



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

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

**EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE
FANGOS DE PLANTAS DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES MEDIANTE SISTEMAS
BIFÁSICOS ACUOSOS**

Autor: David Izquierdo Ortega

Tutores: David Moldes Plaza / Patricia Fernández Requejo

2024

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CONTEXTO Y PROBLEMÁTICA.....	1
1.2	VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS	2
1.3	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE FANGOS	5
1.4	DISOLVENTES CON EUTÉCTICO PROFUNDO (DES)	7
1.5	SISTEMAS BIFÁSICOS ACUOSOS (ATPS)	10
2	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	13
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1	MATERIAL GENERAL.....	14
3.2	LISTADOS DE EQUIPOS	14
3.3	LISTADO DE REACTIVOS	14
3.4	PREPARACIÓN DE LOS DES	15
3.5	DETERMINACIÓN DE LOS DIAGRAMAS DE FASES DE LOS ATPS	15
3.5.1	<i>Curvas Binodales</i>	<i>16</i>
3.5.2	<i>Rectas de reparto</i>	<i>17</i>
3.6	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	19
3.6.1	<i>Análisis de proteínas</i>	<i>19</i>
3.6.2	<i>Análisis de carbohidratos</i>	<i>20</i>
3.7	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN CON LOS ATPS.....	20
3.8	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS	21
3.8.1	<i>Método de determinación de proteínas: método del ácido bicinconínico.....</i>	<i>21</i>
3.8.2	<i>Método de determinación de carbohidratos: método del Fenol-Sulfúrico</i>	<i>22</i>
3.8.3	<i>Presencia de interferentes: ácidos húmicos.....</i>	<i>23</i>
3.9	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA	26
4.2	DIAGRAMAS DE FASES DE LOS ATPS	26
4.3	RESULTADOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	30
4.3.1	<i>Matriz de diseño.....</i>	<i>31</i>
4.3.2	<i>ANOVA de dos vías</i>	<i>32</i>
5	CONCLUSIONES.....	38

6	BIBLIOGRAFÍA.....	39
	ANEXO I.....	45
•	COMPOSICIONES EXPERIMENTALES DE LAS CURVAS BINODALES	45
•	TABLAS DE ANOVA	46
•	TABLAS DE MEDIAS.....	47
	ANEXO II: LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.....	49

RESUMEN

La gestión y valorización de los fangos generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) supone un reto ambiental y económico importante. Este trabajo aborda el desarrollo de una alternativa sostenible para la recuperación de proteínas a partir de fangos secundarios mediante el uso de sistemas bifásicos acuosos (ATPS) basados en disolventes eutécticos profundos (DES) naturales y biodegradables, con disoluciones acuosas de sales de fosfato. Para ello, se evaluó el potencial de extracción de proteínas de cinco ATPS basados en cloruro de colina (ChCl), betaína (Bet), ácido levulínico (LA), urea y agua, con dos sales de fosfato: Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₃PO₄ y Bet:2LA/K₃PO₄. Se estudió el efecto de dos factores en el proceso de extracción: el tipo de ATPS (5 niveles) y el tiempo de reposo (3 niveles), monitorizando las variables respuesta: rendimiento de recuperación de proteínas (% PRY) y de carbohidratos (% CRY). Los resultados se analizaron mediante un ANOVA de dos vías encontrando que el tipo de ATPS fue el factor más significativo. Los ATPS que proporcionaron mejores resultados fueron los de Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ (PRY = 40 %) y ChCl:2Urea/K₃PO₄ (PRY = 33 %). Así, los ATPS se presentan como una técnica con gran potencial para la extracción de proteínas de fangos secundarios, aunque el proceso necesita ser optimizado con el fin de mejorar la extracción selectiva de proteínas.

ABSTRACT

The management and valorization of sludge generated in wastewater treatment plants (WWTP) pose a significant environmental and economic challenge. This work addresses the development of a sustainable alternative for protein recovery from secondary sludge using aqueous two-phase systems (ATPS) based on natural and biodegradable deep eutectic solvents (DES) with aqueous solutions of phosphate salts. For this purpose, the protein extraction potential of five ATPS based on choline chloride (ChCl), betaine (Bet), levulinic acid (LA), urea, and water, with two phosphate salts: Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₃PO₄ y Bet:2LA/K₃PO₄, was evaluated. The effect of two factors on the extraction process was studied: the type of ATPS (5 levels) and the resting time (3 levels), monitoring the response variables: protein recovery yield (% PRY) and carbohydrate recovery yield (% CRY). The results were analyzed using a two-way ANOVA, finding that the type of ATPS was the most significant factor. The ATPS that provided the best results were Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ (PRY = 40%) and ChCl:2Urea/K₃PO₄ (PRY = 33%). Thus, ATPS are presented as a technique with great potential for the extraction of proteins from secondary sludge, although the process needs to be optimized to improve the selective extraction of proteins.

1 Introducción

1.1 Contexto y problemática

En los últimos años, el tratamiento de aguas residuales ha cobrado una gran relevancia debido al aumento de la población, los avances tecnológicos y científicos, y la creciente preocupación por el medio ambiente [1]. Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), desempeñan un papel fundamental en el tratamiento y la gestión de las aguas residuales generadas por comunidades urbanas e industriales. Estas instalaciones son cruciales para disminuir los contaminantes en los vertidos, hacerlos seguros para el medio ambiente y generar una corriente apta para su reutilización o reciclaje. Sin embargo, uno de los desafíos más importantes que enfrentan las EDAR es el tratamiento de los fangos generados durante el proceso de depuración, en el que atiende sobre todo a los siguientes objetivos [2]:

- 1) Disminuir el contenido de agua y con ello su volumen.
- 2) Descomponer la materia orgánica e inorgánica en compuestos orgánicos e inorgánicos más estables.

Los fangos, también conocidos como lodos, son los residuos sólidos resultantes del tratamiento de las aguas residuales en las EDAR. Estos fangos son una mezcla compleja de materia orgánica, microorganismos, metales pesados y compuestos químicos, que pueden representar un riesgo ambiental si no se gestionan adecuadamente [3]. En las EDAR se pueden encontrar distintos tipos de fango [4]:

- a) **Fangos primarios:** Son generados durante la etapa primaria del tratamiento (tamizado, eliminación de arena, flotación, precipitación y sedimentación), cuando se separan los sólidos pesados, grasas y aceites del agua residual cruda. Estos lodos contienen entre un 2 % y un 9 % de sólidos, mientras que el resto (alrededor de 90%) es agua.
- b) **Fangos secundarios:** También llamados fangos activados residuales o WAS (por sus siglas en inglés, waste activated sludge), se forman durante el tratamiento biológico, cuando los microorganismos descomponen la materia orgánica biodegradable del agua residual. La concentración total de sólidos varía entre 0.8 % y 3.3 %, dependiendo del tipo de proceso biológico empleado, el resto es agua. La parte orgánica del lodo activado residual contiene aproximadamente un 50-55 % de carbono, 25-30 % de oxígeno, 10-15 % de nitrógeno, 6-10 % de hidrógeno, 1-3 % de fósforo y 0.5-1.5 % de azufre.

- c) **Fangos terciarios:** Se producen en las etapas avanzadas del tratamiento de aguas residuales, cuando se requiere la eliminación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo. Por lo general, los procesos de eliminación de nutrientes se realizan al mismo tiempo que la eliminación de materia orgánica.

En la actualidad, los fangos generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales están poco aprovechados, siendo comúnmente reutilizados como fertilizantes o como fuente de energía para la producción de biometano [5]. Por ello, se están desarrollando nuevas tecnologías y enfoques para abordar estos desafíos, y así convertir los fangos en recursos útiles y sostenibles. Una de estas tecnologías emergentes es la extracción de compuestos de alto valor añadido, como proteínas, a partir de fangos generados en EDAR. Varios estudios han comprobado que el contenido de proteínas del fango producido por las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas generalmente alcanza aproximadamente entre el 30-50 %, lo que indica un potencial de reciclaje sustancial [6,7]. La recuperación de proteínas no solo reduce y estabiliza el fango, sino que estas proteínas se pueden emplear como bioestimulantes, biofertilizante, aditivos para la alimentación animal y como proteína industrial (agentes espumantes, espesantes, surfactantes). Este enfoque puede proporcionar una forma de aprovechar los fangos de manera más eficiente y sostenible, convirtiéndolos en productos con un valor añadido [8].

1.2 Valorización de la biomasa para la obtención de proteínas

Las proteínas son compuestos orgánicos de alto peso molecular formados por aminoácidos. Son de vital importancia a nivel nutricional ya que son necesarios para el mantenimiento de la masa muscular, las respuestas inmunológicas, la señalización y la reparación celular, no pudiendo ser sustituidos por lípidos o carbohidratos [9]. La obtención de proteínas a partir de diferentes fuentes biológicas ha sido un área de investigación activa durante décadas. Los métodos convencionales han evolucionado y se han diversificado para adaptarse a una amplia gama de aplicaciones en biología molecular, bioquímica, biotecnología y otras disciplinas. A continuación, se abordan tanto métodos convencionales de extracción como las nuevas metodologías verdes, las cuales son metodologías sostenibles, seguras y de bajo coste operativo para superar las desventajas de los métodos tradicionales [10].

I. Extracción alcalina

La técnica de extracción alcalina, seguida de precipitación isoeléctrica, es ampliamente utilizada para extraer proteínas debido a su simplicidad y bajo coste [11]. Esta técnica implica la disolución de las proteínas en un medio alcalino, seguido de su precipitación en un punto isoeléctrico específico. Se ha observado que el rendimiento de proteínas aumenta con niveles de pH más altos. Sin embargo, condiciones altamente alcalinas pueden causar la desnaturalización de las proteínas, por lo que se debe encontrar una solución de compromiso entre el aumento del rendimiento proteico y el grado de desnaturalización [12]. Por otro lado, el aumento de la temperatura y los tiempos de extracción más largos facilitan la extracción de proteínas, pero también pueden provocar precipitación y desnaturalización térmica. Se ha encontrado que la técnica de extracción afecta a la composición proteica y las propiedades estructurales de las proteínas extraídas [12]. Este método de extracción ofrece una eficiente recuperación de proteínas, produciendo proteínas funcionales y estables que no contienen lípidos. No obstante, se debe prestar atención al balance entre el rendimiento y la desnaturalización de las proteínas, así como a los efectos de la temperatura y el tiempo de extracción.

II. Extracción asistida por enzimas (EAE)

Este método ha ganado interés en los últimos años, especialmente en aplicaciones alimentarias y nutraceuticas. Enzimas, como la alcalasa y la lipasa, actúan como catalizadores y se han utilizado ampliamente en el sector lácteo, en panadería y en procesamientos de carne, entre otros. La EAE es un proceso ecológicamente sensible que reemplaza pasos agresivos con enzimas, permitiendo la liberación de proteínas de los compartimentos celulares mediante reacciones de hidrólisis. La eficacia de la EAE depende de factores operativos como la proporción de sustrato y enzima, la temperatura y el pH. La posibilidad de combinar enzimas puede mejorar los rendimientos y la calidad de los extractos proteicos, al igual que su uso en paralelo con tratamientos mecánicos como ultrasonidos y microondas. En resumen, la EAE es una técnica en constante evolución con numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y biotecnológica [9,13].

III. Extracción por micelización

Esta técnica se basa en la capacidad de las proteínas para formar aglomerados con estructura micelar. Esto tiene lugar disminuyendo la fuerza iónica de la disolución en la que están solubilizadas las proteínas [11]. El proceso de micelización consta de los siguientes pasos [14]:

- i. Solubilización de las proteínas en micelas acuosas.
- ii. Las micelas que contienen las proteínas se separan de la disolución mediante métodos como la centrifugación, filtración o precipitación.
- iii. Recuperación de las proteínas de las micelas mediante cambios de las condiciones de la disolución, como el pH o la temperatura.

Este método es especialmente útil para la extracción de proteínas hidrofóbicas y proteínas integrales de membrana, que son difíciles de purificar mediante otros métodos debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas. Además, esta técnica sustituye a la extracción convencional con disolventes como fenol o cloroformo [15].

IV. Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas (MAE) es un método moderno y ecológico utilizado para la extracción de proteínas de materiales sólidos.

Las microondas son típicamente radiación electromagnética no ionizante con frecuencias que van de 300 MHz a 300 GHz. Las microondas calientan la muestra mediante la interacción de la rotación dipolar y la conducción iónica, rompiendo los enlaces de hidrógeno presentes en las paredes celulares de la matriz vegetal. Esta reacción aumenta la porosidad de la pared celular y facilita la penetración del disolvente en la célula, permitiendo la liberación efectiva de los componentes intracelulares.

Esta técnica es un método eficiente y rápido que requiere menos disolventes que las técnicas tradicionales, lo que la hace más económica y ecológica. Además, permite obtener un mayor rendimiento y calidad en la extracción de proteínas. Sin embargo, el calor generado durante el proceso puede degradar los compuestos bioactivos sensibles, reduciendo su efectividad, lo que requiere una cuidadosa optimización del proceso para evitar estos efectos adversos [9,16].

V. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es una técnica versátil y económica ampliamente utilizada debido a su capacidad para mejorar la eficiencia de extracción mediante fenómenos de cavitación acústica, lo que provoca disrupción celular, mayor penetración del disolvente y reducción del tamaño de partículas. Estos efectos permiten un aumento del rendimiento de extracción, reduciendo el tiempo y el consumo de energía en comparación con otros métodos clásicos.

Sin embargo, la efectividad de UAE depende de varios factores, como la temperatura, el tipo de disolvente y el tiempo de extracción, lo que puede influir en la actividad biológica de los compuestos extraídos. Además, la elección del disolvente es crucial, ya que la presión de vapor puede afectar a la cavitación, y un mal ajuste de los parámetros puede llevar a la modificación o desnaturalización de las proteínas y otros compuestos, afectando a su calidad y funcionalidad [9,16].

1.3 Obtención de proteínas de fangos

Las técnicas comentadas en el apartado anterior se emplean para la extracción de proteínas vegetales, como semillas, amaranto, legumbres, cereales, entre otras. Si nos centramos en los fangos generados en EDAR, se han encontrado estudios que emplean métodos de pretratamiento físicos (ultrasonidos), térmicos, químicos y biológicos [17], con el objetivo de romper la pared celular de los WAS, para una posterior solubilización de la materia orgánica, en concreto, proteínas y carbohidratos [18]. Algunos de los métodos que se han aplicado para la extracción de proteínas en fangos son los siguientes:

I. Pretratamiento con ultrasonidos

El uso de ultrasonidos actúa como un pretratamiento de la biomasa para mejorar la eficiencia de la posterior extracción de proteínas. Mediante este método, se produce la disrupción de la pared celular, facilitando la solubilización de las proteínas. Estudios han demostrado que este aumento en la solubilización se puede atribuir a un incremento en la actividad enzimática de los fangos tras el pretratamiento con ultrasonidos, lo que permite una extracción más eficaz [19].

II. Pretratamiento térmico

Este método, aplicable tanto a fangos aeróbicos como anaeróbicos, consiste en exponer los fangos a altas temperaturas con el fin de solubilizar las proteínas. Existen varios métodos de pretratamiento térmico, como los pretratamientos suaves o a baja temperatura (menos de 90 °C) y los hipertérmicos (más de 100 °C), que desintegran los flóculos de lodo y liberan las proteínas. Sin embargo, es necesario encontrar un equilibrio, ya que, aunque el pretratamiento térmico mejora la solubilización de proteínas, temperaturas demasiado altas pueden desnaturalizarlas, degradarlas o provocar pérdida de actividad.

Además, este pretratamiento no solo mejora la solubilización de proteínas, sino que también favorece la destrucción de patógenos, la deshidratabilidad de los fangos y la eliminación de microcontaminantes [20].

III. Biológicos-Enzimáticos

Existen varios métodos de pretratamiento, como es la adición de enzimas comerciales o la metodología de autohidrólisis. Este último es posible en los fangos secundarios y consiste en someter a estos a una determinada temperatura, de tal manera que estos fangos liberan de su propio sistema metabólico, microorganismos que actúan como enzimas hidrolíticas, hidrolizando así el fango secundario [21,22].

IV. Extracción con disolventes

Esta metodología se presenta como una técnica atractiva ya que se trata de una técnica eficiente y fácilmente escalable. Los disolventes comúnmente empleados son hidrocarburos, acetona, alcoholes y cloroalcanos. Aunque estos disolventes son de bajo coste y tienen buenas capacidades de solubilidad, también presentan importantes inconvenientes como largos tiempos operacionales, alto consumo del disolvente y energía, altas probabilidades de que se dañen las proteínas separadas, además de ser perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente [23,24]. Debido a estos problemas, se han comenzado a usar disolventes alternativos, como los líquidos iónicos (ionic liquids, ILs) y los disolventes con eutécticos profundo (deep eutectic solvents, DES). Estos disolventes pertenecen a la categoría de disolventes biodegradables debido a su menor toxicidad y mayor compatibilidad con el medio ambiente siempre y cuando estén formados por productos naturales [23].

1.4 Disolventes con eutéctico profundo (DES)

En los últimos años, la investigación en química verde ha cobrado una relevancia significativa debido a la necesidad de desarrollar procesos y materiales más sostenibles y menos perjudiciales para el medio ambiente. Dentro de este contexto, los líquidos iónicos (ILs) y los disolventes eutécticos profundos (DES) emergen como una alternativa a los disolventes convencionales, debido a sus interesantes propiedades físico – químicas [23].

Los ILs son una clase de compuestos no moleculares compuestos únicamente de iones, con puntos de fusión por debajo de 100 °C, generalmente a temperatura ambiente [25]. Están formados por dos tipos de iones: aniones pequeños e inorgánicos y cationes grandes y orgánicos. La diferencia en el tamaño de estos iones reduce la tendencia del sistema a cristalizar, lo que les permite permanecer líquidos a bajas temperaturas [26]. Esta estructura asimétrica y menos cristalina también contribuye a las propiedades beneficiosas de los ILs, como alta estabilidad térmica y química, y baja presión de vapor. Son considerados como posibles alternativas ecológicas a los disolventes orgánicos convencionales principalmente debido a su baja presión de vapor, no inflamabilidad, elevada conductividad iónica y a su gran estabilidad química y térmica [25]. Sin embargo, investigaciones posteriores han cuestionado cada vez más su biotoxicidad y biodegradabilidad [27]. Además, la síntesis de ILs es costosa en comparación con los disolventes clásicos, haciendo de esta manera que el proceso sea menos “verde”, por la creación de mayor cantidad de residuos [23].

Debido a estos problemas asociados a los ILs, surgen por primera vez en 2003 los disolventes eutécticos profundos [28]. Se tratan de mezclas líquidas a temperatura ambiente, generadas al combinar dos sólidos (o un sólido y un líquido) en una proporción molar específica. La temperatura del punto eutéctico es significativamente más baja que la de una mezcla ideal, y mucho menor que la de los compuestos individuales [23]. En la Figura 1 se puede observar el comportamiento de los DES, donde se representa la temperatura frente la fracción molar de los componentes que forman el DES. ΔT_1 es la diferencia de temperatura entre la combinación lineal de los puntos de fusión de los componentes puros y el punto eutéctico real, mientras que ΔT_2 representa la diferencia de temperatura entre el punto eutéctico ideal y el punto eutéctico real [29].

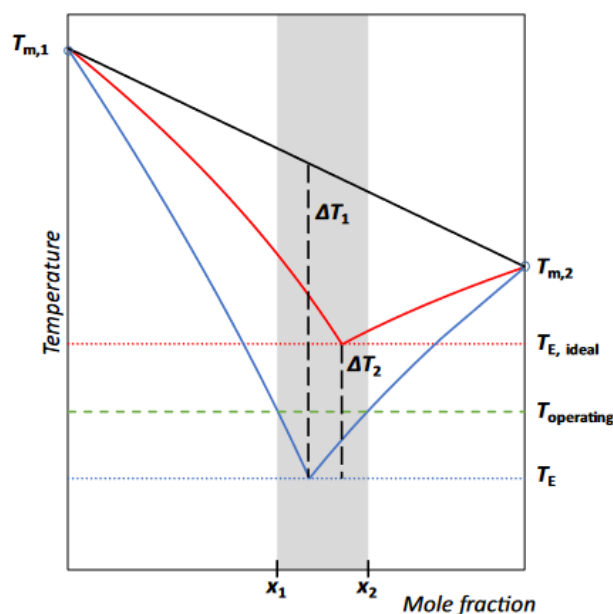


Figura 1. Representación esquemática de la comparación de los equilibrios sólido-líquido de una mezcla eutéctica ideal simple (línea roja) y una mezcla eutéctica profunda (línea azul) [29]

Los DES están formados por dos o más componentes, uno o más donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) o haluro metálico, y un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) [23]. En la Figura 2 se muestran los HBDs y HBAs más empleados para la formación de DES [30].

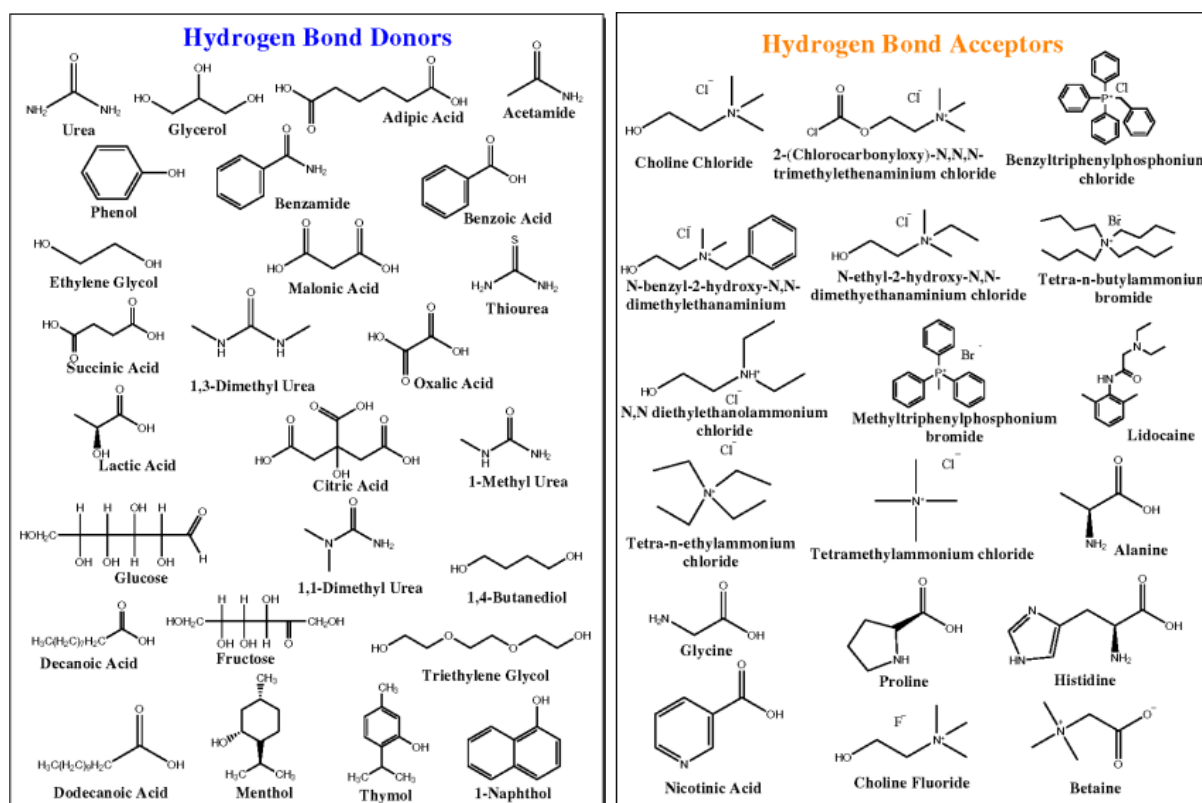
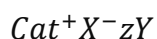


Figura 2. Estructuras de algunos HBAs y HBDs más empleados en la formación de los DES

Los DES pueden describirse mediante la siguiente fórmula:



donde Cat^+ es, cualquier catión de amonio, fosfonio o sulfonio, X^- es una base de Lewis, generalmente un anión haluro, Y es un ácido de Bronsted o Lewis y z representa el número de moléculas de ácido de Lewis que interaccionan [31]. Atendiendo a la naturaleza de los componentes, los DES se clasifican en cinco tipos, los cuales se recogen en la Tabla 1 [30–32]:

Tabla 1. Clasificación de los DES [30–32]

Tipo	Fórmula General	Términos
I – HBA y cloruro metálico	$Cat^+ X^- z MCl_n$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II – HBA y cloruro metálico hidratado	$Cat^+ X^- z MCl_n y H_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III – HBA y HBD	$Cat^+ X^- z RZ$	Z = $CONH_2$, $COOH$, OH
IV – HBD y Cloruro metálico hidratado	$MCl_n + RZ = MCl_{n+1}^+ \cdot RZ + MCl_{n+1}^-$	M = Al, Zn; Z = $CONH_2$, OH
V – Compuestos moleculares	DES no iónicos	Sustancias moleculares

Los DES presentan propiedades físicas y químicas similares a las de los líquidos iónicos. Sin embargo, sus componentes son más baratos, seguros y ecológicos. Además, estos disolventes no son inflamables, no son volátiles y son fáciles de preparar. Hay diferentes métodos de preparación de los DES, pero en el presente trabajo se han preparado mediante mezcla térmica. Es el método más sencillo y común, el cual consiste en mezclar los componentes en una proporción molar específica y luego calentar la mezcla con agitación [33]. Al no tratarse de una síntesis (no hay reacción química implicada en su formación) no requiere de una purificación posterior. Estas ventajas los hacen atractivos desde el punto de vista de la química verde y de las aplicaciones industriales a gran escala [31,34]. Un subgrupo particularmente interesante de los DES son los disolventes eutécticos naturales profundos (NADES) formados por compuestos

de origen natural, como cloruro de colina, azúcares, polioles, aminoácidos y ácidos orgánicos [29]. A pesar de que los NADES están en una etapa inicial de desarrollo, las publicaciones han aumentado exponencialmente. Esto se debe ya que han demostrado un gran potencial para diversas aplicaciones gracias a su baja toxicidad, sostenibilidad y respeto por el medio ambiente, superando a los ILs y DES en estos aspectos [33]. Pese a su alta viscosidad, lo cual se puede resolver aumentando la temperatura de operación o añadiendo agua, los NADES han demostrado ser un medio de extracción ideal para macromoléculas como el ADN, proteínas, carbohidratos y otras moléculas pequeñas [35]. Los disolventes eutécticos profundos utilizados en este trabajo son NADES pero a partir de ahora y por simplicidad, se utilizará únicamente el término DES.

A lo largo del presente trabajo, se han comentado diferentes técnicas convencionales de separación y purificación utilizadas en la industria, que, aunque eficaces, son costosas y menos sostenibles desde un punto de vista medioambiental. Por ello, se busca investigar alternativas más económicas y respetuosas con el medio ambiente. En este contexto, los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) basados en DES se presentan como una solución prometedora. En este trabajo, se emplearon diferentes ATPS para la extracción de proteínas de fangos secundarios, demostrando ser una técnica prometedora y más sostenible, con menores costes operativos y un menor impacto ambiental en comparación con los métodos tradicionales.

1.5 Sistemas bifásicos acuosos (ATPS)

Los sistemas bifásicos acuosos (ATPS, por sus siglas en inglés, aqueous two-phase systems) son mezclas líquidas compuestas por dos fases acuosas distintas que no se mezclan entre sí, debido al comportamiento repulsivo entre sus componentes [23]. Esto ocurre cuando se superan ciertas concentraciones de los componentes que forman el sistema separándose en dos fases líquidas distintas, cada una rica en uno de los componentes. Además, cabe destacar que cada fase contiene una gran cantidad de agua lo que hace que estos sistemas sean respetuosos con el medio ambiente [36]. Los sistemas más comunes se forman combinando dos polímeros (como el PEG y el dextrano) o un polímero y una sal (fosfato, sulfato o citrato). Los sistemas de polímero-polímero son preferibles para solutos sensibles a entornos iónicos, debido a su baja fuerza iónica, mientras que los sistemas de polímero-sal, aunque más económicos, presentan alta fuerza iónica, lo que puede ser desventajoso. También existen otros tipos de ATPS, como los basados en líquidos iónicos y micelas (micelares y micelares inversos), que son útiles para solutos sensibles a entornos iónicos y ofrecen alta selectividad [37].

Estos sistemas se pueden aplicar como técnica de separación sólido-líquido y han ganado interés debido a su alto potencial para la extracción, separación, purificación y enriquecimiento de proteínas, membranas, virus, enzimas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas [37]. Sin embargo, en el proceso influyen numerosas variables, como la concentración, el tipo y la masa molar de los componentes empleados, el pH y la temperatura del sistema [36].

Si se compara esta técnica con los métodos convencionales clásicos, a través del empleo de ATPS se extraen proteínas en alta concentración, ahorrando tiempo y costes, ya que el equilibrio se alcanza rápidamente [38]. Además, los ATPS permiten condiciones de operación suaves, reduciendo la posibilidad de desnaturalización o pérdida de actividad estructural de las biomoléculas [39]. Otro apunte sobre estos sistemas es que permiten condiciones de operación en modo continuo, por lo que son fáciles de escalar, además de presentar una mayor biocompatibilidad con el medio ambiente [37].

Según diversos estudios, la formación de fases de los sistemas DES-sal está directamente relacionada con la afinidad del DES con el agua, es decir, cuanto menor sea esta afinidad, menor será la cantidad de sal necesaria para obtener el ATPS. De esta manera, en estos sistemas existe una competencia entre el DES y la sal por el agua del sistema, donde la sal tiene una alta afinidad por el agua dando lugar a una fase rica en DES y otra fase rica en sal [36].

El comportamiento de los ATPS se caracteriza mediante la determinación de sus diagramas de fases los cuales están formados por la curva binodal y las rectas de reparto. La curva binodal delimita la región bifásica. Por debajo de la curva, los componentes son completamente miscibles, mientras que por encima de la curva los componentes se separan en dos fases. Esta curva es fundamental para identificar las concentraciones de los componentes que resultan en la formación de dos fases inmiscibles [37].

Una vez se obtiene la curva binodal, se determinan las rectas de reparto las cuales ilustran cómo se distribuyen los componentes en las dos fases bajo diversas condiciones específicas (presión, temperatura, pH, concentración de los componentes...) y son líneas de unión que conecta dos nodos que se encuentran en la curva binodal.

Como se muestra en la Figura 3, aunque se trata de un sistema ternario, para mejor visualización se usa comúnmente la representación en dos dimensiones. Si nos centramos en la línea DF, el punto E se refiere a la mezcla inicial de los componentes, y los puntos F y D son las composiciones en la fase superior e inferior. Los distintos puntos de mezcla a lo largo de la misma recta de reparto siempre contienen dos fases con las mismas composiciones, pero con

diferentes relaciones masa – volumen. Estas rectas van a mostrar cómo se distribuye la sustancia a determinar, en nuestro caso proteínas, entre la fase superior y la fase inferior del sistema en equilibrio [36].

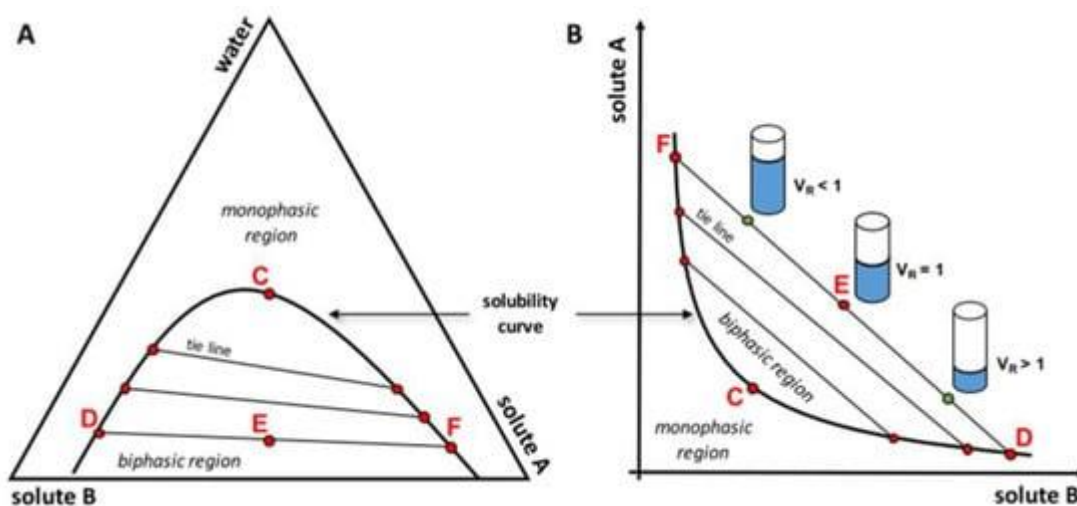


Figura 3. Diagrama de fases de un hipotético ATPS [36]

2 Objetivos y plan de trabajo

Este Trabajo de Fin de Máster forma parte de un proyecto de investigación, cuyo objetivo general es la extracción de compuestos de alto valor añadido, como proteínas y carbohidratos, a partir de biomasa crecida en aguas residuales urbanas y ganaderas utilizando técnicas de separación sostenibles.

El objetivo general de este trabajo es la extracción selectiva de proteínas a partir de fangos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (EDAR), minimizando la coextracción de carbohidratos, utilizando sistemas bifásicos acuosos (ATPS) basados en disolventes eutécticos profundos (DES) y sales de fosfato.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el diagrama de fases (curva binodal y rectas de reparto) de los ATPS: Betaína:2Urea:H₂O K₃PO₄ y Betaína:2Urea:H₂O/K₂HPO₄.
- Aplicar 5 ATPS diferentes (Betaína:2Urea:H₂O/K₃PO₄, Betaína:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, Cloruro de colina:2Urea/K₃PO₄, Cloruro de colina:2Urea/K₂HPO₄ y Betaína:2Ácido Levulínico/K₃PO₄) en la extracción de proteínas a partir de fangos liofilizados. Se analizó la influencia del tipo de ATPS empleado y el tiempo de reposo en la extracción.
- Analizar en qué condiciones experimentales se maximiza la extracción de proteínas minimizando la coextracción de carbohidratos.

3 Materiales y Métodos

3.1 Material general

- Jeringuillas de 5 mL y agujas.
- Viales de vidrio de 15 mL con tapón con septum.
- Agitadores magnéticos.
- Tubos de microcentrífuga EppendorfTM de 2 mL.
- Micropipetas de diferentes volúmenes.
- Cubetas de plástico de 1 mL.
- Cubetas de cuarzo.
- Tubos falcon.

3.2 Listados de equipos

- Placa agitadora y calefactora con sonda de temperatura (± 0.01 °C).
- Balanza analítica con precisión ± 0.0001 g.
- Centrífuga ALC PK 120.
- Espectrofotómetro UV/Vis Thermo Scientific GENESYS 20.
- Incubador con agitación orbital (Optic Ivymen System).
- Incubador con puestos para tubos Eppendorfs.
- Agitador Vortex.
- Kit de ensayo de proteínas Thermo ScientificTM PierceTM BCA.

3.3 Listado de reactivos

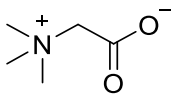
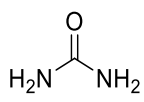
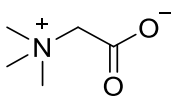
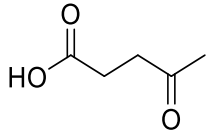
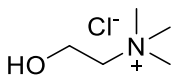
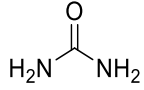
- Betaína (Bet): ≥ 98 %.
- Urea: ≥ 98 %.
- Ácido Levulínico (LA, levulinic acid en inglés): 98 %.
- Cloruro de Colina (ChCl): ≥ 98 %.
- K_3PO_4 y K_2HPO_4 , ambas de pureza del 98%.
- Fenol ≥ 99.5 %.
- Ácido sulfúrico. Pureza ≥ 96 %.
- Agua desionizada.
- Glucosa anhidra, Pureza ≥ 98 %

3.4 Preparación de los DES

En este trabajo se han preparado tres disolventes con eutéctico profundo (DES) diferentes. Para ello, se emplearon como compuestos de partida: cloruro de colina y betaína como aceptores de enlaces de hidrógeno; ácido levulínico y urea como dadores de enlaces de hidrógeno y agua en el caso del DES Bet:2Urea:H₂O.

En la Tabla 2, se muestran las estructuras de los compuestos de partida de los DES empleados en este trabajo:

Tabla 2. Estructuras de los compuestos de partida de los DES empleados

DES	HBA	HBD	H ₂ O	Relación molar
Bet:2Urea:H₂O				1:2:1
Bet:2LA				1:2
ChCl:2Urea				1:2

Para la preparación de los DES, se pesaron las cantidades adecuadas de cada uno de los compuestos formadores del DES en un Erlenmeyer. Tras esto, se tapa la boca del matraz con papel de aluminio y se introduce en un incubador con agitación orbital a 60 °C durante 2 horas, con una agitación de 500 rpm, hasta la obtención de un líquido transparente. De esta manera se consigue una mezcla líquida homogénea que posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente.

3.5 Determinación de los diagramas de fases de los ATPS

En este trabajo se ha estudiado la aplicación de 5 ATPS para la extracción de proteínas a partir de fangos de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los ATPS utilizados fueron: Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ChCl:2Urea/K₃PO₄ y Bet:2LA/K₃PO₄.

Para la aplicación de estos ATPS en el proceso de extracción es necesario primero la determinación de su correspondiente diagrama de fases con el objetivo de conocer la región bifásica de este sistema (curva binodal) y la composición inicial de la mezcla y la composición de las fases individuales en el equilibrio (rectas de reparto).

En este trabajo se caracterizaron los sistemas Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ y Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, el resto de ATPS utilizados fueron previamente caracterizados en el grupo de investigación [40]

Por tanto, primero se obtuvieron experimentalmente las curvas binodales y las rectas de reparto de cada uno de los dos ATPS indicados. Todas las disoluciones acuosas necesarias fueron preparadas por pesada. Se prepararon disoluciones acuosas de sal (fosfato potásico e hidrogenofosfato potásico) de composición conocida. 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 del DES para facilitar su manejo durante el procedimiento experimental.

3.5.1 Curvas Binodales

Las curvas binodales se determinaron experimentalmente a 25 °C y presión atmosférica mediante el método del punto de niebla. Se trata de un procedimiento visual de aparición y desaparición de turbidez, ampliamente utilizado en este tipo de estudios [41].

En un vial se añadió una cantidad conocida de disolución de sal, se pesó y se llevó a un baño termostatado, para asegurar la determinación de la curva binodal a la temperatura seleccionada (25°C). Tras esto, se añadió gota a gota DES o disolución de DES, mientras se agitaba el vial en un 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 la disolución de DES hasta que se observó una turbidez permanente. Esta turbidez indica que se ha alcanzado el límite entre la región miscible y la inmiscible 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) 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. Estos datos experimentales, se combinaron para construir la curva binodal completa.

De esta manera se obtuvieron los puntos necesarios para la construcción de la curva binodal completa para cada sistema, la cual se representa como la fracción másica de uno de los componentes (sal) frente a la fracción másica de otro de los componentes (DES). Esta fracción másica se calculó como:

$$w_i = \frac{m_i}{m_{total}} \quad (1)$$

siendo w_i la fracción másica de la disolución de sal o DES, m_i la masa de disolución de sal o DES en el punto de la curva binodal y m_{total} la suma de las masas de los tres componentes en un punto concreto de la curva.

Una vez se obtiene la curva binodal, los puntos experimentales se ajustan mediante la ecuación de Merchuk, modelo matemático con tres parámetros ajustables [36]:

$$Y = A \cdot e^{[(BX^{0.5}) - (CX^3)]} \quad (2)$$

donde Y y X son los porcentajes en fracción másica de los componentes que forman el ATPS, es decir, el DES y la sal empleada. Los parámetros de ajuste A, B y C se obtienen mediante regresión no lineal de los datos.

Tras la obtención de las curvas binodales para ambos sistemas, se determinaron las correspondientes rectas de reparto.

3.5.2 Rectas de reparto

El procedimiento para la obtención de las rectas de reparto fue el siguiente: En un vial se prepararon mezclas de composición conocida del DES empleado, en nuestro caso Bet:2Urea:H₂O, la sal utilizada (K₃PO₄ o K₂HPO₄) y agua. Esta mezcla se introdujo en un baño termostatado con agitación durante 15 minutos a 25 °C. Transcurrido ese tiempo, se para la agitación y se deja reposar la mezcla en el baño hasta la completa separación de fases. Una vez alcanzado el equilibrio, cada una de las fases se separó cuidadosamente con la ayuda de una jeringuilla y se pesaron por separado. Todas las TL (tie lines, en inglés) determinadas experimentalmente se realizaron por duplicado.

Para cada uno de los sistemas ATPS se determinaron tres rectas de reparto. Cada TL se obtiene aplicando la regla de la palanca a la relación entre las composiciones másicas de las fases superior e inferior y el sistema global, de manera que se llega al siguiente sistema de ecuaciones con cuatro incógnitas [36]:

$$Y_T = \left(\frac{Y_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha}\right) Y_F \quad (3)$$

$$X_T = \left(\frac{X_M}{\alpha}\right) - \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha}\right) X_F \quad (4)$$

$$Y_T = f(X_T) = A \cdot e^{[(BX_T^{0.5}) - (CX_T^3)]} \quad (5)$$

$$Y_F = f(X_F) = A \cdot e^{[(BX_F^{0.5}) - (CX_F^3)]} \quad (6)$$

donde M, T y F representan la mezcla inicial, la fase superior y la fase inferior, mientras que Y y X representan la composición másica del DES empleado y la composición másica de la sal utilizada en cada una de las mezclas descritas anteriormente. A, B y C son los parámetros de ajuste obtenidos a partir de la ec. (2) y, por último, α es la relación entre la masa de la fase superior y la masa total de la mezcla inicial. Como todo es conocido excepto las incógnitas, el sistema es resoluble. Al ser no lineal, el sistema debe resolverse mediante métodos numéricos (en este caso, se usó la función solver de Excel).

Dos parámetros importantes que se derivan de las rectas de reparto son la longitud de la recta de reparto (TLL, tie line length) y la pendiente de la recta de reparto (STL, slope of tie line) [37]:

$$TLL = \sqrt{(w_{TPC}^{top} - w_{TPC}^{bot})^2 + (w_{salt}^{top} - w_{salt}^{bot})^2} \quad (7)$$

$$STL = \frac{w_{TPC}^{top} - w_{TPC}^{bot}}{w_{salt}^{top} - w_{salt}^{bot}} \quad (8)$$

donde w_{TPC} y w_{salt} son las composiciones del DES y la sal empleados en el sistema ATPS. Top y bot se refieren a la fase superior e inferior del sistema bifásico, respectivamente.

EL valor de la TLL da una idea sobre la selectividad del sistema de extracción. Cuando la TLL es pequeña, el coeficiente de partición (K) de una biomolécula está cerca de 1, lo que significa que la biomolécula se distribuye de manera similar entre las dos fases, resultando en una extracción menos selectiva. Cuando la TLL es grande, las biomoléculas tienden a distribuirse

preferentemente hacia una de las fases, esto hace que los valores de K se alejen de 1, indicando una extracción más selectiva [42].

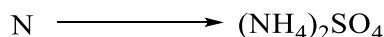
3.6 Caracterización de la biomasa

En el presente trabajo de fin de máster se ha utilizado un fango generado en EDAR liofilizado como biomasa. Para su caracterización se determinó el contenido de proteínas y carbohidratos mediante los métodos que se describen a continuación.

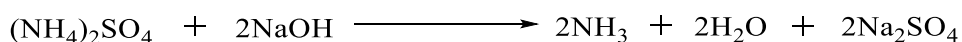
3.6.1 Análisis de proteínas

Para el análisis de proteínas se empleó el método Kjeldahl [43]. Es un método volumétrico que permite determinar diferentes tipos de nitrógeno presentes en la muestra, y que a través de un factor específico para cada biomasa se relaciona con el contenido de proteínas. En este trabajo, se cuantificó el nitrógeno Kjeldahl, que es la suma del nitrógeno amoniacal y el nitrógeno orgánico. El procedimiento consta de las siguientes etapas:

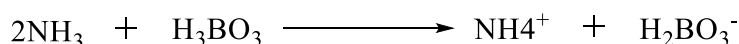
1. La biomasa (aproximadamente 0.1 g) se digiere con 6 mL de H_2SO_4 (96 % en masa) y un catalizador de CuSO_4 . Se aplica un programa de calentamiento durante 3 horas, hasta lograr la digestión completa de las muestras. Este proceso transforma el nitrógeno presente en la biomasa en amonio.



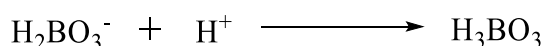
2. El NH_4^+ se trata en caliente con un exceso de NaOH , destilando como NH_3 el cual se recoge en un Erlenmeyer que contiene un exceso de H_3BO_3 y un indicador ácido-base adecuado (una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno).



El NH_3 destilado reacciona con el H_3BO_3 , produciendo una cantidad equivalente de H_2BO_3^-



3. Valoración del H_2BO_3^- , formado en la reacción de neutralización, con H_2SO_4 0.1N hasta el cambio de color del indicador (de verde a morado).



Para determinar la concentración de nitrógeno en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{2 \cdot C_{H_2SO_4} \cdot V_{H_2SO_4} \cdot Mm(N)}{m_{muestra} \cdot 10} \quad (9)$$

donde C y V son la concentración (mol/L) y el volumen (L) de H₂SO₄, Mm es la masa molar del Nitrógeno (g/mol), m es la masa inicial de muestra pesada (g). Una vez determinado el contenido de nitrógeno se convierte en contenido de proteína mediante un factor de conversión, f, que depende del tipo de proteínas de la muestra; En nuestro caso el valor de f es 4.

$$\%Proteínas = f \cdot \%N \quad (10)$$

3.6.2 Análisis de carbohidratos

El contenido de carbohidratos de la biomasa inicial se determinó como monosacáridos totales utilizando un procedimiento del NREL (Laboratorio de Energías Renovables) que consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presente en la biomasa y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC [44]. El procedimiento sigue las etapas siguientes:

1. Se someten 300 mg de biomasa húmeda a una hidrólisis ácida concentrada durante 1 hora añadiendo 3 mL de H₂SO₄ al 72% en peso a 35°C.
2. Se añaden 84 mL de agua destilada para diluir la concentración del ácido al 4% en peso y las muestras se someten a 121°C durante 1h en una autoclave.
3. Se separan las fracciones sólidas y líquida y, finalmente, la fracción líquida resultante se filtra con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm para determinar el contenido de monosacáridos mediante HPLC-IR.

3.7 Procedimiento de extracción con los ATPS

Tras la caracterización de los diagramas de fases de los ATPS, se elige la recta de reparto que se va a emplear para el proceso de extracción para cada uno de los sistemas ATPS. En viales de 15 mL se prepararon mezclas ternarias de composición conocida de DES, sal y agua a las que se añadió 0,04 g de fango liofilizado. Esta mezcla se agitó durante 30 minutos a 400 rpm y 25 °C. Seguidamente, se dejaron reposar los viales en el interior del baño termostatado el tiempo correspondiente. El tiempo de reposo es uno de los factores que vamos a optimizar mediante

un diseño factorial que comentaré más adelante. Trascurrido el tiempo de reposo, con la ayuda de una jeringuilla y una aguja, se separan las fases y se almacenan en tubos Falcon.

Para la separación completa de las mezclas se emplea la técnica de centrifugación (unas dos o tres veces) para minimizar las pérdidas de masa. Al finalizar cada ciclo de centrifugación el sobrenadante se añade a matraces aforados de 25 mL, los cuales se enrasan con agua desionizada. Finalmente, el contenido de los matraces se filtra con filtros de Nylon de 0.45 μm a tubos Falcon limpios y secos, y se guardan a $T < 4^\circ\text{C}$ por un máximo de 2 semanas, hasta la cuantificación de proteínas y carbohidratos.

Se estudiaron dos variables respuesta para evaluar el rendimiento de las extracciones, relacionadas con la recuperación de proteínas y carbohidratos:

$$PRY (\%) = \frac{m_{\text{prot extraída}} (g)}{m_{\text{prot biomasa}} (g)} \cdot 100 \quad (11)$$

$$CRY (\%) = \frac{m_{\text{CHs extraída}} (g)}{m_{\text{CHs biomasa}} (g)} \cdot 100 \quad (12)$$

donde el PRY (protein recovery yield en inglés) es el rendimiento de extracción de proteínas, y CRY el rendimiento de extracción de carbohidratos (carbohydrate recovery yield en inglés). En este estudio nos interesa lograr una separación selectiva de las proteínas, algo que se consigue maximizando PRY y minimizando CRY.

3.8 Análisis de los extractos

Se usaron dos métodos colorimétricos para determinar la cantidad de proteínas y de carbohidratos obtenidos en los extractos líquidos.

3.8.1 Método de determinación de proteínas: método del ácido bicinconínico

Este método se basa en la reducción de iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuprosos (Cu^+) por los enlaces peptídicos de las proteínas bajo condiciones alcalinas (reacción de Biuret), seguido de la formación de un complejo púrpura entre el Cu^+ y el ácido bicinconínico (BCA), que presenta un máximo de absorbancia a 562 nm [45]. La intensidad del color determina la cantidad de proteína, es decir, si la mezcla de la muestra tiene un color claro denota una cantidad pequeña de proteínas, mientras que un color intenso indica la presencia de una alta concentración de proteína en la muestra [46]. En la Figura 4 se muestra la reacción que tiene lugar:

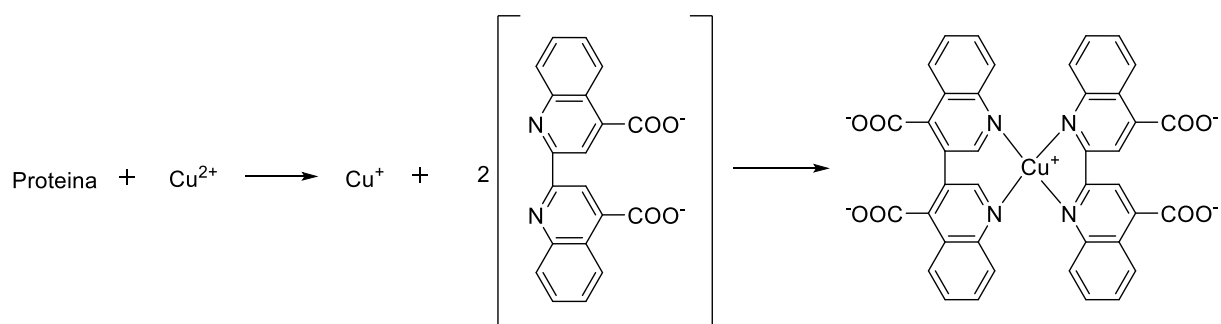


Figura 4. Reacción de formación del complejo coloreado de Cu(I) con dos moléculas de BCA

Este procedimiento ha sido puesto a punto en muestras líquidas para la cuantificación de proteínas y consta de los siguientes pasos:

1. Se prepara el reactivo “working reagent” mezclando en proporción 50:1 (en volumen) el reactivo A (mezcla de compuestos que garantiza un medio con un pH y fuerza iónica controlados) con el reactivo B (una disolución de sulfato de cobre), dando como resultado una disolución de color verde.
2. En tubos EppendorfTM se añade 60 μ L de la muestra a analizar y 1.2 mL del “working reagent”. La mezcla resultante se agita en el agitador Vortex. Cada muestra a analizar se realizó por duplicado.
3. Los tubos Eppendorf se llevan a un incubador donde se calientan a 37 °C durante 30 minutos.
4. Transcurrido ese tiempo, se mide la absorbancia de cada una de las muestras a $\lambda = 562$ nm en cubetas de plástico. La cuantificación de proteínas de cada una de las muestras se realiza mediante la interpolación en una línea de calibrado previamente realizada con patrones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida.

3.8.2 Método de determinación de carbohidratos: método del Fenol-Sulfúrico

Se trata de un método colorimétrico simple y rápido para la determinación de carbohidratos en una muestra líquida. Debido a que la absorbancia varía según el tipo de carbohidratos que estén presentes en la muestra, los resultados se expresan en función de un único carbohidrato, la glucosa, por lo que la línea de calibrado que se realiza previamente es con patrones de D-glucosa. En este método el ácido sulfúrico tiene como función la de descomponer y deshidratar los carbohidratos complejos en azúcares simples (monosacáridos) y después, a derivados de furfural. Estos últimos reaccionan con el fenol para formar un compuesto coloreado

(anaranjado) cuya absorbancia se mide a $\lambda = 490$ nm por espectrofotometría UV-Visible [47] (Figura 5).

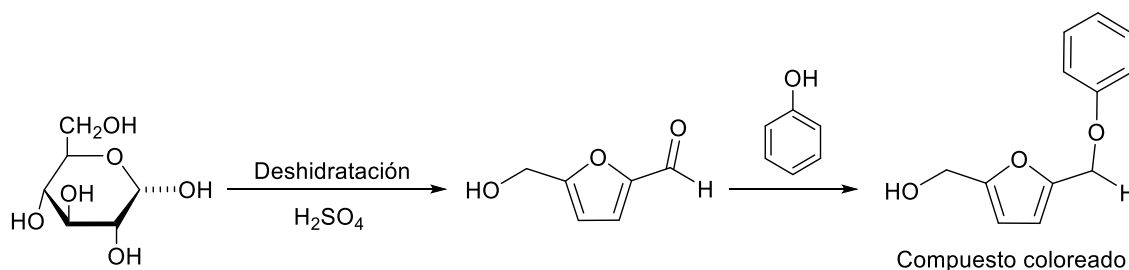


Figura 5. Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos

El procedimiento experimental consta de los siguientes pasos:

1. En tubos Falcon, se añade el volumen adecuado de muestra (dependiendo de la concentración de carbohidratos de los extractos) y agua desionizada hasta completar un volumen total de 2 mL.
2. Seguidamente, se añaden 50 μL de disolución de fenol al 80% (m/m) y se agita ligeramente.
3. A continuación, se añaden 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y de nuevo se vuelve a agitar ligeramente. Se puede observar que la disolución adquiere una tonalidad anaranjada.
4. La gradilla con los Falcon se coloca en un baño de agua a temperatura ambiente para que se atemperen las muestras durante 20 minutos.
5. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia de cada una de las muestras a $\lambda = 490$ nm en cubetas de cuarzo. La cuantificación de carbohidratos de cada una de las muestras se realiza mediante la interpolación en la línea de calibrado previamente realizada con patrones de D-glucosa de concentración conocida.

3.8.3 Presencia de interferentes: ácidos húmicos

Los fangos resultantes del tratamiento de aguas residuales son una matriz compleja, en la que es común encontrar una gran cantidad de compuestos orgánicos complejos, entre los que destacan los compuestos húmicos. Estos son una clase de compuestos nitrogenados aromáticos que pueden interferir en diversos métodos de análisis, debido a que dan coloración grisácea-marrón a la disolución. Por ejemplo, en la determinación de nitrógeno de las muestras, los

ácidos húmicos pueden interferir con los métodos espectrofotométricos al absorber luz en longitudes de onda similares al analito a analizar.

Por estos motivos, se comprobó si estos compuestos interferían con los métodos de análisis usados. Para ello, se prepararon disoluciones patrón de BSA y glucosa a tres niveles de concentración (dentro del rango de concentración obtenido experimentalmente), asumiendo que la cantidad de húmicos presentes en esas disoluciones fuera la misma que en el fango inicial (extracción de los húmicos del 100 %). Los resultados indicaron que, a los niveles de concentración ensayados, no se detectó un efecto matriz apreciable.

3.9 Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar la influencia del tipo de ATPS utilizado y el tiempo de reposo en la extracción de proteínas a partir de fangos generados en EDAR, se propuso hacer un diseño factorial completo de dos factores 5x3: el factor ATPS a cinco niveles y el factor tiempo de reposo a 3 niveles. El diseño está totalmente aleatorizado y consta de un total de 30 experimentos ya que cada réplica se realiza por duplicado. A través de este diseño se va a evaluar el porcentaje de proteínas extraídas y el contenido de carbohidratos separados.

Los diferentes factores y los respectivos niveles de cada factor se muestran de manera esquemática en la Tabla 3. Cada experimento se asigna con un código de identificación con el ATPS empleado y el tiempo de reposo requerido.

Tabla 3. Factores empleados en el diseño factorial completo 5x3: Tipo de ATPS y tiempo de reposo

Niveles	Factor	
	Tipo de ATPS	Tiempo de reposo / min
1	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	30
2	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	60
3	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	120
4	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	---
5	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	---

Para determinar si los factores resultan significativos, se realizó un ANOVA (Análisis de varianza) de dos vías para cada una de las variables respuesta estudiadas (PRY y CRY). Se plantea la hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) para ambos factores con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$). Si se acepta:

- La hipótesis nula (H_0), el factor no tiene efecto y, por tanto, no hay diferencias significativas entre las medias de los niveles estudiados.
- La hipótesis alternativa (H_1), el factor sí tiene efecto y, por tanto, sí hay diferencias significativas entre las medias de los niveles estudiados.

Sin embargo, el ANOVA únicamente indica si un factor es significativo o no. Cuando los factores tienen varios niveles, es posible que algunos de ellos presenten diferencias entre sí mientras que otros no. Para identificar estas diferencias específicas, se lleva a cabo una prueba post-hoc (prueba de Tukey).

Los resultados de esta prueba se van a representar gráficamente mediante la metodología CLD (Compact Letter Display), la cual asigna letras a las medias de los tratamientos para indicar cuáles son significativamente diferentes entre sí tras la realización de las pruebas estadísticas. Los tratamientos que comparten al menos una letra no son significativamente diferentes entre sí [48,49].

El análisis estadístico se realizó con la última versión del programa Statgraphics Centurion (versión 19-X64) y con R (versión 4.3.1).

4 Resultados y Discusión

4.1 Caracterización de la biomasa

Para la caracterización del fango liofilizado, se determinó su contenido en proteínas y carbohidratos mediante los métodos descritos en apartados anteriores. En la Tabla 4 se muestran, en %, el promedio de los resultados obtenidos:

Tabla 4. Composición del fango empleado en este trabajo

Fango secundario liofilizado	
Proteínas / %	34.50
Carbohidratos / %	9.19

4.2 Diagramas de fases de los ATPS

Para la obtención de los diagramas de fases de los 2 ATPS estudiados en este TFM se determinaron experimentalmente las curvas binodales y las rectas de reparto a 25°C y presión atmosférica. Como se ha comentado anteriormente, en el presente trabajo se han caracterizado los sistemas formados por el DES Bet:2Urea:H₂O y las sales de fosfato: K₃PO₄ y K₂HPO₄.

En las siguientes figuras (Figura 6 y Figura 7) se muestran los diagramas de fases de los sistemas Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ y Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄ con sus respectivas curvas binodales experimentales, ajustadas mediante la ecuación de Merchuk (ec. 2), y las rectas de reparto determinadas experimentalmente para cada sistema. Las composiciones experimentales de las curvas binodales se encuentran en la tabla Tabla 10 de los Anexos.

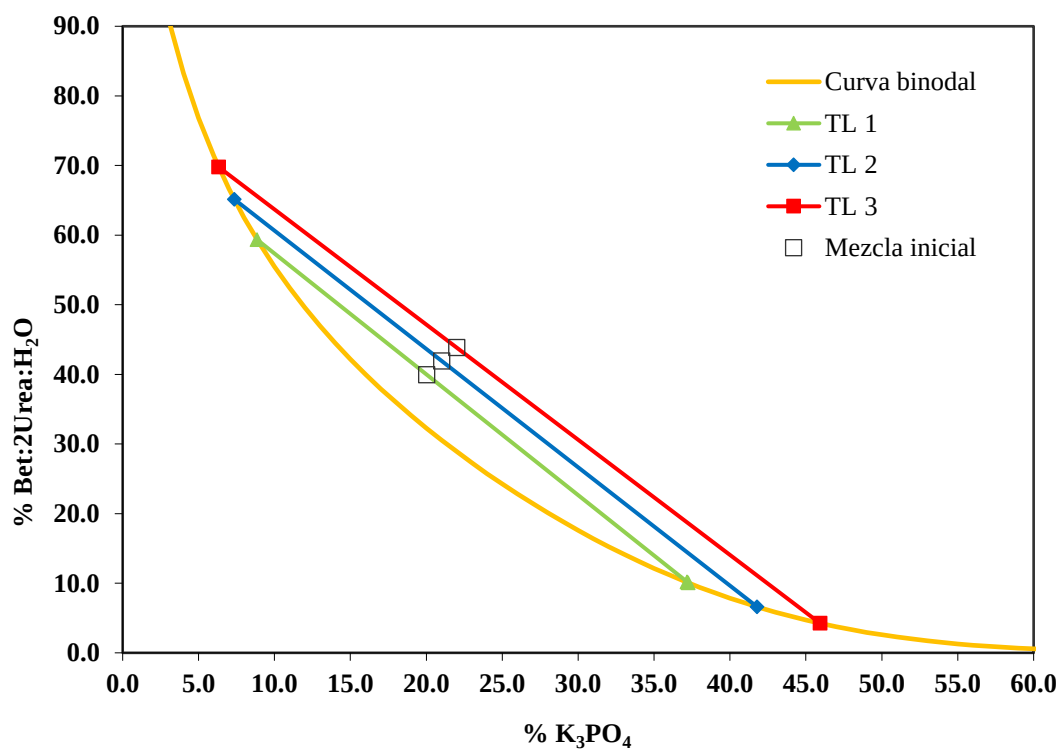


Figura 6. Curva binodal y rectas de reparto para el sistema Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄. Los símbolos representan la mezcla inicial y las composiciones de la fase superior e inferior de las rectas de reparto y la línea (—) corresponde al ajuste de las curvas binodales experimentales según la ecuación de Merchuk (ec. 2)

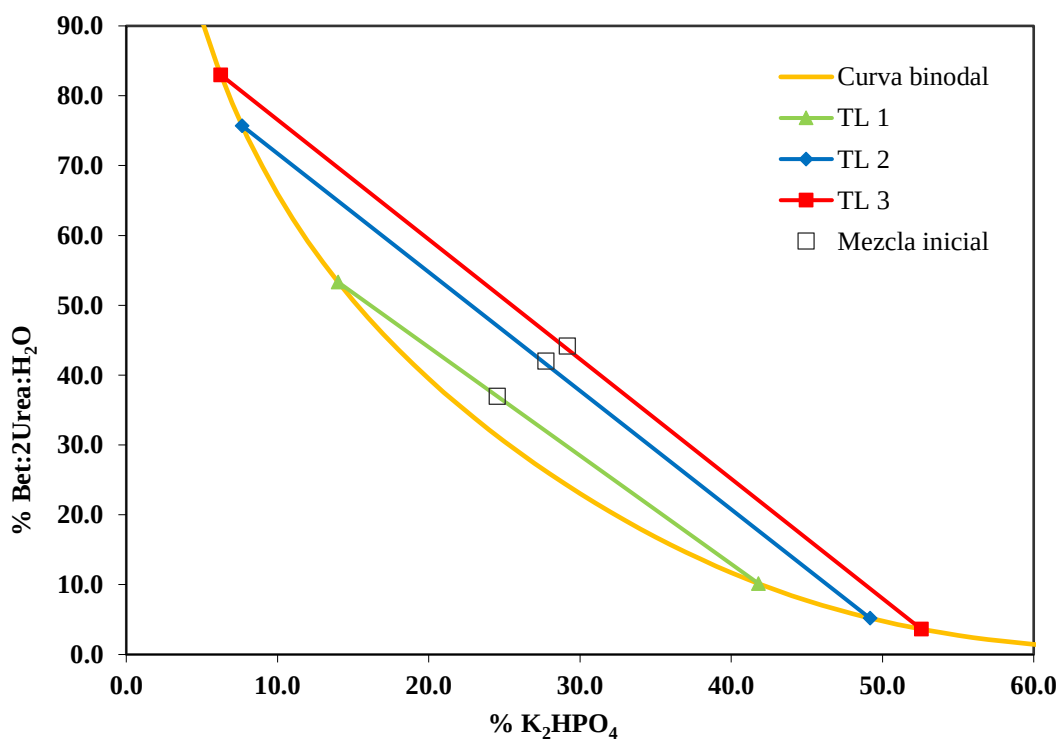


Figura 7. Curva binodal y rectas de reparto para el sistema Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄. Los símbolos representan la mezcla inicial y las composiciones de la fase superior e inferior de las rectas de reparto y la línea (—) corresponde al ajuste de las curvas binodales experimentales según la ecuación de Merchuk (ec. 2)

Los valores de los parámetros de ajuste de la curva binodal para cada ATPS siguiendo la ecuación de Merchuk (ec. 2) junto con el coeficiente de correlación se muestran en la Tabla 5. Se puede observar altos coeficientes de correlación en ambos sistemas.

Tabla 5. Parámetros de ajuste de la ecuación de Merchuk y R^2

ATPS	A	B	C	R^2
Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄	163.89	-0.338	1.405E-05	0.9996
Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄	192.14	-0.335	1.061E-05	0.9994

En la Figura 8, se comparan las curvas binodales para ambos sistemas estudiados. Se observa que la curva amarilla, correspondiente al sistema Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, se encuentra más próxima al origen de ordenadas, lo que indica que la región bifásica se forma a una menor concentración de sal en comparación con el sistema Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄. Esta diferencia sugiere que el sistema Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ posee una región bifásica más amplia, probablemente debido a un mayor efecto "salting-out", lo que se traduce en un coeficiente k_s (coeficiente de salting-out) más elevado. Una k_s más alto refleja una mayor eficacia de la sal para inducir la separación de fases a menores concentraciones de sal [50].

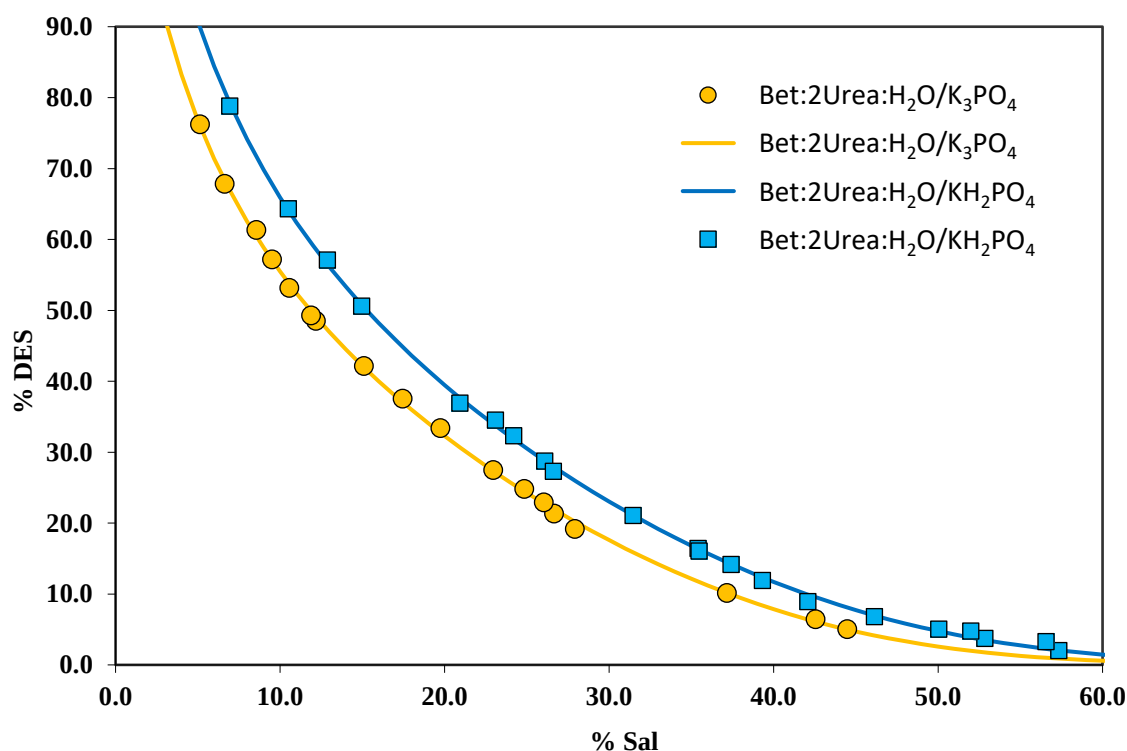


Figura 8. Curvas binodales para los sistemas Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄ y Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, los símbolos indican los puntos obtenidos experimentalmente y las líneas (—) el ajuste obtenido mediante la ecuación de Merchuk (ec. 2)

Respecto a las rectas de reparto, se determinaron experimentalmente, y tras ello se calcularon matemáticamente las composiciones de las fases mediante las ecuaciones ya comentadas anteriormente (ec. 3, 4, 5 y 6). En la Tabla 6 se muestran las composiciones iniciales de las mezclas, así como las composiciones en el equilibrio, fase superior y fase inferior, útiles para la determinación de los parámetros STL y TLL (ec. 7 y 8). Estos parámetros indican el grado de separación, es decir, la diferencia entre las composiciones del DES y la sal en las dos fases.

Tabla 6. 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 sistemas Bet:2Urea:H₂O / K₃PO₄ y Bet:2Urea:H₂O / K₂HPO₄, estudiados a 25 °C y presión atmosférica.

Rectas de reparto	Mezcla inicial		Fase superior		Fase inferior		STL	TLL
	DES / %	Sal / %	DES / %	Sal / %	DES / %	Sal / %		
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄								
TL 1	39.96	20.03	59.36	8.85	10.06	37.25	-1.74	56.89
TL 2	41.90	21.02	65.14	7.35	6.60	41.79	-1.70	67.92
TL 3	43.84	22.00	69.78	6.32	4.24	45.93	-1.65	76.58
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄								
TL 1	36.98	24.52	53.33	13.99	10.15	41.80	-1.55	51.35
TL 2	42.01	27.74	75.71	7.66	5.20	49.17	-1.70	81.82
TL 3	44.19	29.16	82.99	6.25	3.63	52.57	-1.71	91.89

Se encontró que la fase rica en DES era la fase superior y la fase rica en sal la fase inferior para ambos sistemas, además de observar que a medida que aumenta la TLL, la concentración de DES en la fase superior es más alta y la concentración de sal en la fase inferior también es mayor.

Ambos gráficos (Figura 6 y Figura 7) muestran rectas de reparto casi paralelas. Además, a través de la Tabla 6 se puede observar que los valores de las pendientes son prácticamente iguales para ambos sistemas.

4.3 Resultados del proceso de extracción

En este trabajo se ha estudiado la extracción de proteínas a partir de fangos liofilizados utilizando cinco sistemas bifásicos acuosos (ATPS) diferentes: Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄, y tres sistemas adicionales, ChCl:2Urea/K₃PO₄, ChCl:2Urea/K₂HPO₄ y Bet:2LA/K₃PO₄, cuyos datos fueron tomados de estudios previos realizados por el grupo de investigación [40]. Para todos los sistemas se seleccionaron las rectas de reparto con mayor valor de TLL, ya que un mayor valor de TLL indica una mayor separación entre las fases del sistema, lo que resulta en una extracción más eficiente de las proteínas, debido a la mejor diferenciación entre las fases acuosas.

Las rectas de reparto seleccionadas fueron preparadas experimentalmente, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7 Procedimiento de extracción con los ATPS, y luego se añadió la cantidad adecuada de biomasa para proceder con la extracción de proteínas. Las composiciones de las mezclas iniciales, así como sus correspondientes composiciones en el equilibrio (fase superior y fase inferior), se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Composiciones de mezcla inicial y de las fases en el equilibrio (en porcentaje en masa), junto con las correspondientes longitudes (TLL) y pendientes (STL) de las rectas de reparto para los 5 ATPS estudiados

Rectas de reparto	Mezcla inicial		Fase superior		Fase inferior		STL	TLL
	DES / %	Sal / %	DES / %	Sal / %	DES / %	Sal / %		
Bet:2Urea:H2O/K3PO4								
A	43.84	22.00	69.78	6.32	4.24	45.93	-1.65	76.58
Bet:2Urea:H2O/K2HPO4								
B	44.19	29.16	82.99	6.25	3.63	52.57	-1.71	91.89
ChCl:2Urea/K3PO4								
C	24.95	34.86	70.24	5.12	2.31	49.75	-1.52	81.28
ChCl:2Urea/K2HPO4								
D	34.80	26.20	86.96	3.53	2.61	59.73	-1.50	101.36
Bet:2LA/K3PO4								
E	34.80	29.37	75.28	3.49	0.74	51.16	-1.56	88.48

4.3.1 Matriz de diseño

Se realizó un diseño factorial completo 5x3 totalmente aleatorizado, y por duplicado, lo que resultó en un total de 30 experimentos. En la matriz del diseño 5x3, mostrada en la Tabla 8, se representa lo siguiente: el código del experimento (F1-F30), los factores con sus niveles (tipo de sistema ATPS empleado y el tiempo de reposo), y las variables respuesta analizadas (PRY, rendimiento de extracción de proteínas en %, y CRY, rendimiento de extracción de carbohidratos en %), así como la desviación estándar relativa (%RSD, relative standard deviation en inglés). Los datos presentados corresponden a los extractos de las fases superiores en el proceso de extracción, ya que, según experimentos y pruebas previas, se observó que las proteínas y carbohidratos se concentran en la fase superior, rica en DES, mientras que, en la fase inferior, rica en sal, casi no se detectan estas biomoléculas.

Cabe destacar que en los experimentos en los que se empleó Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄, solo se obtuvieron resultados reproducibles cuando el tiempo de reposo fue de 120 minutos ya que con 60 y 30 minutos no se observó separación de fases. Esto indica que este sistema a 25 °C presenta una cinética lenta para la separación de fases.

Tabla 8. Matriz de diseño factorial de dos factores, tipo de ATPS a 5 niveles y tiempo de reposo a tres niveles.

Código	ATPS	Tiempo / min	PRY / %	CRY / %	RSD PRY / %	RSD CRY / %
F8	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	30	18,35	31,59	5,6	4,9
F6	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	30	19,85	33,84		
F9	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	60	18,33	31,04	9,2	1,6
F15	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	60	20,88	31,74		
F7	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	120	21,61	32,56	0,6	5,8
F27	Bet:2LA/K ₃ PO ₄	120	21,42	35,35		
F29	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	30	12,98	24,14	5,9	2,3
F19	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	30	14,11	24,96		
F2	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	60	13,71	26,56	13,4	8,9
F18	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	60	16,57	30,12		
F4	Bet:2urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	120	16,98	30,73	11,4	12,1
F22	Bet:2urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	120	14,44	25,89		
F13	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	30	-	-	-	-
F11	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	30	-	-	-	-
F28	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	60	-	-	-	-

F16	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	60	-	-		
F17	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	120	40,40	37,91	1,9	1,5
F1	Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄	120	41,48	38,74		
F24	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	30	14,28	27,89	6,9	12,9
F14	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	30	12,94	33,49		
F25	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	60	16,82	28,44	6,7	8,8
F20	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	60	15,31	32,23		
F5	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	120	17,52	39,61	3,9	0,6
F26	ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	120	18,53	39,29		
F30	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	30	32,56	43,29	7,3	3,9
F23	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	30	36,13	45,76		
F21	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	60	33,48	52,45	6,2	8,4
F12	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	60	30,67	46,58		
F3	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	120	32,00	59,13	1,8	2,3
F10	ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	120	31,19	61,08		

4.3.2 ANOVA de dos vías

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos mostrados en la Tabla 8 se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, con el objetivo de analizar la influencia que tienen cada uno de los factores y su interacción en las respuestas estudiadas (PRY y CRY).

Como se ha comentado anteriormente, para el ATPS Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ con un tiempo de reposo de 30 y 60 minutos no se obtuvieron resultados (separación de fases) por lo que se realizó un ANOVA del factor ATPS (a 4 niveles) y el factor tiempo (a 3 niveles) en el cual se analizan los efectos principales de los factores y su interacción recogidos en la Tabla 11 y Tabla 12 de los Anexos. La Tabla 9 resume los p – valores y el % Contribución de cada uno de los factores en las dos variables respuesta estudiadas: PRY y CRY.

Tabla 9. % Contribución y p-valores de los factores en cada variable estudiada

Factores estudiados	%PRY		%CRY	
	% Contribución	p - valor	% Contribución	p - valor
Tipo ATPS	95	< 0.001	81.5	< 0.001
Tiempo	0.8	0.138	9.5	< 0.001
ATPS:Tiempo	2.3	0.100	6.1	0.015

Los factores y/o la interacción entre los factores que presentan p-valores por debajo del nivel de significación ($\alpha = 0.05$) (resaltados en rojo) indican que tienen efecto estadísticamente significativo en la respuesta de la variable. Esto significa que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa para esos casos específicos. De este modo se observa que:

- En la extracción de proteínas, el factor ATPS presenta un efecto significativo con un alto % contribución, mientras que el factor tiempo y la interacción entre factores resultaron no tener efecto significativo.
- En la extracción de carbohidratos, el factor ATPS, el factor tiempo y la interacción entre factores presentan un efecto significativo pero el factor que más contribución tiene y, por tanto, mayor efecto produce en el resultado es el tipo de ATPS empleado.

Para interpretar mejor los resultados en la extracción de carbohidratos y proteínas mediante el empleo de los distintos sistemas ATPS y los diferentes tiempos de reposo, se presenta la Figura 9. Este diagrama presenta el rendimiento de extracción de carbohidratos y proteínas para los cuatro diferentes ATPS etiquetados como: ATPS 1, ATPS 2, ATPS 3 y ATPS 4 como se muestra en la figura, a los tres tiempos de reposo estudiados: 30, 60 y 120 minutos.

De forma general, se observa que los carbohidratos presentan un mayor rendimiento de extracción en comparación con las proteínas para todos los sistemas ATPS. Sin embargo, dado que nuestro objetivo principal es maximizar la recuperación de proteínas (%PRY), es importante centrar la discusión en los resultados que favorecen este parámetro, buscando minimizar la extracción de carbohidratos (%CRY) al mismo tiempo.

Respecto al tiempo de reposo, este no tiene un efecto significativo en la recuperación de proteínas. En todos los sistemas (ATPS 1, ATPS 2, ATPS 3 y ATPS 4), la recuperación de proteínas se mantiene estable con respecto al tiempo, lo que indica que alargar el tiempo de reposo no necesariamente mejora la eficiencia de extracción de proteínas.

El sistema ATPS 2 se presenta como el más prometedor para la extracción de proteínas, ya que, aunque este sistema también muestra un aumento significativo en la extracción de carbohidratos, su superioridad en la recuperación de proteínas en comparación con el resto de los sistemas estudiados lo convierte en la opción más eficiente. En cuanto al tiempo de reposo, este tiene un impacto notable en la extracción de carbohidratos en el ATPS 2, pero no mejora sustancialmente la recuperación de proteínas, por lo que no sería necesario prolongar el tiempo más allá de 60 minutos para optimizar el proceso de extracción de proteínas.

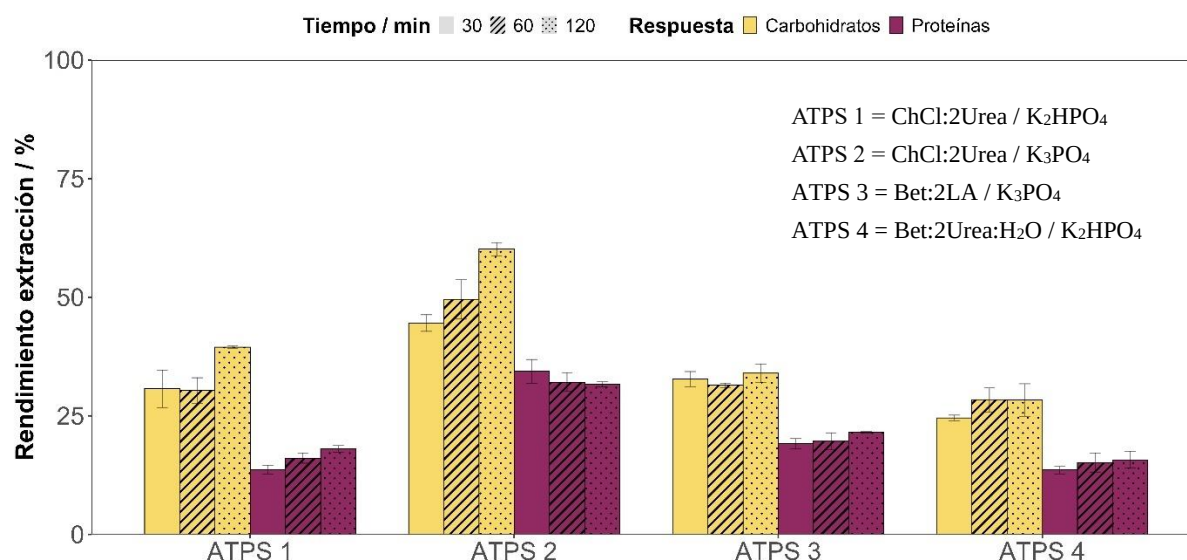


Figura 9. Diagrama de barras. Rendimiento de extracción de carbohidratos (en amarillo) y proteínas (en morado) para los diferentes sistemas ATPS (eje X) a los distintos tiempos de reposo estudiados (diferentes patrones). Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación típica (n=2).

Para una mejor visualización del efecto de cada uno de los factores se presenta un gráfico de medias en la Figura 10. Los resultados medios obtenidos para cada variable se recogen en las tablas de medias de los Anexos (Tabla 13 y Tabla 14).

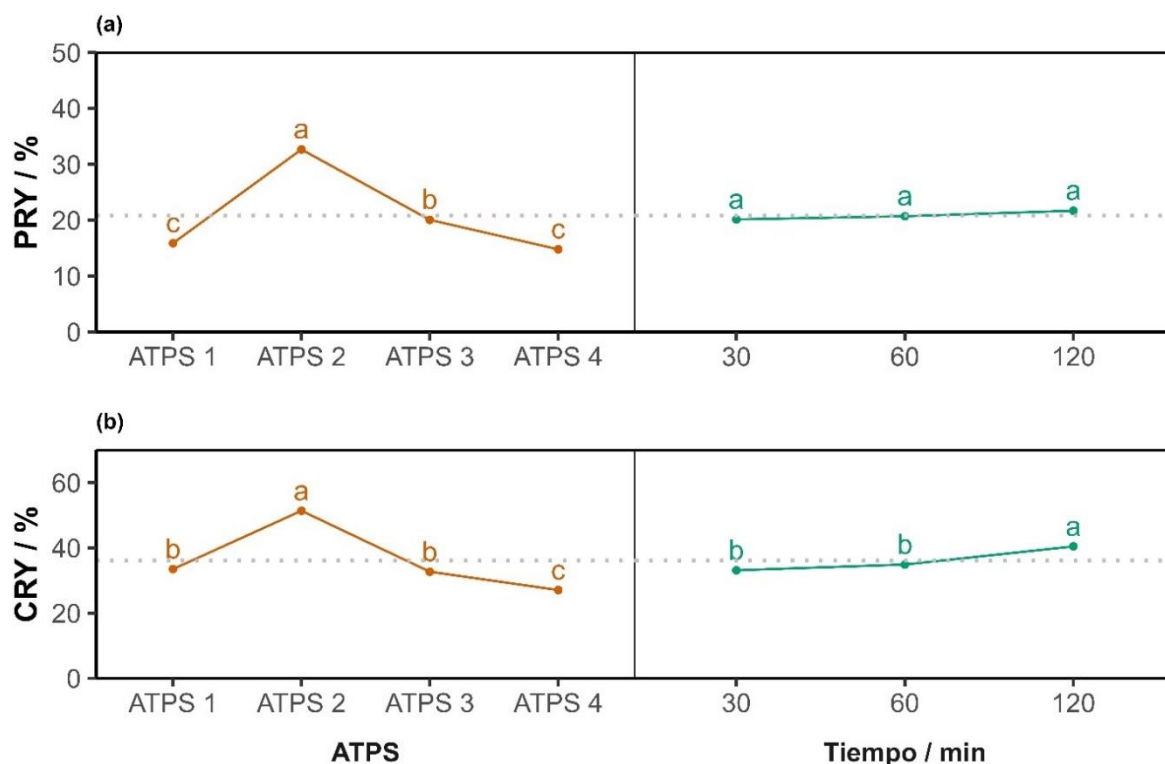


Figura 10. Gráfico de medias para PRY y CRY según los distintos ATPS (ATPS 1 = ChCl:2Urea/K₂HPO₄, ATPS 2 = ChCl:2Urea/K₃PO₄, ATPS 3 = Bet:2LA/K₃PO₄ y ATPS 4 = Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄) y tiempos de reposo estudiados. Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey. La línea punteada indica la gran media de cada variable respuesta.

El análisis del gráfico de medias muestra que el sistema ATPS 2 es el más eficiente en términos de rendimiento total de proteínas (PRY) y de carbohidratos (CRY), con valores significativamente mayores en comparación con los otros sistemas estudiados. Al igual que he comentado anteriormente El tiempo de reposo no tiene un impacto significativo en el rendimiento total de extracción de proteínas, pero si en el de carbohidratos sobre todo cuando este pasa de 60 a 120 minutos por lo que nos interesarán tiempos de reposo más cortos. Ninguno de los ATPS consigue maximizar la PRY y minimizar la CRY, pero observando la Figura 10, el ATPS 2 (ChCl:2Urea/K₃PO₄) es la mejor opción para llevar a cabo la extracción de proteínas ya que, aunque se extraigan una mayor cantidad de carbohidratos es mediante este ATPS con el que se consigue una mayor extracción de proteínas en comparación con el resto de ATPS estudiados.

Esta afirmación la podemos observar en la Figura 11, que presenta el rendimiento promedio a los tres tiempos ensayados, en el que de nuevo mediante el ATPS 2 (ChCl:2Urea/ K_3PO_4) el rendimiento de extracción de proteínas alcanzado es mayor en comparación con los resultados obtenidos en los demás ATPS.

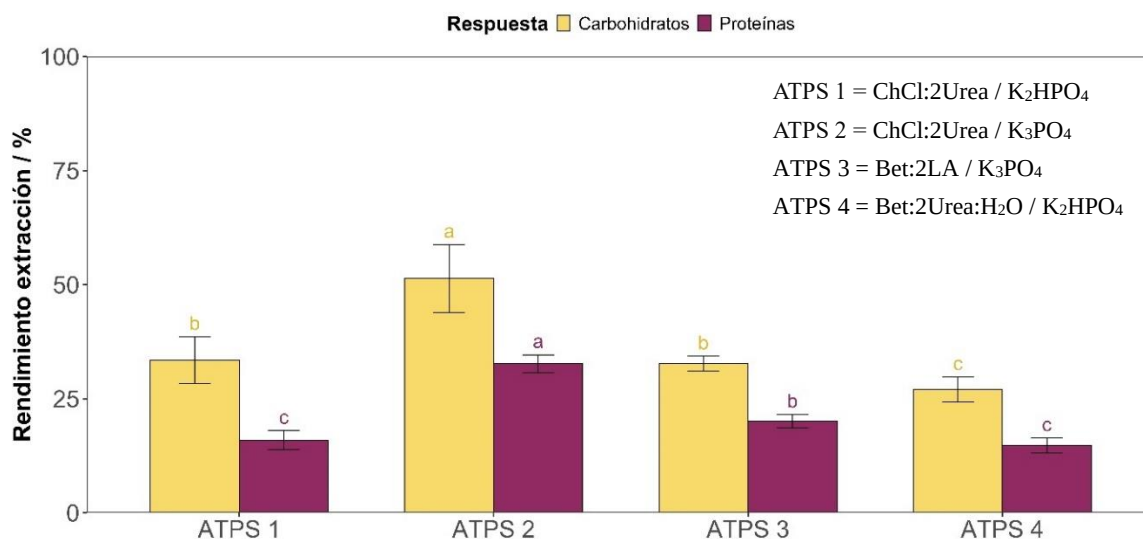


Figura 11. Diagrama de barras. Rendimiento promedio a los tres tiempos de reposo estudiados para los distintos ATPS. Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación típica ($n=2$). Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey.

Finalmente, queda comparar el ATPS 5 (Bet:2Urea:H₂O/ K_3PO_4) con los demás ATPS cuando el tiempo de reposo es de 120 minutos ya que únicamente a este tiempo se obtuvieron resultados reproducibles para el ATPS 5, que como hemos comentado anteriormente presenta una cinética lenta para el proceso de extracción. Estos resultados se presentan en la Figura 12, donde se puede observar que el sistema ATPS 5 (Bet:2Urea:H₂O/ K_3PO_4) muestra un resultado interesante, ya que el rendimiento de extracción de proteínas supera ligeramente al de carbohidratos. Este comportamiento rompe con la tendencia observada anteriormente, en los que el porcentaje de extracción de carbohidratos era mayor que el porcentaje de extracción de proteínas.

Aunque el tiempo de reposo utilizado (120 minutos) es relativamente largo, el ATPS 5 podemos decir que es la opción más adecuada para maximizar la recuperación de proteínas minimizando la extracción de carbohidratos.

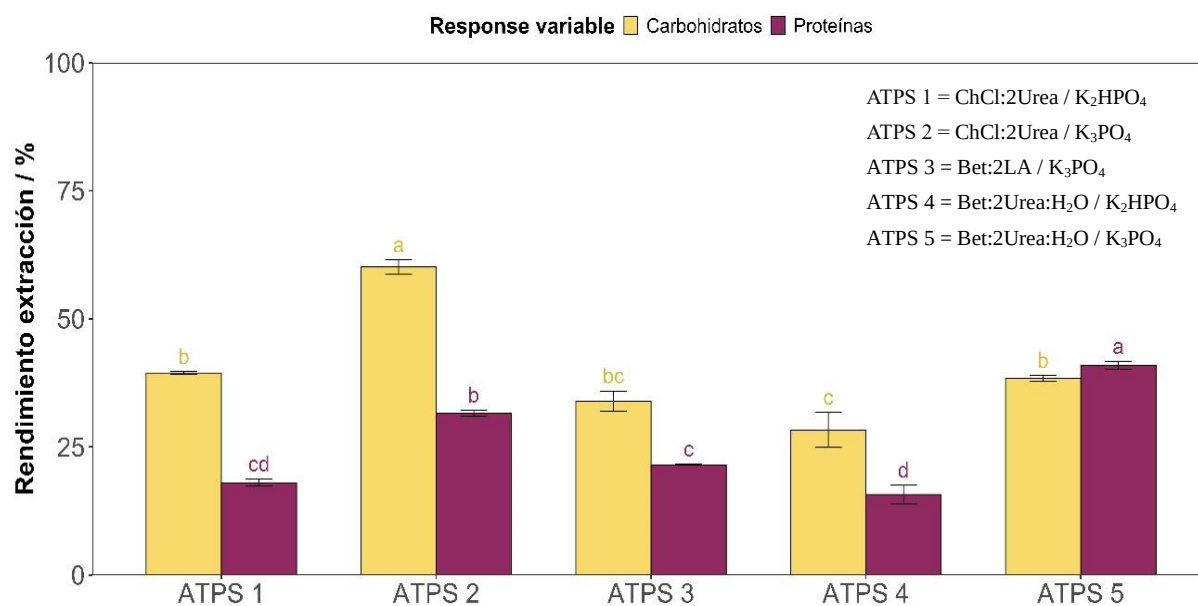


Figura 12. Diagrama de barras. Rendimiento de extracción de carbohidratos y proteínas utilizando diferentes sistemas ATPS con un tiempo de reposo de 120 minutos. Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación típica (n=2). Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey.

5 Conclusiones

En el presente trabajo se ha estudiado el potencial de los sistemas bifásicos acuosos (ATPS) basados en la combinación de disolventes eutécticos profundos naturales (DES) con disoluciones de fosfato, con el objetivo principal de lograr la extracción selectiva de proteínas a partir de fangos secundarios generados en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas (EDAR).

Las conclusiones que se extraen de este trabajo son las siguientes:

- Tras la caracterización de los ATPS Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ y Bet:2Urea:H₂O/K₂HPO₄ se encontró que el sistema Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ presentaba una mayor región bifásica debido a un mayor efecto “salting-out”.
- De la matriz de diseño 5x3 totalmente aleatorizada y un posterior análisis estadístico mediante ANOVA se obtuvieron los siguientes resultados:
 - Se puede observar que el factor ATPS tiene un efecto significativo en ambas variables estudiadas (% CRY y % PRY), mientras que el factor tiempo de reposo solo tiene efecto significativo en la variable % CRY, aumentando esta a medida que el tiempo de reposo es mayor, por lo que alargar este tiempo nos perjudica a la hora de extraer selectivamente proteínas frente a carbohidratos.
 - El sistema Bet:2Urea:H₂O/K₃PO₄ destacó por ser el más eficiente, alcanzando un 40% de recuperación de proteínas tras 120 minutos de reposo, siendo el único ATPS que favoreció la extracción de proteínas sobre la de carbohidratos.
 - El sistema ChCl:2Urea/K₃PO₄ también mostró un rendimiento notable, con una recuperación proteica del 32-33 % tras 30 minutos de reposo, aunque con poca selectividad respecto a los carbohidratos.

En resumen, podemos decir que los resultados obtenidos para la extracción de proteínas son aceptables ya que se han conseguido porcentajes de recuperación de hasta un 40%.

Por tanto, estos sistemas presentan ventajas importantes en comparación con las técnicas de extracción convencionales (menor toxicidad, más baratos, etcétera). No obstante, es conveniente que en futuras investigaciones se investiguen otros tipos de ATPS que ofrezcan una mayor selectividad y capacidad de solubilización hacia las proteínas, así como investigar otros factores que puedan influir en el proceso para optimizar el rendimiento.

6 Bibliografía

- [1] R. Saldaña Escorcía, J.K. Castillo Gámez, Alternativas para la estabilización de lodos generados en estaciones depuradoras de aguas residuales desde un enfoque sistémico: una revisión, *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 13 (2021) 175–194. <https://doi.org/10.22490/21456453.4504>.
- [2] J.A. Mendoza Roca, Tratamiento de fangos de depuración de aguas residuales, n.d.
- [3] A. Amador-Díaz, E. Veliz-Lorenzo, M. Bataller-Venta, Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones, *Revista CENIC Ciencias Químicas* 46 (2015).
- [4] A. Gherghel, C. Teodosiu, S. De Gisi, A review on wastewater sludge valorisation and its challenges in the context of circular economy, *J Clean Prod* 228 (2019) 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.240>.
- [5] M. Kacprzak, E. Neczaj, K. Fijałkowski, A. Grobelak, A. Grosser, M. Worwag, A. Rorat, H. Brattebo, Å. Almås, B.R. Singh, Sewage sludge disposal strategies for sustainable development, *Environ Res* 156 (2017) 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>.
- [6] J. Wang, K. Chon, X. Ren, Y. Kou, K.J. Chae, Y. Piao, Effects of beneficial microorganisms on nutrient removal and excess sludge production in an anaerobic-anoxic/oxic (A2O) process for municipal wastewater treatment, *Bioresour Technol* 281 (2019) 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.047>.
- [7] T.R. Praveenkumar, S. Manigandan, H.F. Gemedé, V. Prabu, D. Balamoorthy, G. Tadesse, B. Rath, Effective utilization of waste textile sludge composite with Al₂O₃ nanoparticles as a value-added application, *Applied Nanoscience (Switzerland)* 13 (2023) 1251–1261. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-02001-4>.
- [8] Y. Yan, Y. Zhang, J. Gao, L. Qin, F. Liu, W. Zeng, J. Wan, Intracellular and extracellular sources, transformation process and resource recovery value of proteins extracted from wastewater treatment sludge via alkaline thermal hydrolysis and enzymatic hydrolysis, *Science of the Total Environment* 852 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158512>.

- [9] A.S. Chandran, S. Suri, P. Choudhary, Sustainable plant protein: an up-to-date overview of sources, extraction techniques and utilization, *Sustainable Food Technology* 1 (2023) 466–483. <https://doi.org/10.1039/d3fb00003f>.
- [10] M. Houde, N. Khodaei, N. Benkerroum, S. Karboune, Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties, *Food Chem* 254 (2018) 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.156>.
- [11] D.N. López, M. Galante, M. Robson, V. Boeris, D. Spelzini, Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties, *Int J Biol Macromol* 109 (2018) 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080>.
- [12] L.E. Abugoch, N. Romero, C.A. Tapia, J. Silva, M. Rivera, Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates, *J Agric Food Chem* 56 (2008) 4745–4750. <https://doi.org/10.1021/jf703689u>.
- [13] H. Kamal, C.F. Le, A.M. Salter, A. Ali, Extraction of protein from food waste: An overview of current status and opportunities, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20 (2021) 2455–2475. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12739>.
- [14] A.S. Yazdi, Surfactant-based extraction methods, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.010>.
- [15] P. Novák, V. Havlíček, Protein Extraction and Precipitation, *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition* (2016) 52–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00004-5>.
- [16] A. Etxabide, T. Garrido, J. Uranga, P. Guerrero, K. de la Caba, Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications, *Int J Biol Macromol* 120 (2018) 2094–2105. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.030>.
- [17] A. Raheem, V.S. Sikarwar, J. He, W. Dastyar, D.D. Dionysiou, W. Wang, M. Zhao, Opportunities and challenges in sustainable treatment and resource reuse of sewage sludge: A review, *Chemical Engineering Journal* 337 (2018) 616–641. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.149>.

- [18] W. Hui, J. Zhou, R. Jin, Proteins recovery from waste activated sludge by thermal alkaline treatment, *J Environ Chem Eng* 10 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107311>.
- [19] E.B. Çelebi, A. Aksoy, F.D. Sanin, Maximizing the energy potential of urban sludge treatment: An experimental study and a scenario-based energy analysis focusing on anaerobic digestion with ultrasound pretreatment and sludge combustion, *Energy* 221 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.119876>.
- [20] T. Abbott, G. Kor-Bicakci, C. Eskicioglu, Examination of single-stage anaerobic and anoxic/aerobic and dual-stage anaerobic-anoxic/aerobic digestion to remove pharmaceuticals from municipal biosolids, *Science of the Total Environment* 791 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148237>.
- [21] D. Nabarlantz, J. Vondrysova, P. Jenicek, F. Stüber, J. Font, A. Fortuny, A. Fabregat, C. Bengoa, Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication, *Ultrason Sonochem* 17 (2010) 923–931. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.02.006>.
- [22] P. Neumann, Z. González, G. Vidal, Sequential ultrasound and low-temperature thermal pretreatment: Process optimization and influence on sewage sludge solubilization, enzyme activity and anaerobic digestion, *Bioresour Technol* 234 (2017) 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.029>.
- [23] D. Moldes, E.M. Rojo, S. Bolado, P.A. García-Encina, B. Comesaña-Gándara, Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae, *Applied Sciences (Switzerland)* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/app12052391>.
- [24] G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro, P. Cintas, Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason Sonochem* 15 (2008) 898–902. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.10.009>.
- [25] C. Liu, B. Chen, W. Shi, W. Huang, H. Qian, Ionic Liquids for Enhanced Drug Delivery: Recent Progress and Prevailing Challenges, *Mol Pharm* 19 (2022) 1033–1046. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00960>.
- [26] C. Kimble, C.M. Burba, Liquid Structure of Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide-Based Ionic Liquids Assessed by FT-IR Spectroscopy, *Journal of Physical Chemistry B* 121 (2017) 3099–3110. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b00620>.

- [27] K. Yoon-Mo, I. Toshiyuki, *Application of Ionic Liquids in Biotechnology*, Springer, Hannover, Germany, 2019. <http://www.springer.com/series/10>.
- [28] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, V. Tambyrajah, Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, *Chemical Communications* (2003) 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>.
- [29] M.A.R. Martins, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures, *J Solution Chem* 48 (2019) 962–982. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0793-1>.
- [30] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chem Rev* 121 (2021) 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [31] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, *Chem Rev* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [32] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications, *Chem Soc Rev* 41 (2012) 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>.
- [33] Z. Yang, Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 168 (2019) 31–59. https://doi.org/10.1007/10_2018_67.
- [34] A.B. Botelho Junior, G. Pavoski, M.D.C.R. da Silva, W.L. da Silva, D.A. Bertuol, D.C.R. Espinosa, Promising technologies under development for recycling, remanufacturing, and reusing batteries: an introduction, *Nano Technology for Battery Recycling, Remanufacturing, and Reusing* (2022) 79–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91134-4.00006-6>.
- [35] Y. Dai, J. van Spronsen, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, *Anal Chim Acta* 766 (2013) 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.

- [36] F.S. Buarque, G.V. Gautério, M.A.Z. Coelho, A.C. Lemes, B.D. Ribeiro, Aqueous Two-Phase Systems Based on Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents as a Tool for the Recovery of Non-Protein Bioactive Compounds—A Review, *Processes* 11 (2023). <https://doi.org/10.3390/pr11010031>.
- [37] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M.A.B. Shabbir, H.I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol Proced Online* 18 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- [38] Y. Xie, H. Xing, Q. Yang, Z. Bao, B. Su, Q. Ren, Aqueous Biphasic System Containing Long Chain Anion-Functionalized Ionic Liquids for High-Performance Extraction, *ACS Sustain Chem Eng* 3 (2015) 3365–3372. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01068>.
- [39] B. Schuur, T. Brouwer, D. Smink, L.M.J. Sprakel, Green solvents for sustainable separation processes, *Curr Opin Green Sustain Chem* 18 (2019) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.12.009>.
- [40] J. Alcalde, Aplicación de sistemas bifásicos acuosos en la extracción de biomoléculas a partir de biomasa algal, (2023). <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/63718>.
- [41] M. Mohsen-Nia, B. Jazi, H. Amiri, Binodal curve measurements for (water + propionic acid + dichloromethane) ternary system by cloud point method, *Journal of Chemical Thermodynamics* 41 (2009) 859–863. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2009.02.004>.
- [42] E.C. de Souza, J.S. dos R. Coimbra, E.B. de Oliveira, R.C.F. Bonomo, Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 973 (2014) 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.014>.
- [43] A. Goyal, I. Punjab, H. Kumar, *Advanced Techniques of Analytical Chemistry: Volume 1*, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2022. <https://doi.org/10.2174/97898150502331220101>.
- [44] J. Martín-Juárez, M. Vega-Alegre, E. Riol-Pastor, R. Muñoz-Torre, S. Bolado-Rodríguez, Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater, *Bioresour Technol* 281 (2019) 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.082>.

- [45] J.M. Walker, The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation, in: The Protein Protocols Handbook, 2009: pp. 11–15. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_3.
- [46] G. Andrade, H. Alcántara, M. González, R. Silva, L. Vilchis Landeros, Comité Editorial: Purificación de proteínas, 2021. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>.
- [47] S.S. Nielsen, Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method, in: 2017: pp. 137–141. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_14.
- [48] H.P. Piepho, Letters in mean comparisons: What they do and don't mean, *Agron J* 110 (2018) 431–434. <https://doi.org/10.2134/agronj2017.10.0580>.
- [49] H.P. Piepho, An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons, *Journal of Computational and Graphical Statistics* 13 (2004) 456–466. <https://doi.org/10.1198/1061860043515>.
- [50] M.J. Hey, D.P. Jackson, H. Yan, The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol), *Polymer (Guildf)* 46 (2005) 2567–2572. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.019>.

Anexo I

- Composiciones experimentales de las curvas binodales**

Tabla 10. Datos experimentales de las curvas binodales (fracción másica en porcentaje) para los ATPS caracterizados a T = 25°C y presión atmosférica

Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄		Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	
% sal	% DES	% sal	% DES
42.56	6.44	10.50	64.36
37.17	10.17	12.88	57.11
27.93	19.20	14.97	50.63
26.66	21.35	20.93	36.92
26.03	22.95	23.10	34.53
24.85	24.83	24.21	32.33
22.96	27.48	26.10	28.76
19.76	33.42	26.61	27.32
17.45	37.54	31.46	21.08
15.11	42.17	35.42	16.45
12.17	48.55	35.47	16.08
11.89	49.32	37.43	14.17
10.57	53.18	39.32	11.90
9.51	57.22	42.09	8.96
8.55	61.34	46.12	6.82
5.13	76.25	50.04	5.08
44.49	5.08	52.85	3.76
6.63	67.85	57.34	2.03

- **Tablas de ANOVA**

Tabla 11. ANOVA del% PRY

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	p-valor
Factor A: ATPS	3	1208.88	402.959	189.3	0.0000
Factor B: Tiempo	2	9.98381	4.9919	2.35	0.1381
Interacción AxB	6	29.7483	4.95805	2.33	0.1002
Residuos	12	25.5448	2.12873		
Total	23	1274.16			

Tabla 12. ANOVA del % CRY

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	p-valor
Factor A: ATPS	3	2001.43	667.144	114.13	0.0000
Factor B: Tiempo	2	234.311	117.155	20.04	0.0001
Interacción AxB	6	151.094	25.1823	4.31	0.0151
Residuos	12	70.1475	5.84563		
Total	23	2456.98			

- **Tablas de medias**

Tabla 13. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para % CRY con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.
MEDIA GLOBAL	24	36.16	
ATPS			
Bet:2LA/K ₃ PO ₄	6	32.69	0.99
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	6	27.07	0.99
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	6	33.49	0.99
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	6	51.38	0.99
Tiempo / min			
30	8	33.12	0.85
60	8	34.90	0.85
120	8	40.46	0.85
ATPS x Tiempo			
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;30	2	32.72	1.71
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;60	2	31.39	1.71
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;120	2	33.96	1.71
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;30	2	24.55	1.71
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;60	2	28.34	1.71
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;120	2	28.31	1.71
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;30	2	30.69	1.71
ChCl:2Urea/ K ₂ HPO ₄ ;60	2	30.34	1.71
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;120	2	39.45	1.71
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;30	2	44.53	1.71
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;60	2	49.52	1.71
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;120	2	60.11	1.71

Tabla 14. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para % PRY con intervalos de confianza del 95.0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.
MEDIA GLOBAL	24	20.8608	
ATPS			
Bet:2LA/K ₃ PO ₄	6	20.07	0.60
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄	6	14.80	0.60
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄	6	15.90	0.60
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄	6	32.67	0.60
Tiempo			
30	8	20.15	0.52
60	8	20.72	0.52
120	8	21.71	0.52
ATPS x Tiempo			
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;30	2	19.10	1.03
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;60	2	19.61	1.03
Bet:2LA/K ₃ PO ₄ ;120	2	21.52	1.03
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;30	2	13.55	1.03
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;60	2	15.14	1.03
Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ ;120	2	15.71	1.03
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;30	2	13.61	1.03
ChCl:2Urea/ K ₂ HPO ₄ ;60	2	16.07	1.03
ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ ;120	2	18.03	1.03
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;30	2	34.35	1.03
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;60	2	32.08	1.03
ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ ;120	2	31.60	1.03

Anexo II: Listado de figuras y tablas

Figuras:

Figura 1. Representación esquemática de la comparación de los equilibrios sólido-líquido de una mezcla eutéctica ideal simple (línea roja) y una mezcla eutéctica profunda (línea azul) [29]	8
Figura 2. Estructuras de algunos HBAs y HBDs más empleados en la formación de los DES.	8
Figura 3. Diagrama de fases de un hipotético ATPS [36]	12
Figura 4. Reacción de formación del complejo coloreado de Cu(I) con dos moléculas de BCA	22
Figura 5. Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos	23
Figura 6. Curva binodal y rectas de reparto para el sistema Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄ . 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 la ecuación de Merchuk (ec. 2)	27
Figura 7. Curva binodal y rectas de reparto para el sistema Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ . 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 la ecuación de Merchuk (ec. 2)	27
Figura 8. Curvas binodales para los sistemas Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄ y Bet:2Urea:H ₂ O/K ₃ PO ₄ , los símbolos indican los puntos obtenidos experimentalmente y las líneas (—) el ajuste obtenido mediante la ecuación de Merchuk (ec. 2)	28
Figura 9. Diagrama de barras. Rendimiento de extracción de carbohidratos (en amarillo) y proteínas (en morado) para los diferentes sistemas ATPS (eje X) a los distintos tiempos de reposo estudiados (diferentes patrones). Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación típica (n=2).	34
Figura 10. Gráfico de medias para PRY y CRY según los distintos ATPS (ATPS 1 = ChCl:2Urea/K ₂ HPO ₄ , ATPS 2 = ChCl:2Urea/K ₃ PO ₄ , ATPS 3 = Bet:2LA/K ₃ PO ₄ y ATPS 4 = Bet:2Urea:H ₂ O/K ₂ HPO ₄) y tiempos de reposo estudiados. Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey. La línea punteada indica la gran media de cada variable respuesta.	35
Figura 11. Diagrama de barras. Rendimiento promedio a los tres tiempos de reposo estudiados para los distintos ATPS. Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación	

típica (n=2). Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey.	36
Figura 12. Diagrama de barras. Rendimiento de extracción de carbohidratos y proteínas utilizando diferentes sistemas ATPS con un tiempo de reposo de 120 minutos. Los valores experimentales se muestran como la media $\pm$ desviación típica (n=2). Las letras situadas encima de los puntos se disponen siguiendo la metodología CLD, tras los resultados de la prueba de Tukey.	37

Tablas:

Tabla 1. Clasificación de los DES [30–32]	9
Tabla 2. Estructuras de los compuestos de partida de los DES empleados.....	15
Tabla 3. Factores empleados en el diseño factorial completo 5x3: Tipo de ATPS y tiempo de reposo	24
Tabla 4. Composición del fango empleado en este trabajo	26
Tabla 5. Parámetros de ajuste de la ecuación de Merchuk y R ²	28
Tabla 6. 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 sistemas Bet:2Urea:H ₂ O / K ₃ PO ₄ y Bet:2Urea:H ₂ O / K ₂ HPO ₄ , estudiados a 25 °C y presión atmosférica.	29
Tabla 7. Composiciones de mezcla inicial y de las fases en el equilibrio (en porcentaje en masa), junto con las correspondientes longitudes (TLL) y pendientes (STL) de las rectas de reparto para los 5 ATPS estudiados	30
Tabla 8. Matriz de diseño factorial de dos factores, tipo de ATPS a 5 niveles y tiempo de reposo a tres niveles.	31
Tabla 9. % Contribución y p-valores de los factores en cada variable estudiada.....	33
Tabla 10. Datos experimentales de las curvas binodales (fracción másica en porcentaje) para los ATPS caracterizados a T = 25°C y presión atmosférica.....	45
Tabla 11. ANOVA del% PRY	46
Tabla 12. ANOVA del % CRY	46
Tabla 13. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para % CRY con intervalos de confianza del 95.0%.....	47
Tabla 14. Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para % PRY con intervalos de confianza del 95.0%.....	48