 1 min a 50 rpm con agitación trasversal (Figura 8). A continuación, las mezclas se llevaron a un incubador a 25°C durante un tiempo seleccionado para asegurar una buena separación de fases. El tiempo de reposo fue un parámetro que se optimizó en el diseño factorial completo que se describe a continuación.



Figura 8: Rotor de brazo rotatorio

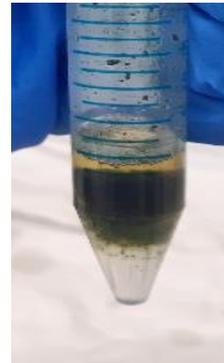


Figura 9: Separación de fases: fase superior (color amarillento) y fase inferior (incolore)

Después, se separaron las fases utilizando una jeringa (Figura 9). Posteriormente, las fases separadas se filtraron con filtros de 0,45 μm y se llevaron a matraces aforados para su posterior cuantificación en proteínas y carbohidratos. Cada experimento de extracción se realizó por duplicado.

3.7- Análisis de los extractos. Método de determinación de proteínas y de carbohidratos

Una vez realizados los experimentos de extracción, las distintas fases obtenidas se analizaron para determinar el contenido de proteínas y carbohidratos (CHs) mediante métodos espectrofotométricos.

3.7.1- Método de determinación de proteínas: método del BCA

El método del BCA es un test utilizado para la cuantificación de proteínas. Este método combina la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ por los enlaces peptídicos de las proteínas en un medio alcalino (reacción de biuret) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión cuproso Cu^+ usando un reactivo (*working reagent*) que contiene ácido bicinconínico (BCA). A continuación, el ion Cu^+ reacciona con 2 moléculas de BCA para formar un quelato de color púrpura, el cual presenta una absorbancia máxima a 562 nm (Figura 10). La formación del color se debe a la reacción de BCA con la estructura macromolecular de la proteína, enlaces peptídicos [33].

La concentración de proteína en la muestra se determina en referencia a los estándares de una proteína común, como es la albúmina de suero bovino (BSA) y este procedimiento presenta un rango de proteínas entre 50-2000 mg/L.

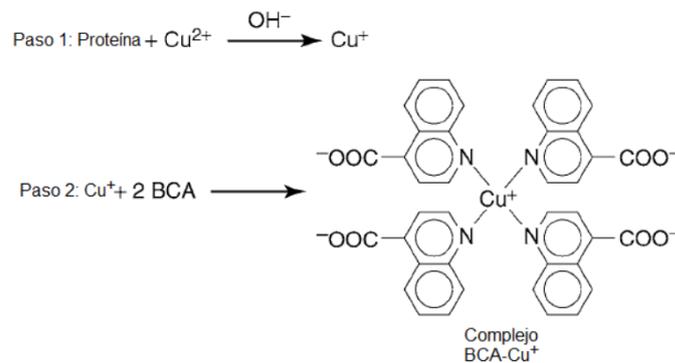


Figura 10: Formación del complejo Cu^+ -2BCA

Procedimiento experimental:

- 1) Se prepara el *working reagent*, que es una mezcla de color verde intenso entre la disolución A y B en proporción 50:1 (v/v).
- 2) Se añaden 60 μL de muestra (o de la disolución de BSA) y 1,2 mL del *working reagent* a cada tubo Eppendorf, ambos volúmenes con micropipeta. La mezcla resultante se agita bien en un agitador vórtex.
- 3) Inmediatamente se llevan estos tubos Eppendorfs a un incubador (Figura 11) y se calientan a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.



Figura 11: Incubador para tubos Eppendorfs

- 4) Se dejan atemperar las muestras y se mide la absorbancia con cubetas de plástico en un espectrofotómetro UV/Vis a una $\lambda = 562 \text{ nm}$ en menos de 10-15 min, ya que el color púrpura obtenido se sigue desarrollando. Para cuantificar el contenido proteico, se interpola en una línea de calibrado preparada previamente, en la cual se utilizan patrones de BSA de 2000 mg/L en vez de la muestra.

3.7.2- Método de determinación de CHs: método del Fenol-Sulfúrico

El método del fenol-sulfúrico es un test ampliamente utilizado para la cuantificación de todo tipo de carbohidratos. Algunas de sus ventajas son que es sencillo, sensible, preciso, específico para CHs y que los reactivos son baratos y estables.

Se basa en la reacción vigorosa del azúcar con ácido sulfúrico concentrado, transformando los CHs a derivados de furano. Estos derivados se condensarán con el fenol añadido al medio para formar unos compuestos coloreados que son derivados de furfural [34] que suelen presentar un color amarillo-anaranjado (*Figura 12*).

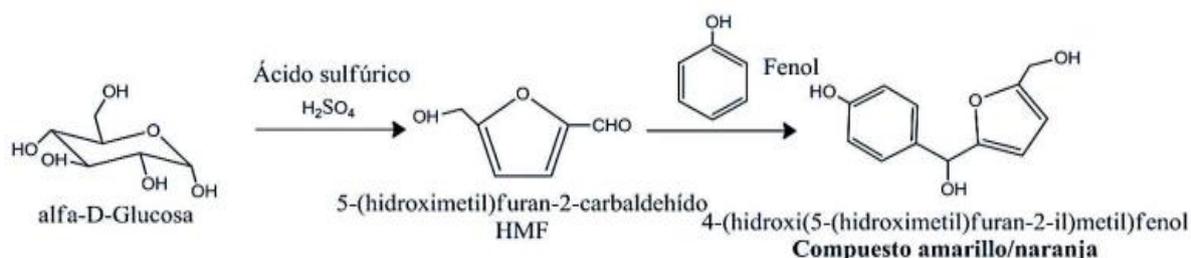


Figura 12: Método del Fenol-Sulfúrico

La concentración de carbohidratos en la muestra se determina en referencia a la α -D-glucosa y este procedimiento presenta un rango de carbohidratos entre 10-85 mg/L.

Procedimiento experimental:

- 1) Se pesan 0,5 g de glucosa en un matraz aforado de 50 mL y se enrasa con agua desionizada. Se hace una dilución 1:50 en otro matraz de 50 mL y se vuelve a enrasar.
- 2) Se preparan los patrones de calibración a partir de la disolución de glucosa para un volumen final de 2,00 mL en tubos Falcon de 50 mL. Para el caso de las muestras, se toman 2,00 mL directamente de la disolución de la fase *top* y 1,50 mL de la fase *bottom* y completar con agua hasta los 2,00 mL.
- 3) Se adicionan con micropipeta 50 μ L de una disolución de fenol al 80%. Se agita y seguidamente, se vierten 5 mL de H₂SO₄ cdo con un dosificador a cada tubo Falcon. La disolución se torna anaranjada y se calienta (reacción exotérmica).
- 4) Se introducen los tubos Falcon con ayuda de una gradilla en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20-30 min para que la disolución se atempere.
- 5) Una vez fríos, se transfiere directamente el líquido del Falcon a la cubeta de vidrio. Se lleva a un espectrofotómetro para medir la absorbancia de los patrones y muestras a una $\lambda = 490$ nm. Para cuantificar el contenido de carbohidratos (glucosa), se interpola en la línea de calibrado previamente preparada de 200 mg/L de glucosa.

3.8- Diseño experimental

Para evaluar el porcentaje de proteínas extraídas y el contenido de carbohidratos separados en la biomasa microalgal liofilizada *Scenedesmus almeriensis*, se propone hacer un diseño factorial completo de dos factores 6x3: un factor a seis niveles (ATPS) y otro a tres niveles (tiempo de reposo, en min). Este diseño está totalmente aleatorizado y como se hacen réplicas por duplicado, el diseño consta de un total de 36 experimentos.

En la *Tabla 4* se muestran los dos factores empleados: a cada experimento se le asigna un código de identificación con el ATPS seleccionado y el tiempo de reposo requerido, analizándose tanto la fase superior, que se denominará a partir de ahora *top* (se etiquetará como A1, A2, ..., A36), como la fase inferior, la cual se nombrará *bottom* (se etiquetará como BA1, BA2, ..., BA36).

Tabla 4: Dos factores empleados: el tipo de ATPS (a seis niveles) y el tiempo de reposo (a tres niveles)

Niveles	Factor	
	Tipo de ATPS	Tiempo de reposo
1	Bet/K ₃ PO ₄	10
2	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	30
3	ChCl/K ₂ HPO ₄	120
4	ChCl/K ₃ PO ₄	---
5	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	---
6	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	---

Para este estudio se han evaluado tres variables de respuesta distintas: el rendimiento de recuperación de proteínas (PRY), el rendimiento de carbohidratos extraídos (CRY) y la relación de proteínas extraídas respecto a los carbohidratos recuperados (PCR). PRY (ec. 11) y CRY (ec. 12) se definen como la relación, en porcentaje, entre la masa de proteínas o carbohidratos recuperados en el extracto y la masa inicial de proteínas o carbohidratos en la biomasa, mientras que PCR (ec. 13), se calculó como la relación porcentual entre el PRY y el CRY.

$$PRY / \% = \frac{m_{prot\ extraídas}}{m_{prot\ biomasa}} \cdot 100 \quad (11)$$

$$CRY / \% = \frac{m_{CHs\ extraídos}}{m_{CHs\ biomasa}} \cdot 100 \quad (12)$$

$$PCR = \frac{PRY}{CRY} \quad (13)$$

El objetivo en este estudio es maximizar la variable PCR para lograr una extracción selectiva del contenido proteico de la biomasa algal liofilizada, es decir, minimizando la coextracción de carbohidratos.

Para comprobar si existe efecto significativo en los resultados medidos, se emplea un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con el fin de averiguar si el factor ATPS o el tiempo de reposo influye en el rendimiento de extracción de proteínas, carbohidratos o en

el PCR. Se plantean las hipótesis nulas (H_0) y las hipótesis alternativas (H_1) para ambos factores para un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$):

- H_0 : el factor no tiene efecto. No hay diferencias significativas entre las medias de los factores estudiados.
- H_1 : el factor sí tiene efecto. Hay diferencias significativas entre las medias de los factores estudiados.

Y las hipótesis para la interacción de ambos factores con un $\alpha = 0,05$:

- H_0 : la interacción entre ATPS y tiempo de reposo no tiene efecto. El efecto del tipo de ATPS es independiente del tiempo de reposo.
- H_1 : la interacción entre ATPS y tiempo de reposo tiene efecto. El efecto del tipo de ATPS depende del tiempo de reposo.

El análisis de los resultados experimentales obtenidos se ha realizado aplicando un ANOVA de dos vías, ya que es un test estadístico que se usa para comparar las varianzas entre las medias de diferentes grupos (*between*) debido al error sistemático o sesgo del factor A (ATPS), factor B (tiempo de reposo) o su interacción AxB, con la varianza de dentro de los grupos (*within*) debido al puro error aleatorio.

Para evaluar la presencia de error significativo debido al sesgo, se compara el F calculado (ec. 14) mediante la prueba de significación F de Fisher-Snedecor con el F crítico para un $\alpha = 0,05$ y el p valor con α :

$$F_{calc} = \frac{s_{between}^2}{s_{within}^2} = \frac{MS_{factor\ i}}{MS_R} = \frac{SS_{factor\ i} / (k - 1)}{SS_R / ((k - 1) \cdot (l - 1))} \quad (14)$$

donde MS_R es la media cuadrática del residual, SS es la suma de cuadrados, k es el número de niveles de un factor A y l es el número de niveles un factor B. Si $F_{calc} > F_{crit}$ y $p < \alpha$: se acepta H_1 y existen diferencias significativas debido al factor. En cambio, si $F_{calc} < F_{crit}$ y $p > \alpha$: se acepta H_0 , el factor no tiene efecto significativo y el error sólo se atribuye al error aleatorio de las medidas. En caso de rechazarse H_0 (el factor es significativo), se pueden conocer las diferencias entre las medias de las respuestas mediante la prueba LSD (diferencia mínima significativa) de múltiples rangos (ec. 15), comparándolas con el LSD crítico:

$$LSD = t_{crit} \cdot \sqrt{MS_R \cdot \left(\frac{2}{n_j}\right)} \quad (15)$$

donde t_{crit} es el valor tabulado de la t de Student para los grados de libertad (gdl) residuales y $\alpha = 0,05$, MSR es el cuadrado medio del residual y n_j es el número de réplicas realizadas para cada nivel del factor j (2 en este caso).

Otra manera de detectar si los valores obtenidos a cada nivel difieren significativamente, es calcular la desviación estándar relativa (RSD; ec. 16) para un valor límite del 15% ($RSD < 15\%$) para las tres variables de respuesta:

$$\% RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (16)$$

donde s es la desviación estándar muestral y \bar{x} es el promedio de valores medidos para ese nivel.

El tratamiento estadístico de la matriz de diseño 6x3 se llevó a cabo mediante el software *Statgraphics Centurion 19*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Caracterización de la biomasa

Para la caracterización de la biomasa microalgal liofilizada, *Scenedesmus almeriensis*, se determinó su contenido en proteínas, carbohidratos, lípidos, cenizas y humedad. Para los cinco parámetros se realizaron réplicas por triplicado a través de las técnicas descritas anteriormente en el apartado 3.5- *Caracterización de la biomasa*

En la *Tabla 5* se muestran, en %, el promedio de los resultados obtenidos.

Tabla 5: Composición de la microalga utilizada en este trabajo

Scenedesmus almeriensis liofilizada	
Proteínas / %	44,5
Carbohidratos / %	20,4
Lípidos / %	11,9
Cenizas / %	15,1
Humedad / %	5,6

Como se puede observar el componente mayoritario de la microalga es el contenido proteico, siendo casi la mitad de su contenido total. Además, es un valor similar al registrado en la literatura del 47% en proteínas [4].

4.2- Caracterización de los DESs

Para la caracterización física de los dos DESs empleados (ChCl:2Urea y Bet:2LA), se determinaron experimentalmente la viscosidad, la densidad y el contenido en agua. Además, se realizó un estudio espectroscópico mediante FTIR-ATR. Todo ello se encuentra resumido en el apartado 3.3- *Caracterización física de los DESs*.

➤ Viscosidad (η)

Los valores experimentales de la viscosidad y los calculados a partir del ajuste con el modelo de Vogel-Fucher-Tamman (VFT) [35],[36] (ec. 17), se representan en la *Figura 13* en función de la temperatura. En la

Tabla 6 se muestran los valores de los parámetros empíricos y el coeficiente de determinación (R^2) para cada DES.

$$\eta = A \cdot e^{\frac{B}{T-T_0}} \quad (17)$$

donde η es la viscosidad dinámica, T (K) es la temperatura del sistema y A , B y T_0 son constantes empíricas

Tabla 6: Parámetros del modelo VFT

Parámetros	ChCl:2Urea	Bet:2LA
A / mPa·s	0,0432	0,0707
B / K	1046,45	1046,40
T_0 / K	197,63	190,45
R^2	0,9999	0,9999

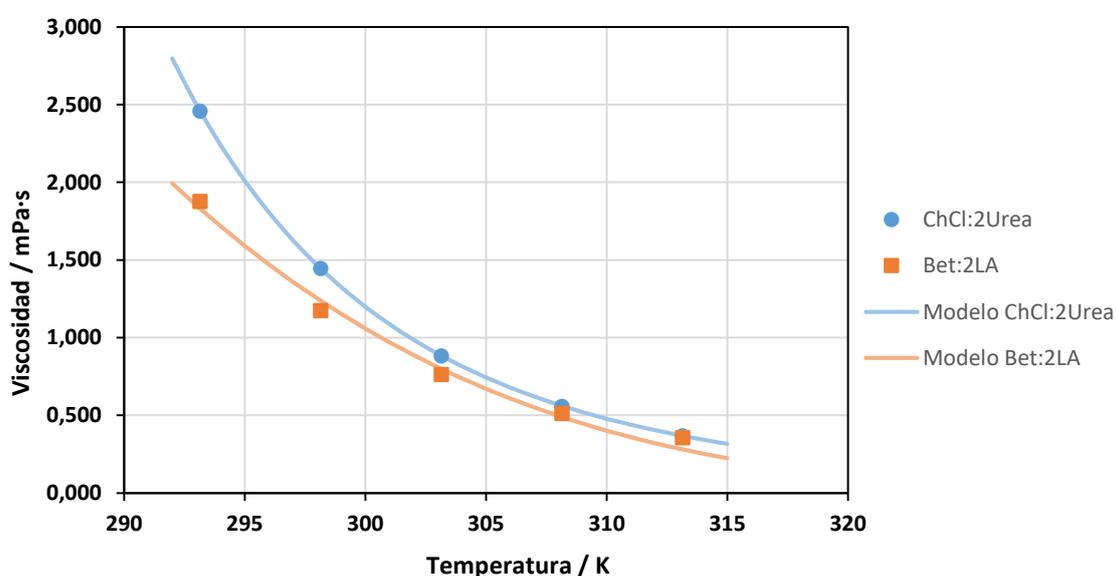


Figura 13: Variación de viscosidad con la temperatura y ajuste con el modelo VFT

En la Figura 13 se observa una relación inversamente proporcional entre la η y la T para ambos DES, siendo la viscosidad del ChCl:2Urea ligeramente mayor que la obtenida para el DES Bet:2LA. Además, se puede observar que los valores de viscosidad experimentales se ajustan adecuadamente al modelo de VFT para ambos DESs ($R^2 > 0,99$).

➤ Densidad (ρ)

Los valores experimentales de la densidad (ρ) para los DES estudiados se determinaron experimentalmente en el intervalo de temperaturas $T = (20 - 40)^\circ\text{C}$ y a presión atmosférica. Los parámetros obtenidos para el ajuste de la densidad (ec. 18) se muestran en la Tabla 7, observando un buen ajuste de los datos experimentales ($R^2 > 0,99$).

$$\rho = b_0 + b_1 T \quad (18)$$

donde ρ es la densidad del DES, T es la temperatura del sistema y b_0 y b_1 son parámetros empíricos ajustables.

Tabla 7: Parámetros de la densidad

Parámetros	ChCl:2Urea	Bet:2LA
$b_0 / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	$-5,50 \cdot 10^{-4}$	1,209
$b_1 / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{K}^{-1}$	$-7,66 \cdot 10^{-4}$	1,174
R^2	0,999	0,999

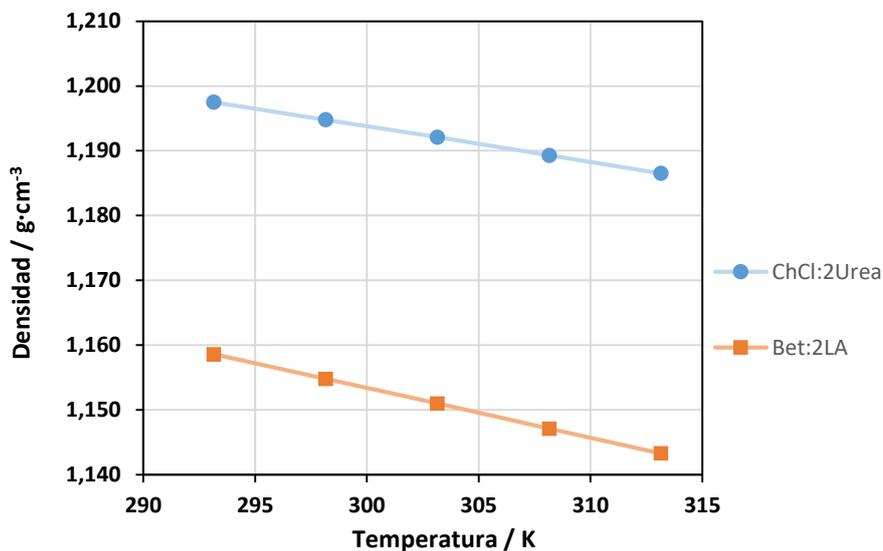


Figura 14: Variación de la densidad con la temperatura

En el gráfico de la *Figura 14*, se observa una relación inversa entre ρ y T , ya que la ρ disminuye linealmente a medida que aumenta la temperatura para ambos DES analizados. Se observa que los valores de la densidad para el DES ChCl:2Urea son mayores que los obtenidos para el Bet:2LA.

➤ Contenido en agua

El contenido en agua de los dos DES empleados se determinó experimentalmente mediante una valoración coulombimétrica (Karl-Fischer), los valores obtenidos se muestran en la *Tabla 8*. Se realizaron cinco réplicas para cada DES, obteniendo en promedio un %RSD bajo (%RSD < 5%) y un contenido en agua (% m/m) también muy bajo para ambos, siendo menor del 1% para ambos DES. Por tanto, se despreció este contenido en agua para los cálculos posteriores de las composiciones de los diagramas de fases de los ATPSs (curva binodal y rectas de reparto).

Tabla 8: Parámetros del contenido en agua

Parámetros	ChCl:2Urea	Bet:2LA
%RSD	3,75	4,99
%(m/m)	0,36	0,67

➤ Análisis espectroscópico

Para cada DES, se obtuvo el espectro de IR entre un rango de $4000-500\text{ cm}^{-1}$, y así observar principalmente la interacción entre el HBA y el HBD mediante enlaces de hidrógeno, pudiendo existir como $\text{N-H}\cdots\text{N-H}$, $\text{N-H}\cdots\text{O-H}$, $\text{H-O}\cdots\text{H-O}$ y $\text{O-H}\cdots\text{N-H}$. Para ello, se obtuvo el espectro para cada componente individual que forma el DES y después, el DES puro (Figura 15 y Figura 16).

a) ChCl:2Urea

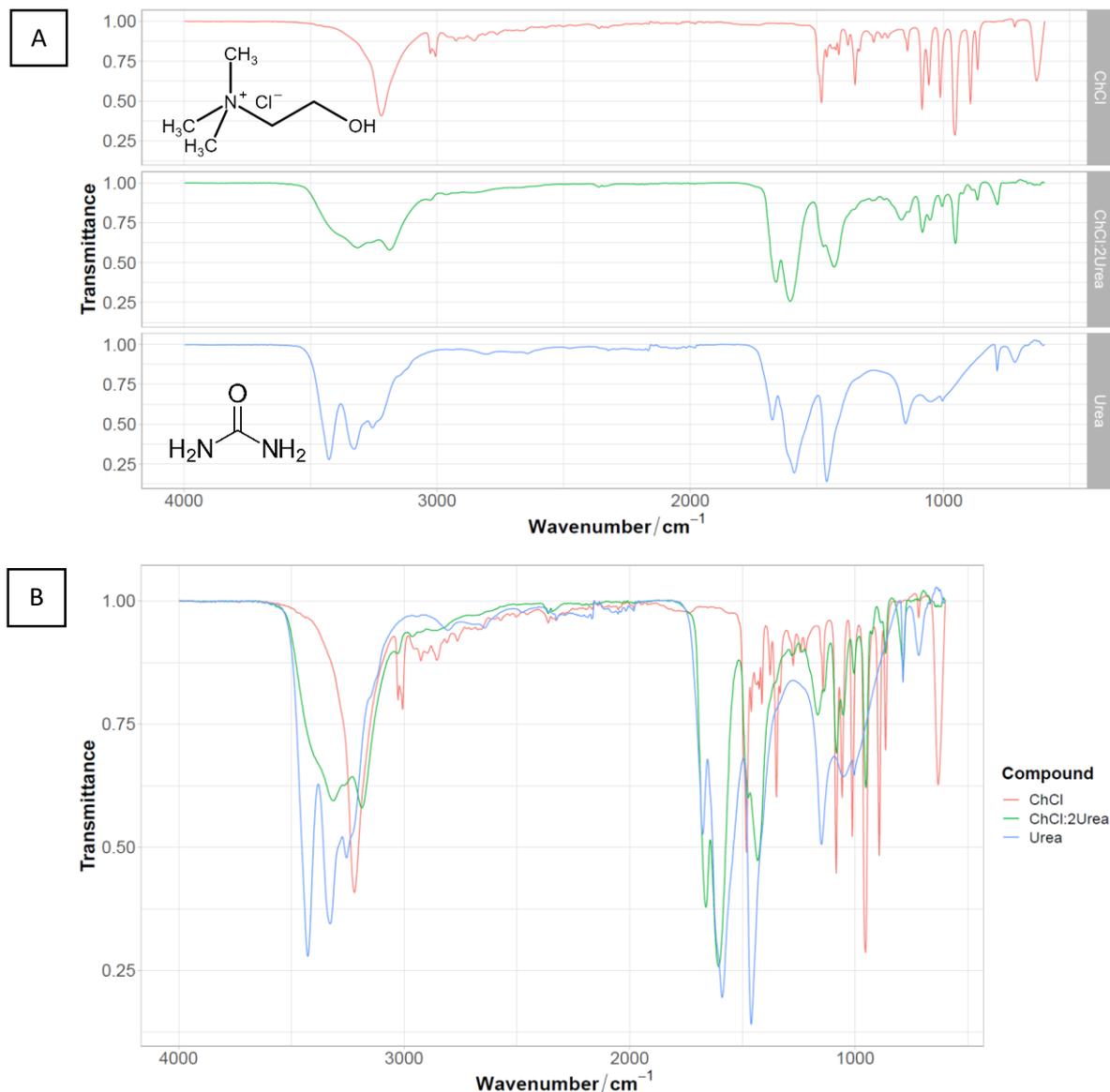


Figura 15: FTIR del ChCl:2Urea. En A, se muestran los espectros por separado mientras que en B, los espectros están juntos.

En el espectro del cloruro de colina (ChCl), aparece una banda ancha e intensa a unos 3200 cm^{-1} , perteneciente a la vibración de tensión del grupo $-\text{OH}$ y un doble pico entre $3100-3000\text{ cm}^{-1}$ perteneciente a las vibraciones de los metilenos ($-\text{CH}_2-$) y metilos ($-\text{CH}_3$). En el espectro de urea, se aprecian principalmente tres picos intensos en $3400-3250\text{ cm}^{-1}$, asociados a las vibraciones de tensión N-H y otros tres picos mucho más anchos e intensos entre $1700-1450\text{ cm}^{-1}$, debido a las vibraciones de tensión C=O y N-H. En el espectro del DES puro ChCl:2Urea, se aprecia una banda ancha de intensidad media a $3500-3100$

cm^{-1} correspondiente a los enlaces de hidrógeno formados (N-H, O-H). Además, el pico que aparece a $\sim 955 \text{ cm}^{-1}$ de la vibración CCO tanto en el espectro del ChCl como en el del DES puro, indica que el ChCl no está destruido en el DES puro [37], [38].

b) Bet:2LA

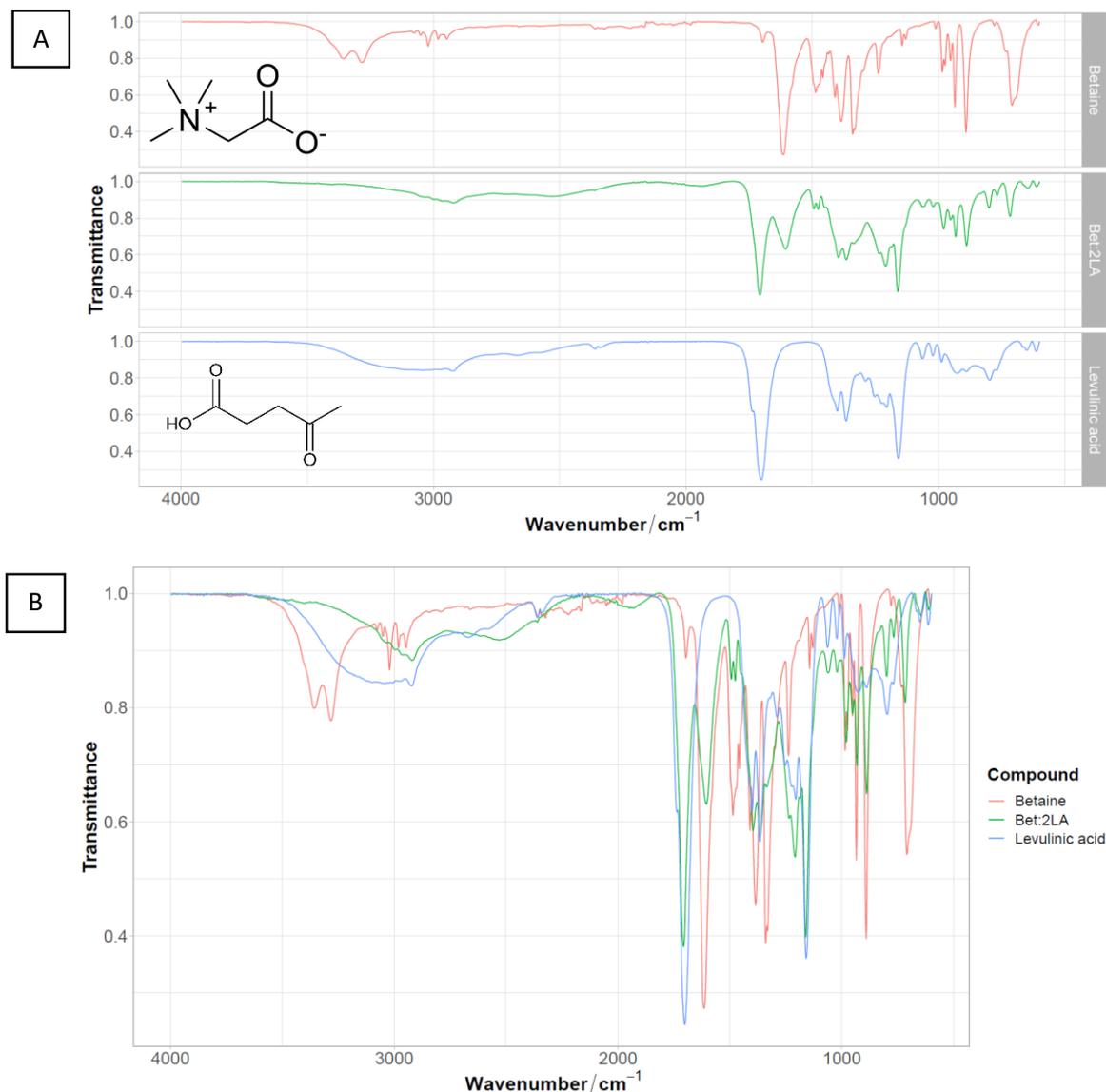


Figura 16: FTIR del Bet:2LA. En A, se muestran los espectros por separado mientras que en B, los espectros están juntos.

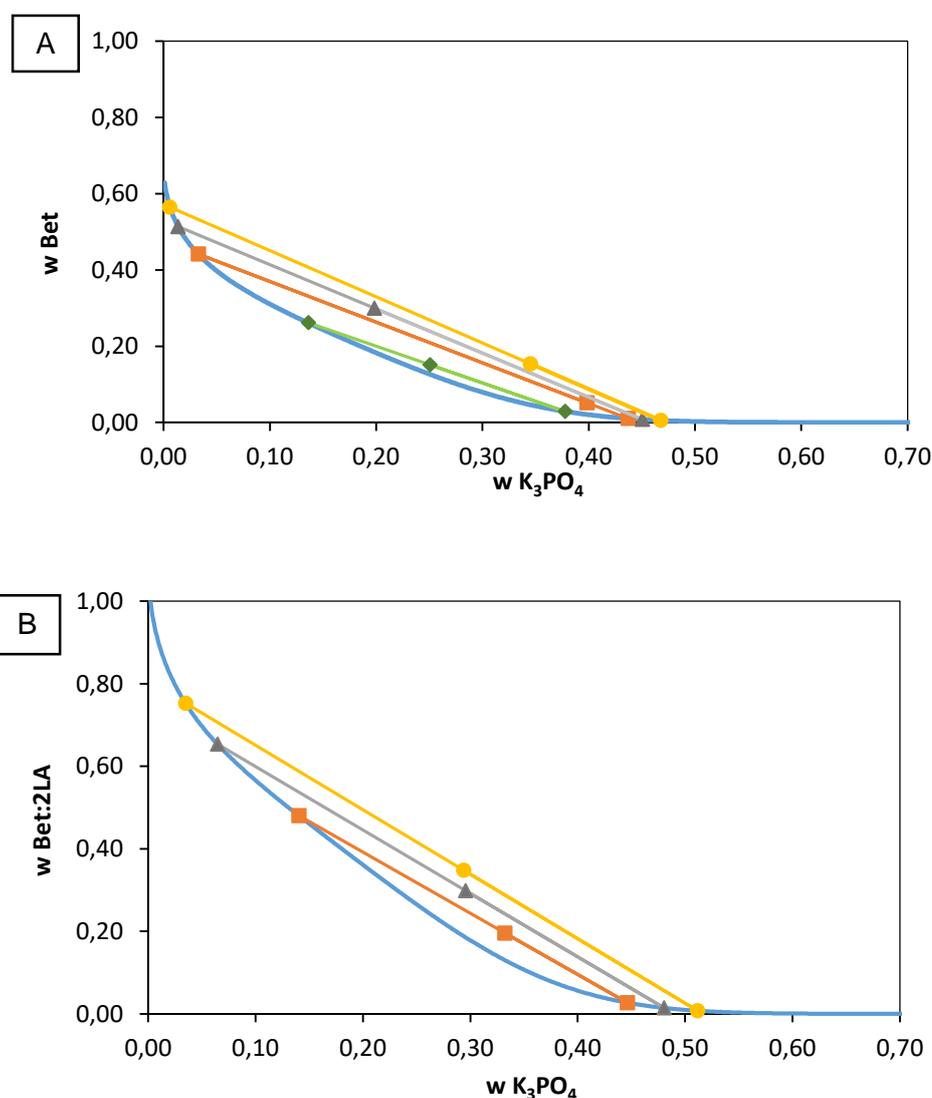
En el espectro de betaína (Bet), se observa un pico muy intenso a 1600 cm^{-1} y en el del ácido levulínico (LA) a 1700 cm^{-1} de la misma intensidad: corresponde a la vibración de tensión C=O. También se aprecia la banda -OH ancha referida al ácido carboxílico entre $3450\text{-}2500 \text{ cm}^{-1}$ del LA. Y en el DES puro Bet:2LA, a diferencia de lo anterior, no se observa una banda ancha e intensa por encima de los 3000 cm^{-1} . No obstante, esa ligera variación de las vibraciones C=O tanto de la Bet como del LA a mayores números de onda en el DES, se interpreta como consecuencia de la formación de los enlaces de hidrógeno (N-H, O-H) [39], [40].

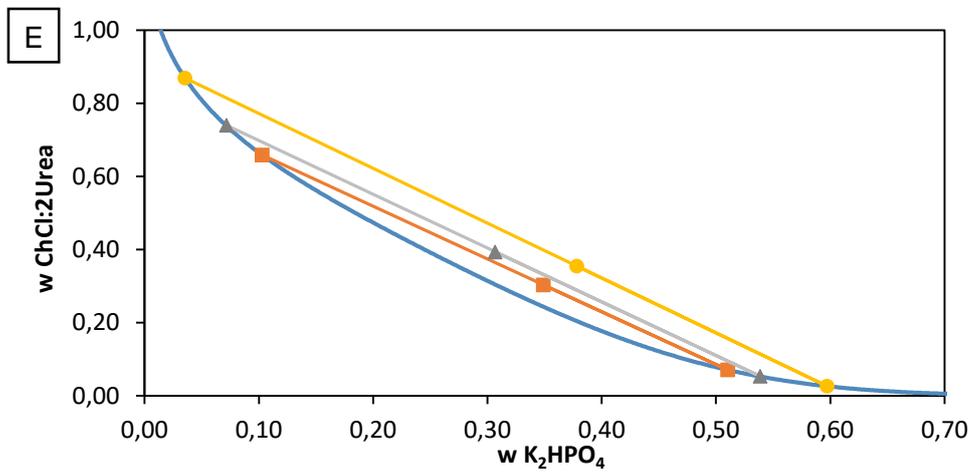
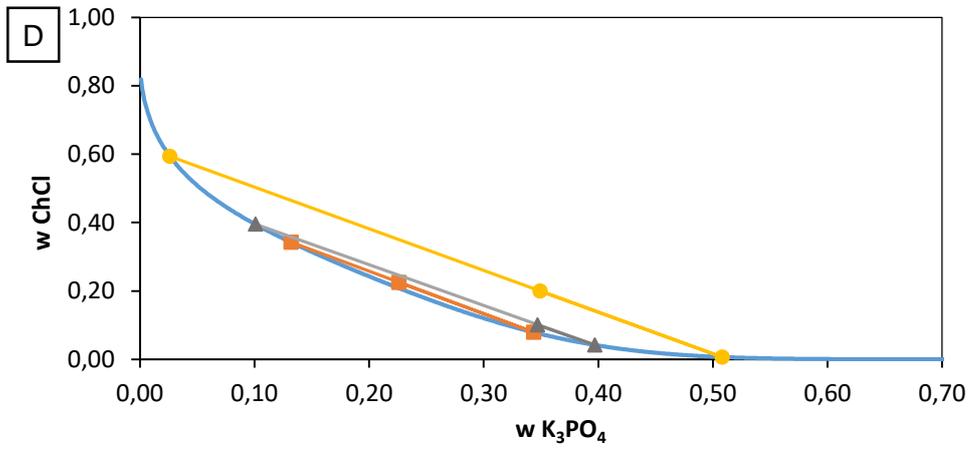
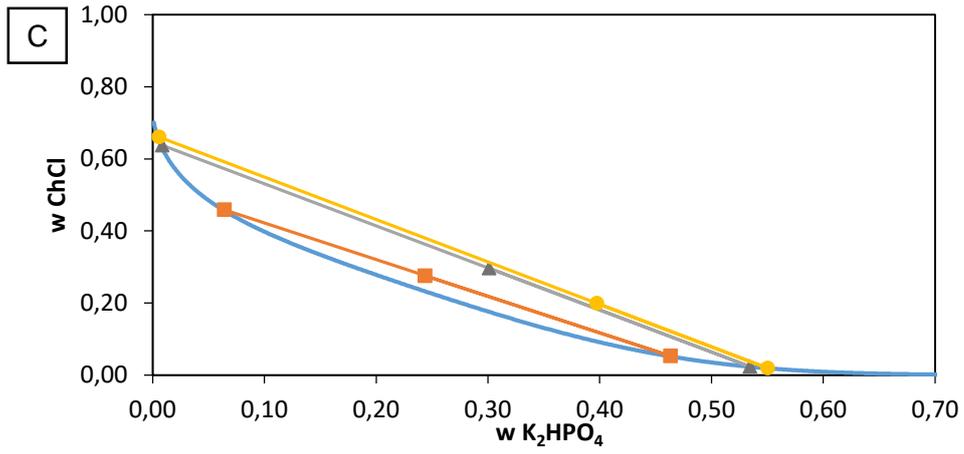
4.3- Diagramas de fase de los ATPSs

Para obtener los diagramas de fases para cada uno de los seis sistemas bifásicos acuosos estudiados se determinaron experimentalmente sus curvas binodales y rectas de reparto a $T = 25^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica.

En este trabajo se han estudiado los ATPS formados por: i) el DES ChCl:2Urea con las sales de fosfato (K_3PO_4 y K_2HPO_4) y ii) el DES Bet:2LA con la sal K_3PO_4 . Además, con objeto de analizar si la capacidad de extracción de las biomoléculas se debe al DES o sólo a alguno de sus componentes formadores, en concreto el HBA, también se estudiaron los ATPS formados por: i) ChCl con las sales de fosfato (K_3PO_4 y K_2HPO_4) y ii) Bet con la sal K_3PO_4 .

En la *Figura 17*, se muestran los ajustes de las curvas binodales experimentales utilizando la ecuación de Merchuck (ec. 5) para los seis ATPS estudiados, así como las rectas de reparto determinadas experimentalmente para cada sistema. Las composiciones experimentales de las curvas binodales (en fracción másica) se pueden encontrar en la *Tabla 13* de los Anexos.





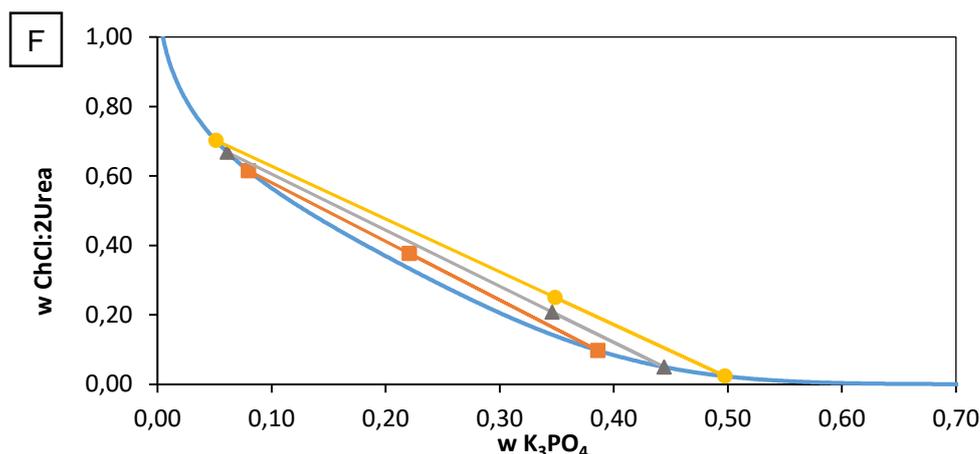


Figura 17: Curvas binodales para los sistemas: (A) Bet/K_3PO_4 , (B) $Bet:2LA/K_3PO_4$, (C) $ChCl/K_2HPO_4$, (D) $ChCl/K_3PO_4$, (E) $ChCl:2Urea/K_2HPO_4$ y (F) $ChCl:2Urea/K_3PO_4$ determinados a $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ y presión atmosférica. Los símbolos representan la mezcla inicial y las composiciones de la fase superior e inferior de las rectas de reparto y la línea (—) corresponde al ajuste de las curvas binodales experimentales según el modelo de Merchuck (ec. 5).

En la *Tabla 9* se muestran los valores de los parámetros de ajuste siguiendo la ecuación de Merchuck (ec. 5) junto con el coeficiente de correlación para las curvas binodales de los seis ATPS estudiados. Como se puede observar se alcanzaron altos coeficientes de correlación para todos los sistemas.

Tabla 9: Parámetros de ajuste obtenidos a partir de la ecuación de Merchuck (ec.5) y R^2

ATPS	A	B	C	R^2
Bet/K_3PO_4	67,800	-0,237	$3,14 \cdot 10^{-5}$	0,9998
$Bet:2LA/K_3PO_4$	105,886	-0,188	$2,64 \cdot 10^{-5}$	0,9997
$ChCl/K_2HPO_4$	81,485	-0,217	$1,25 \cdot 10^{-5}$	0,9998
$ChCl/K_3PO_4$	90,114	-0,253	$2,35 \cdot 10^{-5}$	0,9995
$ChCl:2Urea/K_2HPO_4$	126,830	-0,201	$1,09 \cdot 10^{-5}$	0,9997
$ChCl:2Urea/K_3PO_4$	116,284	-0,222	$1,91 \cdot 10^{-5}$	0,9997

En la *Figura 18* se puede observar una comparación de las curvas binodales experimentales de los ATPS agrupados por el tipo de sal (para una mejor visualización). Respecto a los ATPS formados por la sal K_2HPO_4 (*Figura 18 A*), el sistema que involucra el DES $ChCl:2Urea$ muestra una menor región bifásica que el sistema formado sólo por su HBA ($ChCl$). Respecto a los sistemas que contienen la sal K_3PO_4 (*Figura 18 B*), el orden seguido por los sistemas fue: $ChCl:2Urea \sim Bet:2LA < ChCl < Bet$.

En general, se puede concluir que los ATPS formados por los HBA ($ChCl$ y Bet) presentan mayores regiones bifásicas que los ATPS que contienen sus correspondientes DES ($ChCl:2Urea$ y $Bet:2LA$). Estas diferencias se puede deber a la propiedad hidrofílica del DES o HBA, ya que una baja afinidad por el agua requiere menos sal para promocionar la separación de las dos fases, resultando en una curva binodal más próxima al eje de ordenadas y en una región bifásica más grande [22],[23],[41].

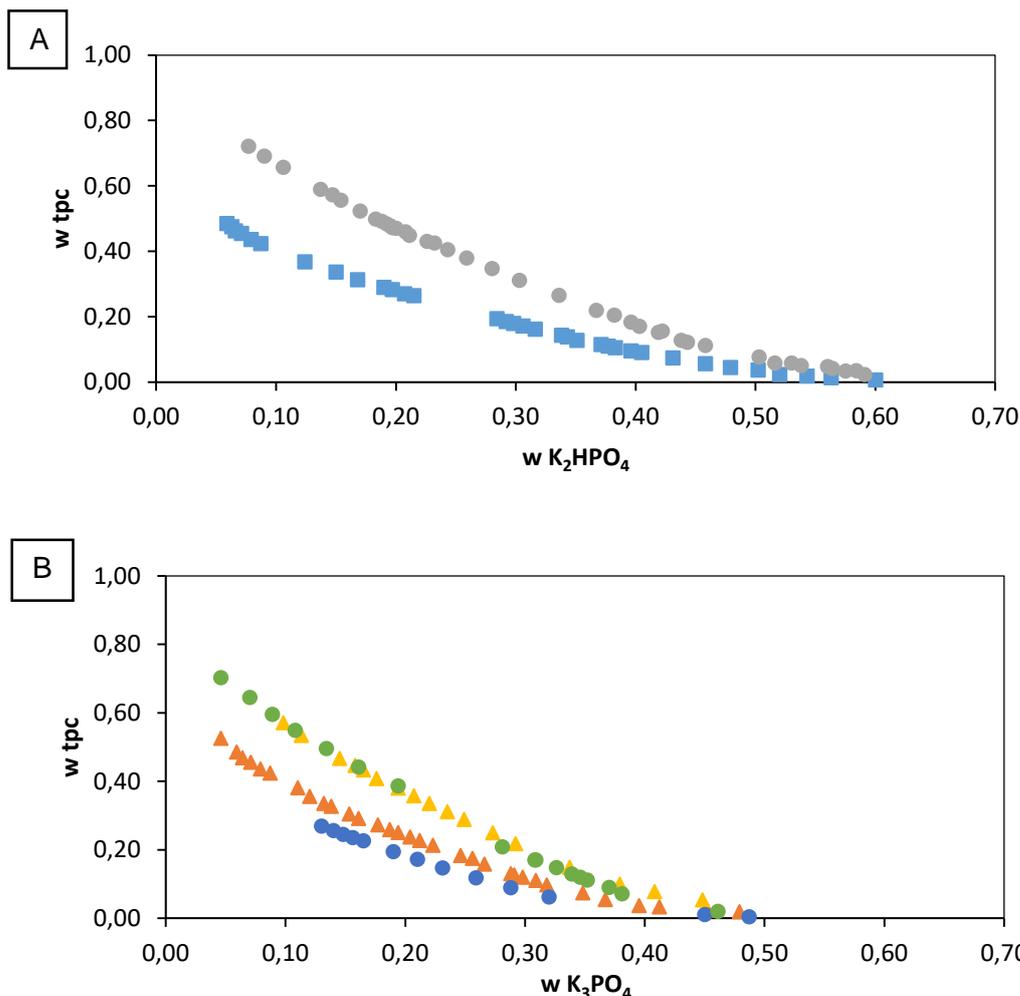


Figura 18: Curvas binodales experimentales para los sistemas formados por la sal: a) K_2HPO_4 : ChCl:2Urea (\bullet) y ChCl (\blacksquare) y b) K_3PO_4 : ChCl:2Urea (\blacktriangle), ChCl (\blacktriangle), Bet:2LA (\bullet) y Bet (\bullet). (tpc significa top phase component, para indicar que es la fracción másica del DES o HBA correspondiente en cada sistema).

Para caracterizar un ATPS, es necesario construir experimentalmente su curva binodal, pero también determinar sus rectas de reparto (TL), para conocer cómo se distribuyen los componentes del sistema entre las dos fases dependiendo de la zona en la que nos encontremos dentro de la región bifásica o inmiscible. Para ello, se determinaron experimentalmente al menos tres TL para cada sistema a $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ y presión atmosférica.

En la *Tabla 10*, se muestran las composiciones de las mezclas iniciales, así como sus correspondientes composiciones en el equilibrio (fase superior y fase inferior). A partir de estas composiciones, se pueden calcular dos parámetros muy utilizados para caracterizar las TLs como son la longitud y pendiente de las rectas de reparto (ec. 1 y 2). Estos parámetros indican el grado de separación, es decir, la diferencia entre las composiciones del DES /HBA y la sal en las dos fases.

Para todos los sistemas se encontró que la fase superior es la fase rica en el DES/HBA correspondiente mientras que la fase inferior es la fase rica en la sal correspondiente.

Para cada sistema las TLs fueron prácticamente paralelas y un aumento en la TLL conduce a un aumento de la concentración de la sal en la fase inferior y a un aumento de la concentración de DES/HBA en la fase superior.

Tabla 10: Composiciones de fase en el equilibrio (en porcentaje en masa), junto con las correspondientes longitudes (TLL) y pendientes (STL) de las rectas de reparto para los seis ATPS estudiados a $T = 25^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica.

Recta de reparto (TL)	mezcla inicial		fase superior		fase inferior		STL	TLL
	tpc	sal	tpc	sal	tpc	sal		
Bet/K₃PO₄								
TL1	15,12	25,06	26,13	13,61	2,91	37,78	-0,96	33,52
TL2	4,99	39,98	44,14	3,26	1,03	43,70	-1,07	59,11
TL3	29,97	19,83	51,32	1,38	0,78	45,04	-1,16	66,79
TL4	15,39	34,50	56,46	0,60	0,54	46,76	-1,21	72,52
Bet:2LA/K₃PO₄								
TL1	19,52	33,23	45,13	15,45	2,50	45,05	-1,44	51,90
TL2	29,83	29,57	65,32	6,46	1,43	48,06	-1,54	76,24
TL3	34,80	29,37	75,28	3,49	0,74	51,16	-1,56	88,48
ChCl/K₂HPO₄								
TL1	27,55	24,36	45,86	6,35	5,35	46,36	-1,01	56,94
TL2	29,63	30,08	63,79	0,84	2,34	53,44	-1,17	80,89
TL3	19,90	39,74	66,07	0,55	1,91	55,01	-1,18	84,15
ChCl/K₃PO₄								
TL1	22,51	22,61	34,21	13,19	7,95	34,36	-1,24	33,73
TL2	10,35	34,95	42,00	8,75	3,85	40,34	-1,21	49,53
TL3	19,99	34,94	59,33	2,63	0,66	50,82	-1,22	75,91
ChCl:2Urea/K₂HPO₄								
TL1	30,34	34,90	65,85	10,29	7,05	51,04	-1,44	71,54
TL2	39,30	30,66	73,99	7,18	5,34	53,88	-1,47	83,03
TL3	35,50	37,82	86,96	3,53	2,61	59,73	-1,50	101,36
ChCl:2Urea/K₃PO₄								
TL1	37,67	22,07	61,48	7,97	9,73	38,60	-1,69	60,13
TL2	20,78	34,61	66,80	6,12	4,96	44,41	-1,62	72,74
TL3	24,95	34,86	70,24	5,12	2,31	49,75	-1,52	81,28

4.4- Resultados del diseño experimental

Una vez caracterizados los ATPS a través de sus diagramas de fases, se eligió la TL de mayor longitud para cada ATPS para realizar los experimentos de extracción de proteínas a partir de biomasa algal. Se prepararon experimentalmente las TLs seleccionadas y a cada una de ellas se añadió una cantidad conocida de microalga y se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.6- *Procedimiento de extracción*.

4.4.1- Matriz de diseño

Se elaboró una matriz de diseño 6x3 aleatorizada haciendo réplicas por duplicado, en la cual se representa: el código del experimento (A1-A36), los factores con sus niveles: el tipo de ATPS y el tiempo de reposo, las variables de respuesta analizadas: el rendimiento de proteínas extraídas (% PRY), el rendimiento de carbohidratos extraídos (% CRY) y la ratio entre ambas (PCR), así como la desviación estándar relativa (% RSD) de proteínas y de la ratio. Todos los resultados mostrados en la matriz de diseño se refieren a los valores de

%PRY y %CRY calculados para la fase superior de cada recta de reparto, ya que se obtuvieron valores muy bajos de esas variables respuesta para las fases inferiores correspondientes. La matriz de diseño se representa en la *Tabla 11*:

Tabla 11: Matriz de diseño utilizada

Código	ATPS	Tiempo / min	PRY / %	CRY / %	PCR	RSD Prot / %	RSD PCR / %
A31	Bet / K ₃ PO ₄	10	13,09%	12,47%	1,049	1%	1%
A34	Bet / K ₃ PO ₄	10	13,31%	12,49%	1,065		
A14	Bet / K ₃ PO ₄	30	14,29%	15,25%	0,937	1%	7%
A32	Bet / K ₃ PO ₄	30	14,40%	13,96%	1,031		
A13	Bet / K ₃ PO ₄	120	19,83%	19,70%	1,007	13%	9%
A26	Bet / K ₃ PO ₄	120	16,51%	14,47%	1,141		
A12	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	10	15,37%	17,66%	0,870	10%	5%
A29	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	10	13,27%	14,11%	0,940		
A7	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	30	16,23%	16,04%	1,012	1%	2%
A9	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	30	16,57%	16,93%	0,978		
A8	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	120	18,81%	16,77%	1,122	14%	2%
A28	Bet:2LA / K ₃ PO ₄	120	15,37%	14,18%	1,084		
A1	ChCl / K ₂ HPO ₄	10	8,05%	10,68%	0,754	12%	12%
A20	ChCl / K ₂ HPO ₄	10	6,75%	10,56%	0,639		
A17	ChCl / K ₂ HPO ₄	30	6,88%	12,68%	0,542	10%	2%
A24	ChCl / K ₂ HPO ₄	30	5,95%	10,60%	0,561		
A3	ChCl / K ₂ HPO ₄	120	5,35%	12,40%	0,432	12%	7%
A4	ChCl / K ₂ HPO ₄	120	6,30%	13,29%	0,474		
A18	ChCl / K ₃ PO ₄	10	8,14%	11,43%	0,712	2%	8%
A35	ChCl / K ₃ PO ₄	10	8,43%	10,51%	0,802		
A22	ChCl / K ₃ PO ₄	30	9,47%	13,11%	0,722	1%	5%
A27	ChCl / K ₃ PO ₄	30	9,64%	12,51%	0,770		
A30	ChCl / K ₃ PO ₄	120	7,23%	13,49%	0,536	9%	11%
A33	ChCl / K ₃ PO ₄	120	6,37%	13,93%	0,457		
A6	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	10	7,85%	13,94%	0,563	11%	12%
A25	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	10	9,23%	13,93%	0,663		
A19	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	30	8,59%	14,46%	0,594	7%	3%
A23	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	30	7,78%	12,46%	0,624		
A16	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	120	12,12%	16,04%	0,755	5%	13%
A21	ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	120	11,28%	12,45%	0,906		
A10	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	10	6,39%	14,53%	0,439	5%	6%
A36	ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	10	6,85%	14,42%	0,475		
A11	ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	30	8,18%	17,18%	0,476	3%	7%
A15	ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	30	7,82%	14,86%	0,526		
A2	ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	120	8,39%	15,68%	0,535	7%	7%
A5	ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	120	9,22%	15,60%	0,591		

4.4.2- ANOVA de dos vías

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos mostrados en la *Tabla 11*, se analizaron mediante un ANOVA de dos vías: se realizó una tabla para cada una de las tres variables: rendimiento de proteínas extraídas (PRY), rendimiento de carbohidratos extraídos (CRY) y su ratio (PCR). En la tabla de ANOVA se analizan los efectos principales de los factores (tipo de ATPS y tiempo de reposo) y su interacción, recogidos en la *Tabla 14 - Tabla 16* de los Anexos. En la *Tabla 12* se reflejan los p-valores obtenidos para las tres variables:

Tabla 12: p-valores obtenidos para cada variable

Factores	PRY	CRY	PCR
<i>ATPS</i>	$2,21 \cdot 10^{-12}$	$5,28 \cdot 10^{-4}$	$1,64 \cdot 10^{-12}$
<i>Tiempo</i>	0,0027	0,0270	0,5932
<i>Interacción</i>	0,0018	0,5688	$3,73 \cdot 10^{-5}$

Los p-valores resaltados en color rojo son aquellos que están por debajo del nivel de significación ($\alpha = 0,05$) y, por tanto, son los factores y las interacciones que presentan un efecto significativo en la variable a estudiar, aceptando la hipótesis alternativa (H_1):

- Para el PRY, ambos factores y la interacción presentan efectos significativos, siendo principalmente importante el factor ATPS (p-valor $\ll \alpha$).
- Respecto al CRY, ambos factores presentan efectos significativos, siendo un poco más acusado en el factor ATPS. La interacción resultó ser no significativa.
- En la relación PCR, el factor ATPS y la interacción presentan efectos significativos, siendo muy acusado en el factor ATPS como en el % PRY, mientras que el tiempo resulta no influir significativamente en el proceso (p-valor $> \alpha$).

Los resultados medios obtenidos para cada variable se recogen en las tablas de medias de los Anexos (*Tabla 17 - Tabla 19*) y para conocer entre qué ATPS existe una diferencia significativa, se realizó la prueba LSD de rangos múltiples, cuyos resultados se detallan entre la *Tabla 20 - Tabla 22* de los Anexos. También, se muestran las gráficas de interacción entre la variable de respuesta y el factor ATPS (*Figura 22 - Figura 24*), aunque la interacción no sea significativa en la recuperación de carbohidratos.

Para ver con qué tipo de ATPS se obtienen mejores resultados (mayores rendimientos en la extracción de proteínas), se representan entre la *Figura 19 - Figura 21* los gráficos de medias para cada variable:

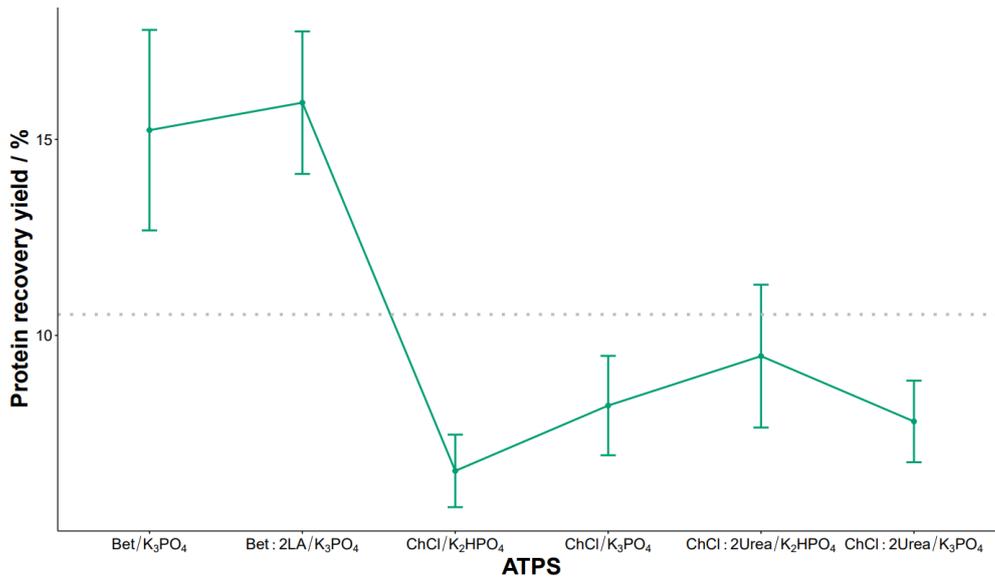


Figura 19: Gráfico de medias para el % PRY para los distintos ATPSs estudiados. La línea punteada indica la gran media.

En la Figura 19, se observa que los ATPSs formados por Bet/ K_3PO_4 (15,238%) y los formados por Bet:2LA/ K_3PO_4 (15,938%) son aquellos que presentan mejores rendimientos de extracción de proteínas y los que no presentan diferencias significativas entre ellos (Tabla 20). Además, el resto están por debajo de la media (puntos discontinuos de color gris) y se observan diferencias significativas. Y respecto al factor tiempo de reposo, se obtuvo una mayor extracción media del 11,398% a los 120 min (Tabla 17).

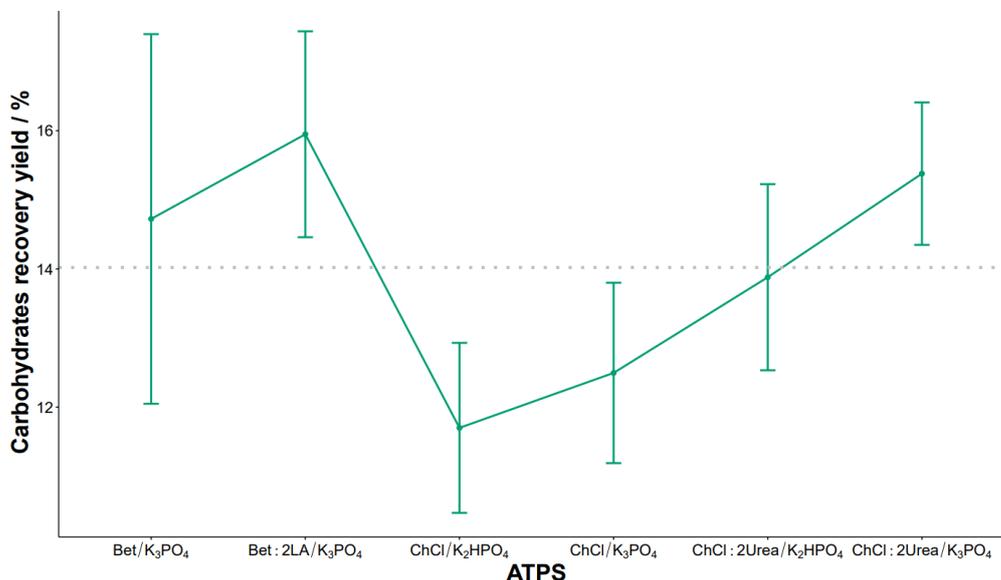


Figura 20: Gráfico de medias para el % CRY para los distintos ATPSs estudiados. La línea punteada indica la gran media.

En la Figura 20, se aprecia que los ATPSs formados por ChCl/ K_2HPO_4 (11,702%), ChCl/ K_3PO_4 (12,497%) y ChCl:2Urea/ K_2HPO_4 (13,880%) son los sistemas que presentan menores rendimientos en la extracción de carbohidratos, pero también son aquellos que incrementan la variable PCR, cuyo objetivo es maximizarla y, en consecuencia, disminuir

el % CRY. Estos tres sistemas presentan diferencias significativas entre ellos (*Tabla 21*). En este caso, se consiguió la menor extracción media posible del 13,06% con un tiempo de reposo de 10 min (13,061%) (*Tabla 18*).

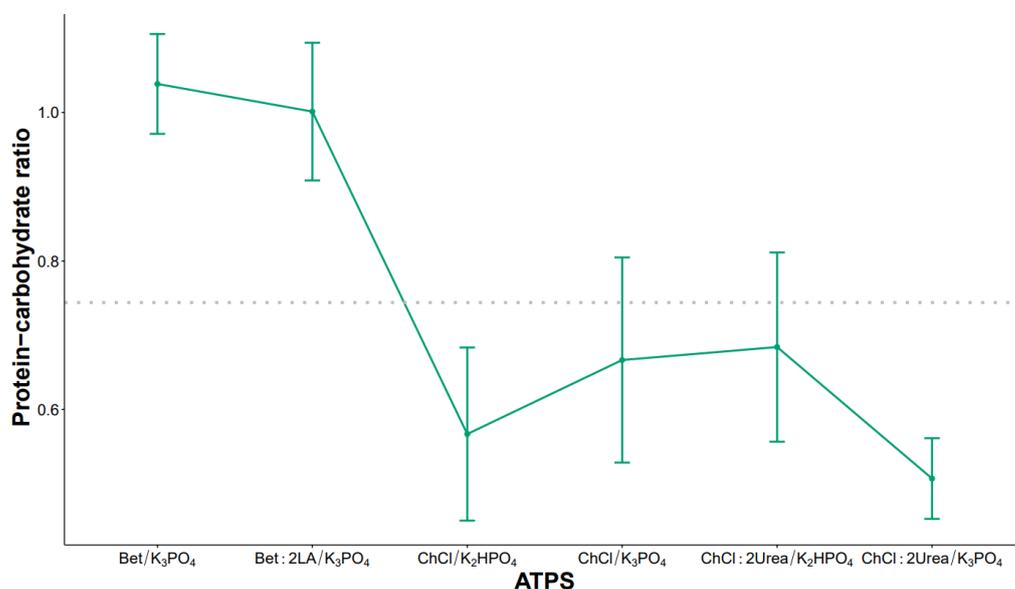


Figura 21: Gráfico de medias para la PCR para los distintos ATPSs estudiados. La línea punteada indica la gran media.

En la *Figura 21*, se observa que los ATPSs formados por Bet/K₃PO₄ (1,038) y Bet:2LA/K₃PO₄ (1,001) son aquellos que presentan mejores ratios, por lo que proporcionan una mayor eficiencia en la extracción de proteínas al mismo tiempo que se reduce la coextracción de carbohidratos. El resto de ATPSs presentan valores de PCR por debajo de la media y, además, se observan diferencias significativas (*Tabla 22*). Y en este caso, el factor tiempo de reposo no es un factor significativo ($p > \alpha$), aunque se consiguió ligeramente un mayor PCR a los 120 min (0,753) respecto al más bajo con 30 min (0,731) (*Tabla 19*).

5. CONCLUSIONES

En este trabajo, se ha estudiado el potencial que presentan los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) para la recuperación de proteínas de una microalga liofilizada y crecida en fotobiorreactores de tratamiento de purines porcinos. Para ello, los ATPSs se han preparado combinando disolventes eutécticos profundos (DES) o uno de sus compuestos formadores con sales de fosfato, resultando en una alternativa prometedora a los sistemas convencionales de extracción debido a su bajo coste y baja toxicidad.

Las conclusiones que se pueden sacar de este trabajo son las siguientes:

- Durante la caracterización física de los dos DESs, se midieron la viscosidad (η) y la densidad (ρ): en ambos casos disminuían a medida que aumentaba la temperatura, la η sigue una tendencia exponencial (se ajusta adecuadamente al modelo VFT) y la ρ , una tendencia lineal. Para el DES ChCl:2Urea se obtuvieron valores de ambas propiedades físicas más altos que para el Bet:2LA.
- Durante la caracterización física de los dos DESs, se midieron la viscosidad (η) y la densidad (ρ): en ambos casos disminuían a medida que aumentaba la temperatura, la η sigue una tendencia exponencial (se ajusta adecuadamente al modelo de VFT) y la ρ sigue una tendencia lineal. Para el DES ChCl:2Urea se obtuvieron valores de ambas propiedades físicas más altos que para el Bet:2LA.
- A través del análisis espectroscópico mediante FTIR-ATR de los compuestos de partida y los DES puros, se verificó la formación de los DES a través de los enlaces de hidrógeno que formaban los compuestos de partida.
- Se han construido los diagramas de fases para los seis ATPSs utilizados en este trabajo mediante la determinación experimental de las curvas binodales y las rectas de reparto. Los ATPS formados por HBA (ChCl y Bet) presentaron mayor región bifásica que los ATPS formados por los DES correspondientes (ChCl:2Urea y Bet:2LA). Además, para cada ATPS se encontraron TLs paralelas y que un aumento de la TLL, conlleva a un aumento en la concentración de la sal en la fase inferior y a un aumento de la concentración de DES o HBA en la fase superior.
- Realizada la matriz de diseño 6x3 por duplicada y aleatorizada, mediante el tratamiento estadístico del ANOVA de dos vías se obtiene que:
 - El factor ATPS fue un factor con un efecto muy significativo para las tres variables a estudiar, el factor tiempo de reposo fue menos significativo y no lo fue para PCR y, la interacción de los factores fue ligeramente significativo para el % PRY, pero muy acusado para el PCR.
 - Los ATPSs que proporcionan mejores ratios (PCR) son los formados por Bet/ K_3PO_4 (1,038) y Bet:2LA/ K_3PO_4 (1,001) con unos valores de porcentaje de recuperación de proteínas del 15,238% y 15,937%, respectivamente, obteniendo mejores resultados para tiempos de reposo de 120 min. En cambio, para la recuperación

mínima de carbohidratos, destacaron los ATPSs formados por $\text{ChCl}/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (11,702%), $\text{ChCl}/\text{K}_3\text{PO}_4$ (12,497%) y $\text{ChCl}:2\text{Urea}/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (13,880%).

En resumen, los resultados que se han obtenido para los rendimientos de extracción de proteínas son modestos (< 16%), donde la técnica empleada con ATPS ha sido relativamente selectiva a las proteínas en el proceso de coextracción de carbohidratos y requiere condiciones muy suaves y tiempos relativamente cortos. Los sistemas ATPS son una técnica de separación que está en auge y en pleno desarrollo, pues ofrece una serie de ventajas incluyendo los DESs (economía, rapidez, toxicidad, ...) respecto a las técnicas de recuperación de proteínas convencionales. Por tanto, es conveniente que en un futuro próximo se investigue la formación de ATPSs que presenten un mayor rendimiento de extracción de proteínas, así como una mejor selectividad respecto a los carbohidratos, estudiando otros tipos de factores que puedan afectar al rendimiento de extracción. Además, sería recomendable poder escalar el proceso para utilizar cantidades de microalga más grandes.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. M. Rojo, I. Piedra, A. M. González, M. Vega, and S. Bolado, "Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 335, no. March, 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125256.
- [2] V. O. Galarza, "Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales," *Brazilian J. Food Technol.*, vol. 22, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1590/1981-6723.04319.
- [3] M. del C. Cerón- Garcia, "Producción De Microalgas Con Aplicaciones Nutricionales Para Humanos Y Animales," *Cuad. Estud. Agroaliment.*, vol. 5, pp. 87–105, 2013.
- [4] Y. Wang, S. M. Tibbetts, and P. J. McGinn, "Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements," *Foods*, vol. 10, no. 12, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3390/foods10123002.
- [5] I. Ahmad, N. Abdullah, I. Koji, A. Yuzir, and S. E. Mohamad, "Potential of microalgae in bioremediation of wastewater," *Bull. Chem. React. Eng. Catal.*, vol. 16, no. 2, pp. 413–429, 2021, doi: 10.9767/bcrec.16.2.10616.413-429.
- [6] M. L. Amorim, J. Soares, J. S. dos R. Coimbra, M. de O. Leite, L. F. T. Albino, and M. A. Martins, "Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 61, no. 12, pp. 1976–2002, 2021, doi: 10.1080/10408398.2020.1768046.
- [7] L. Anjos, J. Estêvão, C. Infante, L. Mantecón, and D. M. Power, "Extracting protein from microalgae (*Tetraselmis chuii*) for proteome analysis," *MethodsX*, vol. 9, 2022, doi: 10.1016/j.mex.2022.101637.
- [8] M. P. Caporgno and A. Mathys, "Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits," *Front. Nutr.*, vol. 5, no. July, pp. 1–10, 2018, doi: 10.3389/fnut.2018.00058.
- [9] K. W. Chew *et al.*, "Microalgae biorefinery: High value products perspectives," *Bioresour. Technol.*, vol. 229, pp. 53–62, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006.
- [10] V. Kafarov, "BIOREFINERY : ISSUES," vol. 4, pp. 5–22, 2011.
- [11] M. Vanthoor-Koopmans, R. H. Wijffels, M. J. Barbosa, and M. H. M. Eppink, "Biorefinery of microalgae for food and fuel," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 142–149, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.10.135.
- [12] J. L. Guzmán, F. G. Acién, and M. Berenguel, "Modelado y control de la producción de microalgas en fotobiorreactores industriales," *Rev. Iberoam. Automática e Informática Ind.*, vol. 18, no. 1, p. 1, 2020, doi: 10.4995/riai.2020.13604.
- [13] D. Moldes, E. M. Rojo, S. Bolado, P. A. García-Encina, and B. Comesaña-Gándara, "Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae," *Appl. Sci.*, vol. 12, no. 5, 2022, doi: 10.3390/app12052391.
- [14] S. Khanra, M. Mondal, G. Halder, O. N. Tiwari, K. Gayen, and T. K. Bhowmick, "Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review," *Food Bioprod. Process.*, vol. 110, pp. 60–84, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.002.
- [15] M. A. R. Martins, S. P. Pinho, and J. A. P. Coutinho, "Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures," *J. Solution Chem.*, vol. 48, no. 7, pp. 962–982, 2019, doi: 10.1007/s10953-018-0793-1.

- [16] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 21, pp. 11060–11082, 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [17] B. B. Hansen *et al.*, "Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications," *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 3, pp. 1232–1285, 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [18] M. Iqbal *et al.*, "Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications," *Biol. Proced. Online*, vol. 18, no. 1, pp. 1–18, 2016, doi: 10.1186/s12575-016-0048-8.
- [19] S. Raja, V. R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, and V. Ramesh, "Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review," *Sci. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 7–16, 2012, doi: 10.5923/j.scit.20110101.02.
- [20] J. P. Chen and M. S. Lee, "Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 17, no. 11, pp. 1021–1027, 1995, doi: 10.1016/0141-0229(95)00030-5.
- [21] Y. Shu, M. Gao, X. Wang, R. Song, J. Lu, and X. Chen, "Separation of curcuminoids using ionic liquid based aqueous two-phase system coupled with in situ dispersive liquid-liquid microextraction," *Talanta*, vol. 149, pp. 6–12, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.11.009.
- [22] K. Xu, Y. Wang, Y. Huang, N. Li, and Q. Wen, "A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting," *Anal. Chim. Acta*, vol. 864, no. March 2015, pp. 9–20, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2015.01.026.
- [23] N. Li, Y. Wang, K. Xu, Y. Huang, Q. Wen, and X. Ding, "Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein," *Talanta*, vol. 152, pp. 23–32, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.01.042.
- [24] M. G. Freire *et al.*, "Aqueous biphasic systems: A boost brought about by using ionic liquids," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 14, pp. 4966–4995, 2012, doi: 10.1039/c2cs35151j.
- [25] J. Rivera and M. Pérez, "Empleo del sistema potenciométrico Karl Fischer en el desarrollo y la certificación de Materiales de Referencia (MR)," *Simp. Metrol.*, no. August, pp. 1–5, 2006.
- [26] F. O. Farias, F. H. B. Sosa, L. Igarashi-Mafra, J. A. P. Coutinho, and M. R. Mafra, "Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars) + K₂HPO₄ + water," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 448, pp. 143–151, 2017, doi: 10.1016/j.fluid.2017.05.018.
- [27] J. C. Merchuk, B. A. Andrews, and J. A. Asenjo, "Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 711, no. 1–2, pp. 285–293, 1998, doi: 10.1016/S0378-4347(97)00594-X.
- [28] K. E. Gutowski *et al.*, "Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 22, pp. 6632–6633, 2003, doi: 10.1021/ja0351802.
- [29] P. L. Kirk, "Kjeldahl Method for Total Nitrogen," *Anal. Chem.*, vol. 22, no. 2, pp. 354–358, 1950, doi: 10.1021/ac60038a038.
- [30] S. Van Wychen and L. M. L. Laurens, "Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass," *Tech. Rep. NREL/TP-5100-60957 Natl. Renew. Energy Lab.*, no.

December, p. 17, 2013.

- [31] S. Aravind, D. Barik, P. Ragupathi, and G. Vignesh, "Investigation on algae oil extraction from algae *Spirogyra* by Soxhlet extraction method," *Mater. Today Proc.*, vol. 43, pp. 308–313, 2020, doi: 10.1016/j.matpr.2020.11.668.
- [32] E. Gómez, P. F. Requejo, E. Tojo, and E. A. Macedo, "Recovery of flavonoids using novel biodegradable choline amino acids ionic liquids based ATPS," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 493, pp. 1–9, 2019, doi: 10.1016/j.fluid.2019.03.024.
- [33] T. Scientific, "BCA™ Protein Assay Kit," *BCA Protein Assay Kit*, vol. 0747, no. 23225, pp. 6–7, 2007.
- [34] C. Analysis, "153 10-2," pp. 153–154.
- [35] A. Yadav and S. Pandey, "Densities and viscosities of (choline chloride + urea) deep eutectic solvent and its aqueous mixtures in the temperature range 293.15 K to 363.15 K," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 59, no. 7, pp. 2221–2229, 2014, doi: 10.1021/je5001796.
- [36] P. B. Sánchez, B. González, J. Salgado, J. José Parajó, and Á. Domínguez, "Physical properties of seven deep eutectic solvents based on L-proline or betaine," *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 131, pp. 517–523, 2019, doi: 10.1016/j.jct.2018.12.017.
- [37] D. Yue, Y. Jia, Y. Yao, J. Sun, and Y. Jing, "Structure and electrochemical behavior of ionic liquid analogue based on choline chloride and urea," *Electrochim. Acta*, vol. 65, no. 30, pp. 30–36, 2012, doi: 10.1016/j.electacta.2012.01.003.
- [38] C. Zhang *et al.*, "Recovery of silver from crystal silicon solar panels in Self-Synthesized choline Chloride-Urea solvents system," *Waste Manag.*, vol. 150, no. 2360, pp. 280–289, 2022, doi: 10.1016/j.wasman.2022.07.003.
- [39] F. Mohd Fuad and M. Mohd Nadzir, "The formulation and physicochemical properties of betaine-based natural deep eutectic solvent," *J. Mol. Liq.*, vol. 360, p. 119392, 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.119392.
- [40] F. Mohd Fuad and M. Mohd Nadzir, "Ultrasound-assisted extraction of asiaticoside from *Centella asiatica* using betaine-based natural deep eutectic solvent," *Ind. Crops Prod.*, vol. 192, no. November 2022, p. 116069, 2023, doi: 10.1016/j.indcrop.2022.116069.
- [41] P. Xu *et al.*, "Development of deep eutectic solvent-based aqueous biphasic system for the extraction of lysozyme," *Talanta*, vol. 202, no. April, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.04.053.

7. ANEXOS

7.1- Composiciones experimentales de las curvas binodales

Tabla 13: Datos experimentales de las curvas binodales (fracción másica) para los ATPS estudiados DES/HBA (1)/ sal (2) determinados a $T = 25^{\circ}\text{C}$ y presión atmosférica.

Bet/ K_3PO_4		Bet:2LA/ K_3PO_4		ChCl:2Urea/ K_3PO_4	
w_1	w_2	w_1	w_2	w_1	w_2
0,004	0,487	0,02	0,461	0,053	0,448
0,011	0,45	0,071	0,381	0,078	0,408
0,062	0,32	0,09	0,37	0,099	0,379
0,089	0,288	0,111	0,352	0,149	0,337
0,118	0,259	0,12	0,346	0,218	0,292
0,147	0,231	0,129	0,339	0,249	0,273
0,172	0,21	0,17	0,309	0,288	0,249
0,194	0,19	0,208	0,281	0,311	0,235
0,226	0,165	0,148	0,326	0,335	0,22
0,235	0,156	0,17	0,308	0,357	0,207
0,245	0,148	0,386	0,194	0,38	0,194
0,256	0,14	0,441	0,161	0,408	0,176
0,269	0,13	0,495	0,134	0,433	0,165
		0,549	0,108	0,446	0,158
		0,595	0,089	0,467	0,145
		0,645	0,07	0,534	0,113
		0,702	0,046	0,571	0,098
ChCl/ K_2HPO_4		ChCl/ K_3PO_4		ChCl:2Urea/ K_2HPO_4	
w_1	w_2	w_1	w_2	w_1	w_2
0,007	0,600	0,019	0,479	0,024	0,591
0,014	0,563	0,024	0,452	0,034	0,575
0,019	0,543	0,033	0,412	0,035	0,584
0,024	0,52	0,037	0,395	0,042	0,564
0,037	0,502	0,054	0,367	0,048	0,56
0,045	0,479	0,074	0,348	0,051	0,538
0,057	0,458	0,097	0,318	0,059	0,53
0,074	0,431	0,11	0,309	0,059	0,516
0,091	0,405	0,12	0,298	0,077	0,503
0,096	0,396	0,126	0,291	0,112	0,458
0,106	0,383	0,13	0,288	0,122	0,443
0,11	0,377	0,158	0,266	0,128	0,438
0,115	0,371	0,175	0,256	0,152	0,419
0,128	0,351	0,183	0,246	0,156	0,422
0,139	0,343	0,213	0,223	0,171	0,403
0,144	0,338	0,227	0,212	0,184	0,396

Continuación de la Tabla 13					
ChCl/K ₂ HPO ₄		ChCl/K ₃ PO ₄		ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	
W ₁	W ₂	W ₁	W ₂	W ₁	W ₂
0,162	0,316	0,237	0,204	0,205	0,382
0,172	0,306	0,25	0,194	0,22	0,367
0,18	0,298	0,259	0,187	0,266	0,336
0,186	0,292	0,273	0,177	0,312	0,303
0,194	0,284	0,291	0,161	0,348	0,28
0,265	0,215	0,304	0,153	0,38	0,259
0,271	0,207	0,327	0,138	0,405	0,243
0,283	0,197	0,335	0,132	0,426	0,232
0,29	0,19	0,356	0,12	0,431	0,226
0,313	0,168	0,381	0,11	0,449	0,211
0,337	0,15	0,424	0,087	0,46	0,208
0,368	0,124	0,436	0,079	0,471	0,2
0,424	0,087	0,455	0,071	0,473	0,197
0,436	0,079	0,468	0,064	0,478	0,195
0,455	0,071	0,485	0,059	0,484	0,192
0,463	0,066	0,525	0,046	0,499	0,183
0,475	0,063			0,492	0,188
0,485	0,059			0,523	0,17
				0,556	0,154
				0,573	0,147
				0,59	0,137
				0,657	0,106
				0,691	0,09
				0,721	0,077

7.2- Tablas de ANOVA

Tabla 14: ANOVA del % PRY

Fuente	gdl	SS	MS	F	p-valor
<i>Factor A: ATPS</i>	5	0,04869	0,00974	97,25	2,21·10 ⁻¹²
<i>Factor B: Tiempo</i>	2	0,00168	0,00084	8,39	0,0027
<i>Interacción AxB</i>	10	0,00486	0,00049	4,85	0,0018
<i>Residual</i>	18	0,00180	0,00010		
<i>Total</i>	35	0,05704			

Tabla 15: ANOVA del % CRY

Fuente	gdl	SS	MS	F	p-valor
Factor A: ATPS	5	0,00826	0,00165	7,63	5,28·10 ⁻⁴
Factor B: Tiempo	2	0,00192	0,00096	4,45	0,0270
Interacción AxB	10	0,00190	0,00019	0,88	0,5688
Residual	18	0,00390	0,00022		
Total	35	0,01599			

Tabla 16: ANOVA del PCR

Fuente	gdl	SS	MS	F	p-valor
Factor A: ATPS	5	1,49859	0,29972	100,67	1,64·10 ⁻¹²
Factor B: Tiempo	2	0,00320	0,00160	0,54	0,5932
Interacción AxB	10	0,26769	0,02677	8,99	3,73·10 ⁻⁵
Residual	18	0,05359	0,00298		
Total	35	1,82307			

7.3- Tablas de medias

Tabla 17: Tabla de medias para la variable de respuesta PRY

Nivel	Casos	Media	Error Estimado
MEDIA GLOBAL	36	10,536%	
ATPS			
Bet / K ₃ PO ₄	6	15,238%	0,409%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄	6	15,937%	0,409%
ChCl / K ₂ HPO ₄	6	6,547%	0,409%
ChCl / K ₃ PO ₄	6	8,213%	0,409%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	6	9,475%	0,409%
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	6	7,808%	0,409%
Tiempo / min			
10	12	9,728%	0,289%
30	12	10,483%	0,289%
120	12	11,398%	0,289%
ATPS por Tiempo / min			
Bet / K ₃ PO ₄ ;10	2	13,200%	0,708%
Bet / K ₃ PO ₄ ;30	2	14,345%	0,708%
Bet / K ₃ PO ₄ ;120	2	18,170%	0,708%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ ;10	2	14,320%	0,708%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ ;30	2	16,400%	0,708%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ ;120	2	17,090%	0,708%
ChCl / K ₂ HPO ₄ ;10	2	7,400%	0,708%
ChCl / K ₂ HPO ₄ ;30	2	6,415%	0,708%
ChCl / K ₂ HPO ₄ ;120	2	5,825%	0,708%
ChCl / K ₃ PO ₄ ;10	2	8,285%	0,708%
ChCl / K ₃ PO ₄ ;30	2	9,555%	0,708%
ChCl / K ₃ PO ₄ ;120	2	6,800%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;10	2	8,540%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;30	2	8,185%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;120	2	11,700%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;10	2	6,620%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;30	2	8,000%	0,708%
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;120	2	8,805%	0,708%

Tabla 18: Tabla de medias para la variable de respuesta CRY

Nivel	Casos	Media	Error Estimado
MEDIA GLOBAL	36	14,021%	
ATPS			
Bet / K₃PO₄	6	14,723%	0,601%
Bet:2LA / K₃PO₄	6	15,948%	0,601%
ChCl / K₂HPO₄	6	11,702%	0,601%
ChCl / K₃PO₄	6	12,497%	0,601%
ChCl:2Urea/K₂HPO₄	6	13,880%	0,601%
ChCl:2Urea/K₃PO₄	6	15,378%	0,601%
Tiempo / min			
10	12	13,061%	0,425%
30	12	14,170%	0,425%
120	12	14,833%	0,425%
ATPS por Tiempo / min			
Bet / K₃PO₄;10	2	12,480%	1,040%
Bet / K₃PO₄;30	2	14,605%	1,040%
Bet / K₃PO₄;120	2	17,085%	1,040%
Bet:2LA / K₃PO₄;10	2	15,885%	1,040%
Bet:2LA / K₃PO₄;30	2	16,485%	1,040%
Bet:2LA / K₃PO₄;120	2	15,475%	1,040%
ChCl / K₂HPO₄;10	2	10,620%	1,040%
ChCl / K₂HPO₄;30	2	11,640%	1,040%
ChCl / K₂HPO₄;120	2	12,845%	1,040%
ChCl / K₃PO₄;10	2	10,970%	1,040%
ChCl / K₃PO₄;30	2	12,810%	1,040%
ChCl / K₃PO₄;120	2	13,710%	1,040%
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;10	2	13,935%	1,040%
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;30	2	13,460%	1,040%
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;120	2	14,245%	1,040%
ChCl:2Urea/K₃PO₄;10	2	14,475%	1,040%
ChCl:2Urea/K₃PO₄;30	2	16,020%	1,040%
ChCl:2Urea/K₃PO₄;120	2	15,640%	1,040%

Tabla 19: Tabla de medias para la variable de respuesta PCR

Nivel	Casos	Media	Error Estimado
MEDIA GLOBAL	36	0,744	
ATPS			
Bet / K₃PO₄	6	1,038	0,022
Bet:2LA / K₃PO₄	6	1,001	0,022
ChCl / K₂HPO₄	6	0,567	0,022
ChCl / K₃PO₄	6	0,667	0,022
ChCl:2Urea/K₂HPO₄	6	0,684	0,022
ChCl:2Urea/K₃PO₄	6	0,507	0,022
Tiempo / min			
10	12	0,748	0,016
30	12	0,731	0,016
120	12	0,753	0,016
ATPS por Tiempo / min			
Bet / K₃PO₄;10	2	1,057	0,039
Bet / K₃PO₄;30	2	0,984	0,039
Bet / K₃PO₄;120	2	1,074	0,039
Bet:2LA / K₃PO₄;10	2	0,905	0,039
Bet:2LA / K₃PO₄;30	2	0,995	0,039
Bet:2LA / K₃PO₄;120	2	1,103	0,039
ChCl / K₂HPO₄;10	2	0,697	0,039
ChCl / K₂HPO₄;30	2	0,552	0,039
ChCl / K₂HPO₄;120	2	0,453	0,039
ChCl / K₃PO₄;10	2	0,757	0,039
ChCl / K₃PO₄;30	2	0,746	0,039
ChCl / K₃PO₄;120	2	0,497	0,039
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;10	2	0,613	0,039
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;30	2	0,609	0,039
ChCl:2Urea/K₂HPO₄;120	2	0,831	0,039
ChCl:2Urea/K₃PO₄;10	2	0,457	0,039
ChCl:2Urea/K₃PO₄;30	2	0,501	0,039
ChCl:2Urea/K₃PO₄;120	2	0,563	0,039

7.4- Prueba LSD de rangos múltiples

Tabla 20: Prueba LSD por ATPSs para PRY

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ChCl / K ₂ HPO ₄	6	6,547%	0,409%	X
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	6	7,808%	0,409%	X
ChCl / K ₃ PO ₄	6	8,213%	0,409%	X
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	6	9,475%	0,409%	X
Bet / K ₃ PO ₄	6	15,238%	0,409%	X
Bet:2LA / K ₃ PO ₄	6	15,937%	0,409%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Bet / K ₃ PO ₄ - Bet:2LA / K ₃ PO ₄		-0,698%	1,214%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	8,692%	1,214%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	7,025%	1,214%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	5,763%	1,214%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	7,430%	1,214%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	9,390%	1,214%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	7,723%	1,214%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	6,462%	1,214%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	8,128%	1,214%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	-1,667%	1,214%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	-2,928%	1,214%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	-1,262%	1,214%
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	-1,262%	1,214%
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄		0,405%	1,214%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	1,667%	1,214%

* indica una diferencia significativa

Tabla 21: Prueba LSD por ATPSs para CRY

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ChCl / K ₂ HPO ₄	6	11,702%	0,601%	X
ChCl / K ₃ PO ₄	6	12,497%	0,601%	XX
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	6	13,880%	0,601%	XX
Bet / K ₃ PO ₄	6	14,723%	0,601%	XX
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	6	15,378%	0,601%	XX
Bet:2LA / K ₃ PO ₄	6	15,948%	0,601%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Bet / K ₃ PO ₄ - Bet:2LA / K ₃ PO ₄		-1,225%	1,78478%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	3,02167%	1,78478%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	2,22667%	1,78478%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄		0,843333%	1,78478%
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄		-0,655%	1,78478%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	4,24667%	1,78478%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	3,45167%	1,78478%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	2,06833%	1,78478%
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄		0,570%	1,78478%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄		-0,795%	1,78478%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	-2,17833%	1,78478%
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	-3,67667%	1,78478%
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄		-1,38333%	1,78478%
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	-2,88167%	1,78478%
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄		-1,49833%	1,78478%

* indica una diferencia significativa

Tabla 22: Prueba LSD por ATPSs para PCR

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
ChCl:2Urea / K ₃ PO ₄	6	0,507	0,022	X
ChCl / K ₂ HPO ₄	6	0,567	0,022	X
ChCl / K ₃ PO ₄	6	0,667	0,022	X
ChCl:2Urea / K ₂ HPO ₄	6	0,684	0,022	X
Bet:2LA / K ₃ PO ₄	6	1,001	0,022	X
Bet / K ₃ PO ₄	6	1,038	0,022	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Bet / K ₃ PO ₄ - Bet:2LA / K ₃ PO ₄		0,037	0,066
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	0,471	0,066
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	0,372	0,066
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	0,354	0,066
Bet / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	0,531	0,066
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₂ HPO ₄	*	0,434	0,066
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	0,335	0,066
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	0,317	0,066
Bet:2LA / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	0,494	0,066
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl / K ₃ PO ₄	*	-0,100	0,066
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	*	-0,117	0,066
ChCl / K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄		0,060	0,066
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄		-0,018	0,066
ChCl / K ₃ PO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	0,160	0,066
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ - ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	*	0,177	0,066

* indica una diferencia significativa.

7.5- Gráficos de interacción

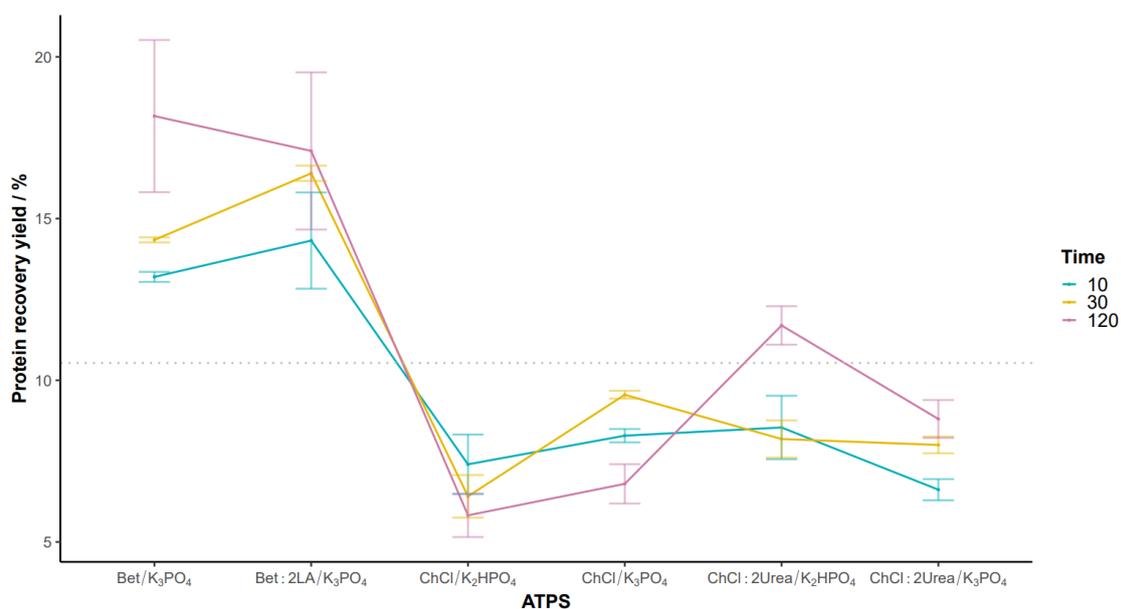


Figura 22: Gráfico de interacción Tiempo vs ATPS para el PRY

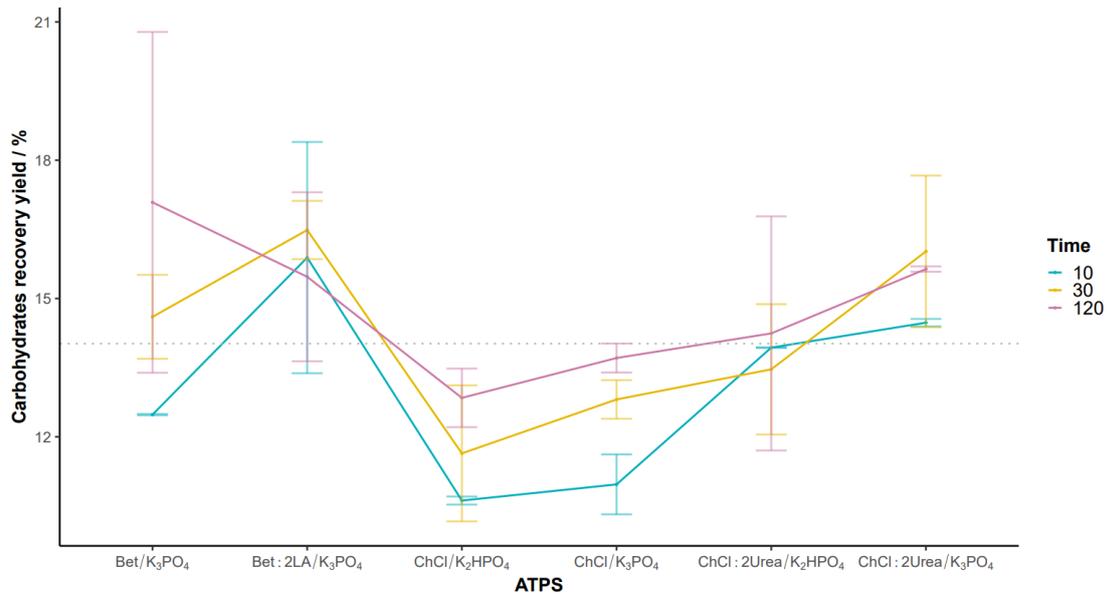


Figura 23: Gráfico de interacción Tiempo vs ATPS para CRY

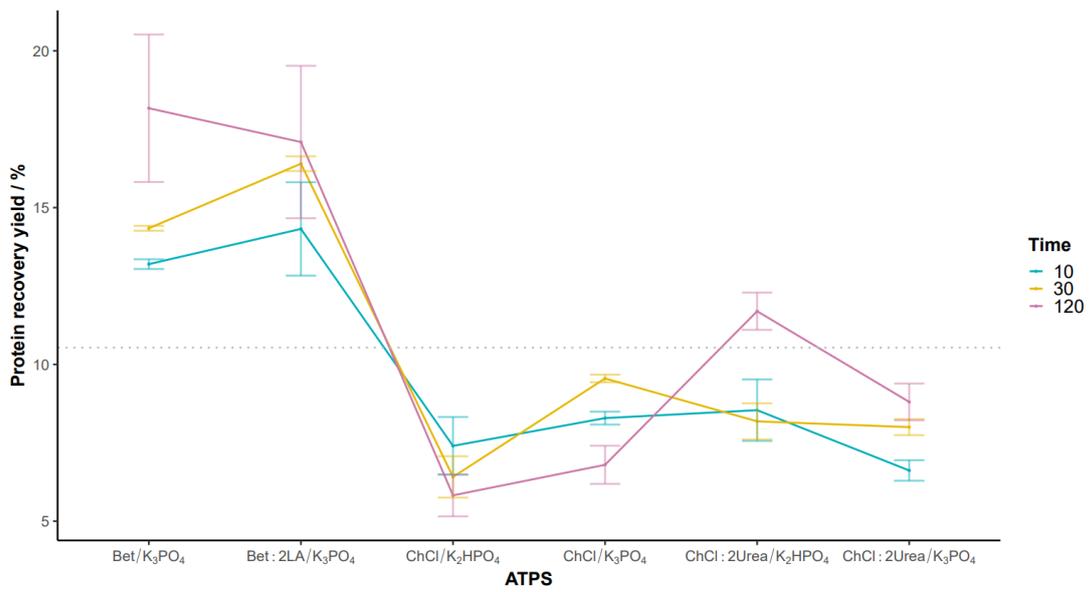


Figura 24: Gráfico de interacción Tiempo vs ATPS para PCR