



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS POLIMÉRICAS
EXTRACELULARES (EPS) PARA SU VALORIZACIÓN COMO BIOSORBENTE
DE COBRE**

POR

Catalina Fernanda Grau Aravena

Memoria de Título presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Concepción para
optar al título profesional de Ingeniera Civil Química

Profesoras Guía

Teresita Marzialetti

Marlene Roeckel Von Bennewitz

Profesor Comisión

Andrés Mejía

Marzo 2024

Concepción (Chile)

© 2024, Catalina Fernanda Grau Aravena

© 2024, Catalina Fernanda Grau Aravena

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres, su amor incondicional y apoyo constante han sido el motor que me ha impulsado al logro de todas mis metas. Gracias por siempre estar a mi lado y por enseñarme a creer en mí misma y en mis capacidades.

Asimismo, expreso mi gratitud a todos los que me guiaron y apoyaron este proceso. A mis profesoras guía, Prof. Teresita y Marlene, por orientarme en este proceso con su conocimiento y experiencia, a Carlo, por su constante disposición para ayudar, por enseñarme y por la paciencia infinita, y a Rose, Gaby y Don Luchito, por recibirme en el laboratorio con los brazos abiertos y con la mejor de las disposiciones.

Extiendo el agradecimiento a mi mejor amiga y compañera de todas mis aventuras, Cata, por su amistad incondicional, su apoyo constante y por siempre hacerme reír a pesar de todas las adversidades. Estoy tremendamente agradecida de haber vivido tantas experiencias contigo a mi lado.

A mi familia elegida y los cómplices de mis días en España, Mario, Isi y Cata, agradezco enormemente todo el apañe en esta travesía y por convertirse en los hermanos que nunca tuve estando lejos de casa.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia y amigos, en especial a Majo, Feña, Mati y Josefa. Gracias por los momentos de risas compartidas, por las enseñanzas y la buena compañía a lo largo de todo este proceso.

Resumen

La gestión de residuos, especialmente en el tratamiento de aguas residuales, es un desafío creciente debido a la liberación de metales pesados en ambientes acuáticos causado por actividades industriales, y representa una amenaza a ecosistemas y la salud humana. Las Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) tienen propiedades únicas que las hacen efectivas como adsorbentes de metales pesados, convirtiéndolas en una alternativa atractiva en la búsqueda de soluciones sostenibles y económicamente viables para la remoción de estos metales. Esta tesis se centró en optimizar la extracción de EPS desde lodos de depuración de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) con el fin de maximizar el rendimiento y su capacidad de adsorción de cobre (Cu^{2+}) mediante el diseño experimental como técnica estadística. El método de extracción utilizado fue una hidrólisis alcalina variando cuatro factores: concentración de reactivo, temperatura, porcentaje en masa de lodo en la mezcla de lodo y reactivo alcalino y el tipo de reactivo alcalino. Aunque no se alcanzaron las condiciones óptimas entre las variables y niveles estudiados, se identificó que a 20°C , 10% p/p de lodo y utilizando NaOH 1M se maximizaban los rendimientos de extracción y capacidad de adsorción de las EPS (465 mg EPS/g SV y 46,5 mg Cu(II) ads/g EPS, respectivamente). Adicionalmente, se determinó que la temperatura y el porcentaje de lodo son las variables más influyentes en el rendimiento de extracción, mientras que la concentración de reactivo y el porcentaje de lodo son las más influyentes en la capacidad de adsorción. La caracterización de extractos reveló una mayor presencia de proteínas que polisacáridos, especialmente en los ensayos con altas concentraciones de reactivos alcalinos. A diferencia de lo publicado en la literatura, aparentemente, el aumento de la temperatura en la extracción no incrementa la cantidad de EPS; sin embargo, lo que se observa en este estudio es resultado de dos efectos, uno de ellos es la degradación de macromoléculas provocada por la temperatura y el debido a la pérdida de componentes moleculares de menor peso molecular durante las etapas de diálisis previas a las pruebas de adsorción. Se observaron mejores capacidades de adsorción utilizando Na_2CO_3 en lugar de NaOH como reactivo alcalino, pues la menor alcalinidad permitió mantener mejor la integridad estructural de las EPS, manteniendo así la actividad de los grupos funcionales en su superficie, lo que favorece la adsorción de iones metálicos. Los ensayos de potencial Z indicaron que la interacción electrostática no explica completamente el comportamiento de las EPS en los procesos de adsorción, por lo que se requiere de una investigación más detallada de los mecanismos que actúan en este proceso. La principal limitación del presente estudio fue el modelo de regresión de primer orden utilizado en el diseño experimental, que no permitió una optimización completa. Se recomienda llevar a cabo un diseño experimental con un modelo de regresión de segundo orden siendo el Diseño Central Compuesto o el Diseño Box-Behnken adecuados para ello.

Abstract

Waste management, especially in wastewater treatment, is a growing challenge due to urban development and the release of heavy metals into aquatic environments caused by industrial activities, poses a threat to ecosystems and human health. Extracellular Polymeric Substances (EPS) have unique properties that make them effective adsorbents for heavy metals, making them an attractive alternative in the search for sustainable and economically viable solutions for metal removal. This thesis focused on optimizing a process for the efficient extraction of EPS from sludges of Wastewater Treatment Plants (WWTPs) to maximize the yield and their capacity for copper (Cu^{2+}) adsorption, through experimental design as a statistical technique. The extraction method used was alkaline hydrolysis, varying four factors: reagent concentration, temperature, percentage by mass of sludge in the sludge-reagent mixture, and type of alkaline reagent. Although the optimal conditions were not achieved, it was identified that at 20°C, 10% w/w sludge, and using 1M NaOH, extraction yields and adsorption capacity of EPS were maximized (465 mg EPS/g SV and 46.5 mg Cu(II) ads/g EPS, respectively). Additionally, it was determined that temperature and sludge percentage are the most influential variables on the extraction yield, while reagent concentration and sludge percentage are the most influential on the adsorption capacity. Characterization of extracts revealed a higher presence of proteins than polysaccharides, especially in trials with high concentrations of alkaline reagents. Unlike what is published in the literature, apparently increasing the temperature in the extraction does not increase the amount of EPS; however, what is observed in this study is the result of two effects, one of them being the degradation of macromolecules caused by temperature and the other due to the loss of molecular components of lower weight during the dialysis stages prior to adsorption tests. Better adsorption capacities were observed using Na_2CO_3 instead of NaOH as the alkaline reagent, as the lower alkalinity allowed better maintenance of the structural integrity of the EPS, thus maintaining the activity of the functional groups on its surface, favoring the adsorption of metal ions. On the other hand, Z potential assays indicated that electrostatic interaction does not fully explain the behavior of EPS in adsorption processes, thus requiring further investigation of the mechanisms involved in this process. The main limitation of this study was the first-order regression model used in the experimental design, which did not allow for complete optimization. It is recommended to carry out an experimental design with a second-order regression model, with the Central Composite Design or the Box-Behnken Design being suitable for this purpose.

Tabla de Contenidos

Agradecimientos	3
Resumen.....	4
Abstract	5
Tabla de Contenidos.....	6
Lista de Tablas.....	9
Lista de Figuras.....	10
Nomenclatura.....	12
1. Introducción	13
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Metodología	18
3.1. Caracterización de lodos	18
3.1.1. Determinación de densidad de lodo	18
3.1.2. Determinación de sólidos totales (ST) y volátiles (SV).....	18
3.2. Ajuste de cinética de hidrólisis para extracción de EPS	19
3.3. Diseño experimental	20
3.3.1. Diseño factorial completo con puntos centrales	20
3.3.2. Análisis de varianza ANOVA	21
3.3.3. Metodología de superficie de respuesta.....	21
3.4. Extracción de EPS.....	23
3.4.1. Hidrólisis alcalina	24
3.4.2. Centrifugación.....	24
3.4.3. Filtración	24
3.4.4. Purificación mediante diálisis	25
3.4.5. Liofilización.....	25
3.5. Caracterización de EPS.....	25
3.5.1. Proteínas.....	25
3.5.2. Polisacáridos	25

3.5.3.	Potencial Z	26
3.6.	Rendimiento de extracción.....	26
3.7.	Adsorción de cobre	26
4.	Resultados y discusión.....	28
4.1.	Caracterización del lodo.....	28
4.2.	Estudio de ajuste de cinética de hidrólisis para extracción de EPS	28
4.3.	Caracterización de EPS.....	29
4.3.1.	Proteínas y polisacáridos.....	29
4.3.2.	Potencial Z	32
4.4.	Rendimiento de extracción de EPS.....	33
4.5.	Capacidad adsorbente de los extractos de EPS.....	35
4.6.	Análisis estadístico de experimentos	37
4.6.1.	Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción	38
4.6.2.	Superficies de respuesta para la respuesta de capacidad de adsorción	42
4.6.3.	Búsqueda de punto óptimo.....	46
5.	Conclusiones	48
6.	Referencias.....	50
7.	Anexos	53
7.1.	Antecedentes teóricos adicionales	53
7.1.1.	Sustancias Poliméricas Extracelulares	53
7.1.2.	Mecanismos de adsorción de metales pesados utilizando EPS.....	53
7.1.3.	Análisis estadístico de experimentos: Definiciones relevantes.....	53
7.1.3.1.	Summary of Fit (Resumen de Ajuste).....	53
7.2.	Metodología: Diseño experimental.	55
7.3.	Metodología: Procedimientos de laboratorio.....	57
7.3.1.	Caracterización de lodo.....	57
7.3.2.	Protocolo para extracción de EPS.....	58
7.3.3.	Protocolo para ensayos de adsorción de cobre.....	63
7.3.4.	Protocolo para medición de proteínas	64
7.3.5.	Protocolo para medición de polisacáridos	65
7.4.	Resultados y discusión: Tablas de datos obtenidos.....	67
7.4.1.	Resultados obtenidos para la caracterización del lodo inicial.....	67

7.4.2.	Resultados obtenidos para estudios de cinética de hidrólisis alcalina.	67
7.4.3.	Resultados obtenidos para la caracterización de todos los extractos estudiados	68
7.5.	Resultados y discusión: Modificación de modelos del diseño experimental.....	70
7.5.1.	Ajuste de modelo de rendimiento de extracción de EPS	70
7.5.2.	Ajuste de modelo de capacidad de adsorción de EPS.....	72
7.6.	Script de MATLAB para ajuste de modelo a cinética de hidrólisis	73

Lista de Tablas

Tabla 3.1: Condiciones de operación para ensayos A, B y C de extracción de EPS.	19
Tabla 3.2: Rango experimental para la evaluación de factores en la optimización de extracción de EPS.....	22
Tabla 4.1: Punto isoeléctrico de cada extracto obtenido.	32
Tabla 4.2: Rendimientos de extracción de EPS reportados en literatura distribuidos según el método de extracción utilizado.	34
Tabla 7.1: Composición general de las EPS y propiedades predominantes de cada grupo funcional (More et al., 2014).....	53
Tabla 7.2: Transformada de la respuesta de acuerdo a los valores lambda obtenidos en el gráfico Box Cox.....	55
Tabla 7.3: Matriz de experimentos para el diseño experimental de optimización de extracción de EPS	55
Tabla 7.4: Criterios de optimización de proceso de extracción de EPS.....	56
Tabla 7.5: Preparación de soluciones de BSA a distintas concentraciones para efectuar la curva de calibración.....	64
Tabla 7.6: Preparación de soluciones de glucosa a distintas concentraciones para efectuar la curva de calibración.....	66
Tabla 7.7: Resultados de mediciones de densidad del lodo utilizado.	67
Tabla 7.8. Resultados de mediciones de sólidos totales y volátiles del lodo en estudio.....	67
Tabla 7.9: Concentración de proteínas en mg/L para cada intervalo de tiempo de los ensayos A, B y C de cinética de hidrólisis.	67
Tabla 7.10: Concentración de polisacáridos en mg/L para cada intervalo de tiempo de los ensayos A, B y C de cinética de hidrólisis.	68
Tabla 7.11: Porcentaje de proteínas, polisacáridos y la suma de ambos sobre la masa total de EPS para los 21 experimentos.	68
Tabla 7.12: Rendimientos de extracción y capacidad de adsorción para los 21 experimentos realizados en el diseño experimental.....	69

Lista de Figuras

Figura 3.1: Esquema de mejor tratamiento, punto óptimo, región experimental y región de operabilidad de la MSR (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, s. f.).....	22
Figura 3.2: Procedimiento utilizado para extracción y purificación de EPS.	23
Figura 3.3: Esquema de procedimiento de extracción de EPS.	24
Figura 4.1: (a) Ajuste de datos experimentales de cuantificación de proteínas para los ensayos A, B, y C a modelo cinético de pseudo primer orden para concentraciones iniciales de proteína de 194 mg/L (b) Ajuste de datos experimentales de cuantificación de polisacáridos para los ensayos A, B, y C a modelo cinético de pseudo primer orden para concentraciones iniciales de polisacáridos de 124 mg/L. Ensayo A: 20°C, 10% lodo y Na ₂ CO ₃ 0,05M; Ensayo B: 80°C, 10% lodo y Na ₂ CO ₃ 0,05M; Ensayo C: 20°C, 10% lodo y Na ₂ CO ₃ 1M.	29
Figura 4.2: Porcentajes de proteínas y polisacáridos sobre la masa total de EPS para cada extracto..	30
Figura 4.3: Porcentaje dentro del rango de pesos moleculares mayores a 3500 Da de proteínas y polisacáridos del total en extracto liofilizado para cada experimento.	31
Figura 4.4: Rendimientos de extracción de los 21 experimentos realizados.	33
Figura 4.5: Capacidades de adsorción para cada extracto de EPS.	35
Figura 4.6: Rendimiento global de extracción para los 21 experimentos.	36
Figura 4.7: Resumen de ajuste para las respuestas de rendimiento de extracción y capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7)	37
Figura 4.8: Resumen de ajuste del modelo modificado para el rendimiento de extracción de EPS. (Fuente: Modde 7).	39
Figura 4.9: Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs Temperatura para NaOH con 30% de lodo. (Fuente: Modde 7).	40
Figura 4.10: Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para Na ₂ CO ₃ con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para Na ₂ CO ₃ 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs porcentaje de lodo para Na ₂ CO ₃ a 50°C. (Fuente: Modde 7).	41
Figura 4.11: Resumen de ajuste del modelo modificado para la capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7).	42

Figura 4.12: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para NaOH con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (Fuente: Modde 7).....	43
Figura 4.13: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS.. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para Na ₂ CO ₃ con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para Na ₂ CO ₃ 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para Na ₂ CO ₃ a 50°C. (Fuente: Modde 7).....	44
Figura 4.14: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS, considerando el efecto cuadrático de la variable de porcentaje de lodo. (a) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M.....	47
Figura 7.1: Hidrólisis alcalina para extracción de EPS a partir de lodos sanitarios.	59
Figura 7.2: Muestra centrifugada.	60
Figura 7.3: Ensamblado del sistema para filtrado de muestras.....	61
Figura 7.4: Sistema de membranas de diálisis con peso molecular de corte de 3500 Da.....	62
Figura 7.5: Extractos de EPS en liofilizador.....	63
Figura 7.6: Box Cox Plot para transformación de respuesta. (Fuente: Modde 7).....	70
Figura 7.7: Coeficientes escalados y centrados para el rendimiento de extracción de EPS (Fuente: Modde 7).....	71
Figura 7.8: Diagrama de Probabilidad Normal de Residuos para el rendimiento de extracción de EPS (Fuente: Modde 7).....	71
Figura 7.9: Valores observados vs predichos para el rendimiento de extracción de EPS. (Fuente: Modde 7).....	71
Figura 7.10: Coeficientes escalados y centrados para la capacidad de adsorción de EPS (Fuente: Modde 7).....	72
Figura 7.11: Diagrama de Probabilidad Normal de Residuos para la capacidad de extracción de EPS (Fuente: Modde 7).....	73
Figura 7.12: Valores observados vs predichos para la capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7).....	73

Nomenclatura

Notación	Variable o Definición	Unidad
ADS o Q_e	Capacidad de adsorción de EPS	mg Cu(II) ads/g EPS
Na_2CO_3	Carbonato de sodio	-
NaCl	Cloruro de sodio	-
C_A	Concentración de macromoléculas en el tiempo	mg/L
CR	Concentración de reactivo alcalino	M
C_0	Concentración inicial de iones de cobre	mg/L
C_{A0}	Concentración inicial de macromoléculas	mg/L
C_e	Concentración residual de iones de cobre en el equilibrio	mg/L
k	Constante de velocidad de reacción	min^{-1}
ρ	Densidad de lodo	g/mL
EDTA	Etilendiaminotetracético	-
NaOH	Hidróxido de sodio	-
m_{EPS}	Masa de EPS	g
$m_{EPS\text{ seca}}$	Masa de EPS liofilizada	mg
SV_{lodo}	Masa de sólido volátil del lodo inicial	g
m_f	Masa final de la probeta con agua y lodo adicionado	g
m_i	Masa inicial de la probeta con agua	g
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta	-
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Nitrato de cobre	-
M_w	Peso molecular	g/mol
PTAR	Plantas de tratamiento de Aguas Residuales	-
%L	Porcentaje de lodo	% p/p
RA	Reactivo alcalino	-
REND o R	Rendimiento de extracción de EPS	mg EPS/g SV
CER	Resinas de intercambio catiónico	-
ST	Sólidos totales	g/L
SV	Sólidos volátiles	g/L
EPS	Sustancias Poliméricas Extracelulares	-
T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
t	Tiempo de reacción	min
V_f	Volumen de agua final	mL
V_i	Volumen de agua inicial	mL
V	Volumen de la solución de cobre	L

Introducción

Junto al crecimiento urbano aumenta el volumen de aguas residuales, por lo que su tratamiento representa un desafío que ha llevado a la búsqueda de nuevas soluciones que permitan mitigar su impacto de manera más eficiente. La importancia del tratamiento de aguas residuales radica en su contribución a la mejora de la calidad del agua que se devuelve al entorno natural. En este proceso surgen los lodos sanitarios, que provienen de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y son los elementos sólidos y microorganismos separados durante el tratamiento biológico del agua residual. Estos suelen ser un problema, pues en grandes volúmenes su tratamiento, almacenamiento y transporte es costoso. La gestión y estabilización de estos lodos resulta imperativa antes de su disposición o posible reutilización. Los lodos estabilizados son denominados biosólidos y ofrecen la posibilidad de ser aprovechados con muchos beneficios, tal como la remediación de suelos, pues su alto contenido de nitrógeno y fósforo permite la adición de nutrientes, la mejora de la estructura y la capacidad de retención de agua de los suelos. No obstante, esta práctica está sujeta a exigencias y restricciones sanitarias para su manejo, principalmente por su alto contenido de patógenos, metales pesados, microplásticos y la emanación de fuertes olores (Peccia & Westerhoff, 2015). Otro uso ampliamente abordado es el proceso de digestión anaeróbica para la conversión de materia orgánica en biogás; no obstante, el digestato constituye un residuo cuya gestión y manejo representa un alto porcentaje de los costos operacionales de una PTAR, alrededor de un 40% (Cambi, 2022). Estas problemáticas presentes en los sistemas de gestión de residuos actuales abren las puertas hacia la búsqueda de prácticas más sustentables en el tratamiento de lodos provenientes de PTAR.

El crecimiento de la actividad industrial en las últimas décadas también ha llevado a un aumento significativo de liberación de iones de metales pesados a los ambientes acuático, que son altamente tóxicos y persisten en las cadenas tróficas, representando una gran amenaza para el ecosistema y la salud humana. De acuerdo a la OMS, el Cu^{2+} es el que plantea la preocupación más inmediata (Wei, 2017); por esto se ha vuelto prioridad la búsqueda de soluciones efectivas, sostenibles y económicamente viables para la remoción de estos metales. El uso de biosorbentes obtenidos a partir de lodos sanitarios para la adsorción de metales ha generado interés como una posible respuesta. En particular, interesa el uso de Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS), gracias a su bajo costo, alta eficiencia en la remoción de metales pesados y disponibilidad. Debido a sus propiedades químicas y estructurales únicas, estas sustancias son candidatas prometedoras para la remoción de metales pesados en aguas contaminadas y, por lo tanto, en la protección de los ecosistemas acuáticos.

En el ámbito de la investigación sobre las EPS, no existe una estandarización en los métodos de

extracción utilizados. Se evidencia una amplia variabilidad en los métodos utilizados hasta la fecha, donde al modificar las condiciones de extracción, es posible obtener composiciones de EPS que cumplan funciones específicas, de acuerdo con el contexto de aplicación. Por ende, se puede proponer que la elección del "mejor" método de extracción está intrínsecamente ligada al fin específico para el que se utiliza la EPS (Hong et al., 2017). Esta personalización es uno de sus principales atractivos, pues permite la creación de biopolímeros con propiedades adaptadas a diversos usos. Por ello, esta investigación se centra en optimizar la extracción de EPS provenientes de lodos sanitarios para maximizar su potencial como adsorbente de metales pesados como cobre.

En este trabajo se examinaron distintas condiciones de extracción por hidrólisis alcalina, variando la temperatura, la concentración de reactivo, el porcentaje en masa de lodo en la mezcla de lodo y reactivo y el tipo de reactivo alcalino, y se analizó el efecto de estas variables en el rendimiento de extracción y en la capacidad de adsorción de las EPS. Mediante la comprensión y análisis del proceso de extracción, la contribución de sus variables operativas, el uso del diseño experimental y el método de superficie de respuesta como técnica estadística, se buscó mejorar el rendimiento de extracción y la capacidad adsorbente de esta tecnología, lo que a su vez puede contribuir significativamente al desarrollo de soluciones ambientales más sostenibles en los procesos de gestión de la contaminación por metales pesados.

Las sustancias poliméricas extracelulares o EPS son polímeros complejos de alto peso molecular ($M_w > 10.000$) producidos por la actividad bacteriana y la adsorción de materia orgánica en las aguas residuales (Tang et al., 2021). Dichos biopolímeros se forman a partir de la síntesis biológica, hidrólisis de macromoléculas; o bien, como producto de la lisis bacteriana y son responsables de la integridad estructural y funcional de las biopelículas. Las EPS son un recurso potencial de polielectrolitos y tienen diversas aplicaciones, ya sea como alternativa a los surfactantes en la remediación de suelos para mejorar la capacidad de retención de agua, y como material para fabricar nanocompuestos que pueden emplearse para la recuperación de metales de las aguas residuales mediante biosorción (Solon et al., 2019), entre otras.

Aunque es difícil predecir su composición con exactitud, las proteínas y los carbohidratos son los componentes dominantes en las EPS (75-90%). También contienen otras macromoléculas en menor proporción, tales como lípidos, ácidos nucleicos y sustancias húmicas. La Tabla 7.1, (Ver Anexo 7.1) resume algunos rangos de composición de EPS registrados en literatura. La alta concentración de macromoléculas orgánicas naturales, convierte a las EPS en interesantes adsorbentes (Zhang et al., 2014), razón por la cual importa su estudio.

Existen diversos trabajos que demuestran la efectividad de múltiples métodos de extracción de EPS

a partir de lodos sanitarios y biopelículas, pero pocos han sido optimizados para maximizar la eficiencia de extracción. Por lo general, se utilizan métodos físicos, químicos o combinaciones de ellos para extraer EPS. Entre los métodos físicos se destaca la centrifugación a baja y alta velocidad, la agitación, la ultrasonicación y el tratamiento térmico. Los métodos químicos, por otro lado, abarcan técnicas que utilizan compuestos como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), resinas de intercambio catiónico (CER), NaOH, Na₂CO₃ y NaCl. Este estudio se centró en determinar los efectos de las variables de operación y optimizar la extracción de EPS mediante la hidrólisis alcalina (ensayando con NaOH y Na₂CO₃) sometido a calentamiento, una combinación de métodos físicos y químicos que ha demostrado una extracción eficaz de EPS. Para optimizar este proceso es importante conocer los principales factores que causan un mayor impacto en la obtención de EPS. Basado en estudios previos, se estableció que los factores más relevantes e influyentes sobre el rendimiento de extracción de las EPS a partir del contenido en sólidos volátiles de la biomasa de partida ($\text{mgTS}_{\text{EPS}}/\text{gVS}_{\text{biomasa}}$) son: pH, temperatura, porcentaje en de lodo en la mezcla de lodo y reactivo, y el tipo de reactivo alcalino utilizado. Algunas características se detallan a continuación:

- pH: puede generar importantes variaciones en la carga y la solubilidad de las sustancias. Por un lado, un pH bajo tiende a protonar grupos con cargas negativas, lo que reduce la repulsión entre las moléculas de EPS y, en algunos casos, hace que se vuelvan menos solubles. Por otro lado, un pH muy alto puede disminuir la solubilidad de las EPS cargadas positivamente. Este parámetro es controlado mediante la concentración del reactivo alcalino utilizado.
- Temperatura: al trabajar a altas temperaturas (60-80°C), se obtienen los mayores rendimientos de extracción (Bou-Sarkis et al., 2022). Además, condiciones extremas de temperatura pueden también favorecer la lisis bacteriana y disrupción de células. La literatura ha reportado que la lisis bacteriana es algo que debe ser evitado pues “contamina” la EPS (Ras et al., 2011), pero existe cierto desconocimiento general del efecto que puede tener este fenómeno en las aplicaciones específicas de EPS. En particular, no se ha reportado evidencia que demuestre que evitar la lisis celular promueva la capacidad de las EPS como adsorbente. Comte et al.(2006) abordó la distinción entre la EPS soluble y ligada, donde la segunda se obtuvo aplicando procedimientos de extracción con condiciones más agresivas que promovían la lisis celular. En cuanto a capacidad de adsorción, se observó que la EPS soluble exhibía mayor afinidad hacia los iones metálicos, aunque los rendimientos de extracción disminuían, implicando que la prevención de la lisis celular no siempre es favorable. Este escenario plantea una dicotomía que ha sido objeto de discusión en esta área ya que, debido a los retos analíticos que se enfrentan para identificar y caracterizar los EPS funcionales, se debe evaluar de manera crítica los métodos actuales de extracción y

caracterización espectrofotométrica, que a menudo evitan comprometer la integridad de las células (Seviour et al., 2019). En resumen, se debería enfocar el método de extracción de EPS en función a la aplicación final del producto.

- Tipo de reactivo alcalino: la selección de reactivo alcalino utilizado en la hidrólisis alcalina no sólo condiciona los rendimientos de extracción que se pueden alcanzar, sino que también puede influir en la estructura y propiedades de las EPS extraídas (Comte et al., 2006). Bou-Sarkis et al., (2022) comprobó que el NaOH permitió una mejor solubilización del EPS en comparación con el Na₂CO₃, pero la capacidad de precipitar EPS formadores de gel a pH ácido fue mayor en ensayos con Na₂CO₃. Estas diferencias en funcionalidad de las EPS resultan de gran interés en el presente estudio, pues se busca evaluar si condiciones de mayor extracción van necesariamente ligadas a EPS con buenas capacidades de adsorción.
- Porcentaje de lodo en la mezcla de lodo y reactivo: la búsqueda de una proporción óptima entre lodo y solución alcalina es fundamental para maximizar la extracción de EPS y aprovechar al máximo los recursos utilizados. Cuando el porcentaje de lodo en la mezcla de lodo y reactivo es el suficiente, se asegura que todo el lodo presente se solubilice, liberando así la mayor cantidad posible de EPS. Pero, si el porcentaje de lodo es muy bajo, no habrá suficiente reactivo para solubilizar el lodo presente, mientras que si es muy alta, habrá un exceso de reactivo alcalino que se traduce en un mal manejo de los recursos.

Las EPS tienen gran presencia de grupos funcionales aniónicos, como carboxilos, fosforilos, sulfhídricos, fenólicos e hidroxilos, que favorecen la adsorción de metales y sustancias orgánicas. La adsorción con EPS implica una interacción entre iones metálicos cargados positivamente y EPS cargados negativamente, donde los distintos los grupos funcionales ionizables contribuyen a la carga aniónica neta del biopolímero. Los principales mecanismos de adsorción reportados en literatura se encuentran en el Anexo 7.1.2.

Cabe destacar que los estudios existentes de optimización de parámetros relacionados con la extracción de EPS se enfocan ya sea en criterios que optimizan las condiciones para la remoción de metales pesados, o bien, en procesos de optimización de la recuperación de proteínas a partir de lodos activados. Hasta el momento, no se han realizado estudios que establezcan una relación directa entre las metodologías de extracción de EPS y la capacidad adsorbente que el producto final puede alcanzar. Por lo tanto, esta investigación se centró en relacionar ambos parámetros en la búsqueda de mejorar la obtención de extractos de EPS, que podría potencialmente convertirlo en un aporte fundamental para este campo de estudio.

Objetivos

2.1.Objetivo general

Determinar las mejores condiciones de extracción de EPS desde lodos mediante diseño experimental para maximizar el rendimiento y la capacidad adsorbente de cobre.

2.2.Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de las variables de operación en el proceso de extracción de EPS sobre la cantidad de proteínas y polisacáridos en las EPS.
- Estudiar la relación entre la composición de EPS y su capacidad de adsorción de cobre.
- Determinar las variables más influyentes sobre las respuestas (rendimiento de extracción de EPS y capacidad de adsorción de cobre) mediante la construcción de gráficas de superficie de respuesta y análisis estadístico.

Metodología

3.1. Caracterización de lodos

Todos los experimentos realizados en este estudio emplearon lodos residuales concentrados obtenidos de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) distribuidas a lo largo de toda la Región del Bío-Bío. Los lodos extraídos se sometieron a procesos previos de deshidratación y espesamiento, por lo que el lodo utilizado en este trabajo corresponde a un lodo desaguado. En el estudio de la eficiencia de las extracciones, es fundamental tener la composición inicial de la materia prima para comparar metodologías de extracción, por lo que el lodo utilizado fue sometido a una caracterización previa.

3.1.1. Determinación de densidad de lodo

En primer lugar, considerando que la densidad corresponde a la cantidad de masa en un determinado volumen, para determinar la densidad aparente del lodo en cuestión se siguió el siguiente procedimiento:

Utilizando una probeta tarada se masó (m_i), un determinado volumen inicial de agua (V_i), luego se le agregó lodo a cada una de las probetas con agua y se volvieron a masar (m_f). Finalmente, se observó la graduación de las probetas para determinar el volumen final (V_f).

Con estas variables, se determinó la densidad del lodo utilizando la Ecuación 3.1.

$$\rho = \frac{m_f - m_i}{V_f - V_i} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde ρ es la densidad en (g/mL), m_i la masa inicial de la probeta con agua (g), m_f la masa final de la probeta con agua y lodo adicionado (g), V_i es el volumen de agua inicial (mL) y V_f el volumen final luego de añadido el lodo (mL).

3.1.2. Determinación de sólidos totales (ST) y volátiles (SV)

Para determinar los sólidos totales (ST) y los sólidos volátiles (SV), se siguió la metodología estándar descrita por APHA et al. (2005). Para el análisis de ST se agregó un volumen determinado de la muestra de lodo en un crisol de porcelana limpio y seco. Luego se llevó a estufa a 105 ± 5 °C por un mínimo de dos horas, con tal de asegurarse que se llegue a una masa constante. Al ser retirado, se dejó enfriar en el desecador para luego registrar su masa. Con estos datos se calcularon los ST utilizando la Ecuación 3.2

$$\% ST(g/L) = \frac{(A - B) \cdot 1000}{C - B} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde A es la masa del residuo seco + crisol (mg), B la masa del crisol (mg) y C es la masa de la muestra húmeda + crisol (mg).

Para el análisis de SV, la muestra se calcinó a $550 \pm 50^\circ\text{C}$ por 2 horas y luego de enfriado se registró su masa final. Para determinar la cantidad de SV, se reemplazaron los datos registrados en la Ecuación 3.3.

$$\% SV(g/L) = \frac{(A - D) \cdot 1000}{A - B} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde D es la masa del residuo calcinado + crisol (g).

Los detalles del procedimiento experimental para el cálculo de ST y SV del lodo se encuentran en el Anexo 7.3.1.1.

3.2. Ajuste de cinética de hidrólisis para extracción de EPS

Antes de comenzar con los experimentos de extracción de EPS, se realizaron pruebas que permitieron estudiar la cinética que ocurre durante el proceso de la hidrólisis alcalina, con el objetivo de corroborar que su comportamiento llega a un estado estacionario y así lograr definir un tiempo de reacción adecuado que asegure la reacción completa. Para ello, se llevaron a cabo tres experimentos que permitieron estudiar tanto los efectos de la temperatura como del pH en la cinética de reacción. La Tabla 3.1 describe las condiciones de cada uno.

Tabla 3.1: Condiciones de operación para ensayos A, B y C de extracción de EPS.

Ensayo	Temperatura (°C)	Concentración reactivo alcalino (M)	Porcentaje de lodo (%) p/p	Reactivo alcalino
A	20	0,05	10	Na ₂ CO ₃
B	80	0,05	10	Na ₂ CO ₃
C	20	1	10	Na ₂ CO ₃

Para estudiar dicha cinética se cuantificaron proteínas y polisacáridos de cada ensayo, en intervalos de tiempo determinados, recolectando muestras a los 20 min, 40 min, 60 min, 120 min y 24 hrs.

Tradicionalmente, los efectos acumulativos de los diferentes procesos que tienen lugar durante la

hidrólisis son simplificados en una única cinética de primer orden para la biodegradación de los sustratos (Vavilin et al., 2008). No obstante, la tendencia de los puntos obtenidos sugiere la potencial existencia de una cinética de pseudo primer orden, por lo que se propuso el modelo empírico descrito en la Ecuación 3.4 para el ajuste de los datos experimentales.

$$C_A = C_{A0}(1 - e^{-kt}) \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde C_A es la concentración de la respectiva macromolécula en el tiempo, en mg/L, C_{A0} es la concentración inicial de macromoléculas en el lodo utilizado, en mg/L, k es la constante de velocidad de reacción, en min^{-1} y t corresponde al tiempo de reacción, en minutos.

Una reacción de este tipo en una hidrólisis implica que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración del reactante, y que a medida que aumenta el tiempo transcurrido, el término exponencial disminuye, lo que se traduce en que la reacción se aproxima hacia un estado estacionario donde la concentración sólo depende de la constante de la velocidad de reacción.

3.3. Diseño experimental

La eficiencia de extracción de EPS depende de diversos factores, que no siempre interactúan de la misma forma, por lo que es fundamental planificar una experimentación que permita recopilar los datos necesarios para el análisis estadístico de la forma más eficiente posible. El diseño experimental permite estudiar los efectos de varios factores, tanto de manera individual, como la interacción que exista entre ellos, sobre una o varias respuestas.

3.3.1. Diseño factorial completo con puntos centrales

Un diseño factorial corresponde a un diseño experimental que sirve para estudiar el efecto individual y de interacción de varios factores sobre una o varias respuestas cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, s. f.). Los factores pueden ser de tipo cualitativos o cuantitativos, y para estudiar la influencia de cada factor en la respuesta se requiere de al menos dos niveles para cada factor. Teniendo esto en cuenta, el diseño factorial completo corre aleatoriamente todas las combinaciones posibles con los niveles de factores que se están investigando mediante una matriz de diseño experimental.

Este estudio contempla un modelo de diseño factorial 2^4 con tres puntos centrales, lo que resulta en 19 experimentos que se llevaron a cabo para explicar la relación entre las variables y su respuesta. Además, el uso de un modelo de regresión permite predecir el valor de la respuesta de salida según

el valor que se le otorga a cada factor. De esta forma, el modelo de regresión utilizado describe el comportamiento tanto de las variables como sus interacciones y se representa en la Ecuación 3.5.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{14} \cdot X_1 \cdot X_4 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + \beta_{24} \cdot X_2 \cdot X_4 + \beta_{34} \cdot X_3 \cdot X_4 + \varepsilon \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde Y es la respuesta, X_1, X_2, X_3 y X_4 son variables independientes asignadas según los factores asignados en el diseño, $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}$ y β_{34} son los coeficientes de regresión del modelo y ε es el error experimental.

3.3.2. Análisis de varianza ANOVA

El análisis de varianza, conocido como ANOVA, es una técnica estadística utilizada para determinar si los efectos experimentales son lo suficientemente grandes para que garanticen diferencia a nivel proceso (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

Para este estudio se consideró un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$), lo que implica aceptar como significativo un resultado estadístico sólo si la probabilidad de que ocurra por azar es menor al 5%. Por ende, si el valor-p obtenido en el ANOVA es menor o igual a 0.05, se puede concluir con un nivel de significancia del 95% que existe una diferencia significativa entre al menos dos muestras analizadas. Por otro lado, si el valor-p es mayor a 0.05, no se tiene suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula y se considera que el resultado no es estadísticamente significativo.

3.3.3. Metodología de superficie de respuesta

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) representa un enfoque experimental y analítico que permite identificar las condiciones óptimas de operación de un proceso, es decir, aquellas que producen los valores ideales en uno o más parámetros de calidad del producto (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008). Es fundamental diferenciar entre las regiones de operabilidad y experimentación, ya que el punto óptimo que se busca podría ubicarse en cualquier parte de la región de operabilidad, sea dentro o fuera de la región experimental inicial. En situaciones donde el proceso está establecido y comprendido, es muy probable que el óptimo esté dentro de la región experimental original. Por otro lado, para procesos más nuevos y desconocidos, es probable que el punto de interés se ubique fuera de la región experimental inicial, lo que requerirá realizar experimentos secuenciales y usar técnicas analíticas adicionales.

La Figura 3.1 representa lo anterior, donde se aprecia que, para encontrar el punto óptimo, es preciso desplazar la región de análisis y correr un nuevo diseño experimental que considere dicho punto para así estudiar los efectos de la curvatura pura.

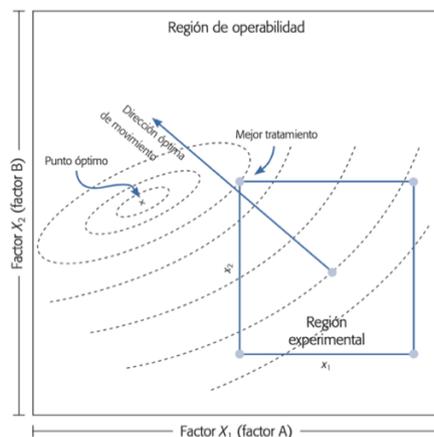


Figura 3.1: Esquema de mejor tratamiento, punto óptimo, región experimental y región de operabilidad de la MSR (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, s. f.).

Teniendo en cuenta los factores relevantes en la extracción de EPS desde lodos sanitarios y su influencia en la capacidad adsorbente, se determinó estadísticamente el nivel de impacto de cada factor estudiado sobre el producto final, para así, determinar las mejores condiciones de extracción de EPS.

Para este caso, se definieron cuatro factores relevantes en la extracción de EPS: tipo de reactivo alcalino, concentración del reactivo alcalino, temperatura y porcentaje de lodo en la mezcla de lodo y reactivo. El primero corresponde a un factor de tipo cualitativo, mientras que los demás son cuantitativos. El tiempo de reacción corresponde a una condición fija de 24 horas, tiempo que asegura una reacción de solubilización completa para todos los experimentos, lo cual es corroborado mediante el ajuste cinético. Además, se definió el dominio experimental, que consta de dos niveles para cada factor. La Tabla 3.2 detalla los niveles asignados a cada factor que consisten en los rangos que favorecen la extracción de EPS, según lo determinado por estudios previos (Espinoza, 2022).

Tabla 3.2: Rango experimental para la evaluación de factores en la optimización de extracción de EPS.

Factor	Notación	Unidad	Nivel		
			Mín (-1)	Central (0)	Máx (+1)
Reactivo alcalino	RA	-	NaOH	NaOH	Na ₂ CO ₃

Concentración de reactivo alcalino	CR	M ¹	0,05	0,525	1
Temperatura	T	°C	20	50	80
Porcentaje de lodo	%L	%p/p	10	30	50

¹ Molaridad

Con un diseño factorial 2^k no replicado de dos niveles y tres valores centrales, se obtuvieron 19 combinaciones de variables y niveles que corresponden a los experimentos evaluados aleatoriamente. Se agregaron además dos experimentos adicionales que corresponden a los puntos centrales para el segundo reactivo alcalino, Na₂CO₃, resultando en 21 experimentos totales. Se utilizó el ‘software’ de diseño de experimentos Modde 7® para realizar el análisis estadístico de datos a partir de la matriz de experimentos representada en la Tabla 7.3 (Ver Anexo 7.2). Además, se hizo un análisis de varianza y regresión para determinar la influencia de cada variable sobre la respuesta y así mejorar el proceso de extracción de EPS, según los criterios de la Tabla 7.4 (Ver Anexo 7.2).

3.4.Extracción de EPS

Existen varios métodos registrados para la extracción de EPS; sin embargo, estudios previos determinaron que la hidrólisis alcalina es el método que extrae la mayor cantidad de EPS útil para este propósito (Espinoza, 2022). Por esto es que se empleó dicho método en el presente estudio, basándose en el procedimiento planteado por Lotti et al., (2019) que consiste en cuatro etapas fundamentales de purificación posterior a la hidrólisis alcalina. Dicho procedimiento se esquematiza en la Figura 3.2 y la Figura 3.3.

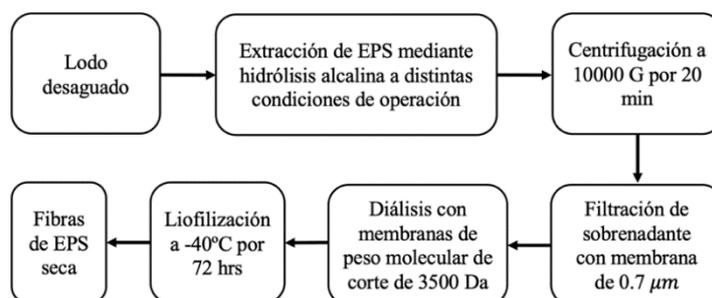


Figura 3.2: Procedimiento utilizado para extracción y purificación de EPS.

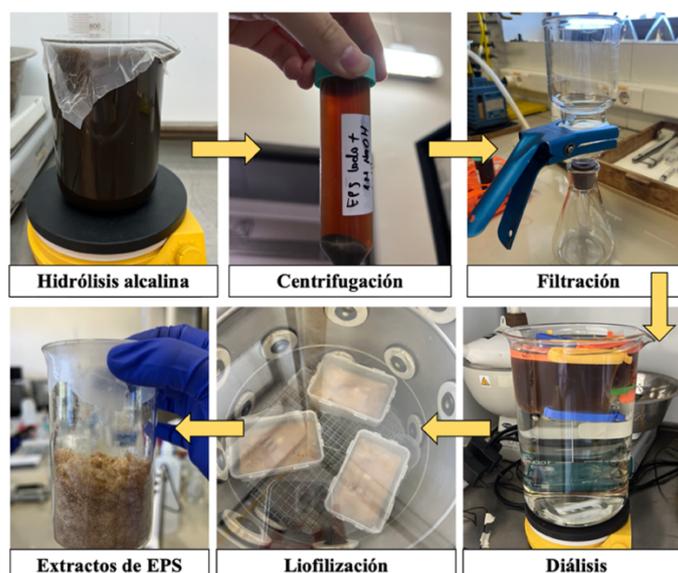


Figura 3.3: Esquema de procedimiento de extracción de EPS.

3.4.1. Hidrólisis alcalina

Para la extracción de EPS, se llevó a cabo una hidrólisis alcalina utilizando dos reactivos, pellets de NaOH de calidad de análisis y Na₂CO₃ anhídrido de calidad de análisis. Los reactivos fueron obtenidos desde *Merck Chile S.A.* Se prepararon las soluciones según la concentración, temperatura y porcentaje de lodo deseado en un vaso precipitado y se dejaron en agitación durante un periodo de 24 horas. Adicionalmente, se registró el pH de la solución utilizando un medidor de pH (*Hanna Instruments, HI2002 Edge® pH/ORP, EE.UU.*). Los detalles del procedimiento experimental para la hidrólisis alcalina se encuentran en el Anexo 7.3.2.1.

3.4.2. Centrifugación

Esta corresponde a la primera etapa de purificación para rescatar las EPS presentes en la solución hidrolizada. Para ello se trasvasijó la muestra ya hidrolizada a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 10000 G por 20 minutos (*Heraeus, Biofuge primo, Alemania*). Una vez acabado, se recolectó el sobrenadante, rico en EPS, en un vaso precipitado para luego ser llevado a las etapas posteriores.

3.4.3. Filtración

El proceso de filtrado de muestras se llevó a cabo en dos etapas, un filtrado utilizando una bomba de vacío con un filtro de fibra de vidrio de 1 μm y posteriormente con un filtro de fibra de vidrio 0,7 μm . Ambos filtros se obtuvieron desde *Merck Millipore Ltd.* Cabe destacar que los filtros se cambiaron

repetidamente por su rápida saturación.

Además, para acelerar el proceso de filtrado, en especial para los experimentos con grandes volúmenes de muestra, se utilizó en simultáneo un sistema de ultrafiltración (*Merck, Amicon® Stirred Cells, Alemania*) con filtros de fibra de vidrio de 1 μm y 0,7 μm , respectivamente.

3.4.4. Purificación mediante diálisis

Para esta etapa se utilizaron membranas de diálisis de celulosa regenerada con peso molecular de corte de 3500 Da, obtenidas desde *Merck Chile S.A.* Estas membranas permiten que las EPS se concentren dentro de ellas, mientras que el resto de los componentes de menor peso molecular se liberen debido al cambio de gradientes.

3.4.5. Liofilización

Por último, la liofilización corresponde a un proceso de deshidratación de la muestra donde, gracias al fenómeno de la sublimación, se pudo obtener un extracto de EPS seco a partir del líquido previamente purificado. La muestra dializada se traspasó a potes plásticos de 400 ml, procurando no llenarlos para incrementar la superficie de contacto, y se congelaron en un ultrafreezer (*Haier Biomedical, Congelador Biomédico de -25°C, China*). Utilizando un liofilizador (*Labconco, Freezone 6, EE.UU*) las muestras se dejaron liofilizando a -40°C por alrededor de 72 horas, o hasta obtener fibras secas de EPS.

3.5. Caracterización de EPS

La caracterización de EPS obtenidas se llevó a cabo cuantificando el contenido de proteínas y polisacáridos, mientras que para estudiar las cargas superficiales de las EPS se llevaron a cabo ensayos de potencial Z. Para todos los ensayos, se diluyeron los extractos liofilizados de EPS en agua milli-Q, asegurándose en obtener una muestra líquida homogénea para llevar a cabo los análisis a continuación.

3.5.1. Proteínas

La cantidad de proteína presente en los distintos extractos de EPS fueron medidos utilizando el Método de Bradford (Bradford, 1976). El protocolo que se siguió se encuentra detallado en el Anexo 7.3.4.

3.5.2. Polisacáridos

La cantidad de polisacáridos existentes en cada extracto de EPS fueron determinados siguiendo el método fenol-sulfúrico. El protocolo que se siguió se encuentra detallado en el Anexo 7.3.5.

3.5.3. Potencial Z

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad. Este método se usó para determinar las cargas superficiales y el punto isoelectrico para cada extracto de EPS, con el objetivo de determinar su comportamiento molecular. Para aquello, se utilizó un equipo analizador de potencial zeta (*Microtrac, Stabino Zeta Particle Charge Mapping, EE.UU.*).

3.6. Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción de EPS puede ser expresado como la razón entre la masa de EPS liofilizada ($m_{EPS\ seca}$) y los sólidos volátiles del lodo inicial a partir del cual se realizó la extracción (Lotti et al., 2019). Dicho parámetro se calcula utilizando la Ecuación 3.6.

$$R = \frac{m_{EPS\ seca}}{SV_{lodo}} \left(\frac{mg}{g} \right) \quad \text{Ecuación 3.6}$$

3.7. Adsorción de cobre

La capacidad de adsorción de cobre de la EPS extraída fue el parámetro por el cual se definió la calidad, definiendo así los mejores parámetros de extracción hacia la adsorción de este metal. Esta capacidad de adsorción del sorbato se calcula mediante diferencia de concentraciones, basada en el balance de materia. La Ecuación 3.7 describe lo anterior.

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m_{EPS}} \cdot V \left(\frac{mg\ Cu(II)\ adsorbido}{g\ EPS} \right) \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Donde Q_e ($\frac{mg}{g}$) corresponde a la masa de soluto adsorbida por unidad de masa de adsorbente, o bien, su capacidad de adsorción, C_0 ($\frac{mg}{L}$) es la concentración inicial de cobre, C_e ($\frac{mg}{L}$) la concentración residual de cobre en el equilibrio, m_{EPS} (g) es la masa del sorbente (EPS) y V (L) es el volumen de la solución.

Los ensayos de adsorción de Cu(II) se llevaron a cabo mediante el método de diálisis para ensayos

batch, planteado por Wei et al.(2017) y la solución madre estándar de Cu(II) utilizada se preparó disolviendo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en agua Milli-Q a una concentración de 50 mg/L. En concreto, se colocaron membranas de diálisis de corte de 3500 Da llenas con 20 mL EPS disueltas (250 mg/L) en matraces de 250 mL que contenían 200 mL de la solución madre preparada de Cu(II). La solución se llevó a pH 5, pues a pesar de que la adsorción aumenta con el pH, trabajar con pH superior a 5,5 lleva a la formación de precipitado que pueden inducir errores en la mediciones de capacidad de adsorción (Espinoza, 2022). Los matraces fueron luego llevados a la incubadora de agitación (*Biobase, Small Capacity Thermostatic Shaking Incubator - BJPX-N, China*) y se dejaron por 12 horas bajo agitación constante (150 rpm) a temperatura ambiente (20°C). Después de la agitación, se detectó la concentración de metales pesados dentro y fuera de la membrana de diálisis mediante absorción atómica con atomización de llama, una técnica estándar ampliamente utilizada para medición de metales a nivel de trazas. Finalmente, se calculó el contenido de metales pesados adsorbidos. El protocolo más detallado del procedimiento de adsorción se encuentra en el Anexo 7.3.3.

Resultados y discusión

4.1. Caracterización del lodo

En primer lugar, se determinó la densidad aparente del lodo utilizado siguiendo la metodología presentada en el Capítulo 3.1. Utilizando la Ecuación 3.1, los resultados obtenidos para dicho parámetro se muestran en la Tabla 7.7 (Ver Anexo 7.4.1).

Promediando los cuatro ensayos realizados, se obtuvo una densidad aparente de lodo de $1,2821 \pm 0,001$ g/mL. La densidad del lodo es muy variable y depende principalmente de su composición y procedencia, sin embargo, según lo reportado en bibliografía, la densidad de lodos desaguados va entre los 1,2 y 1,4 g/mL (Turovskiy & Mathai, 2006), por ende, el valor obtenido está dentro de los parámetros esperados.

Otro procedimiento para caracterizar el lodo utilizado en la experimentación corresponde a la determinación de sólidos totales y volátiles. Para ello se implementó el método estandarizado planteado en el Capítulo 3.1.2. La Tabla 7.8 (Ver Anexo 7.4.1) expresa el porcentaje calculado tanto para sólidos totales como volátiles.

Promediando las tres muestras medidas, se obtuvo un porcentaje de sólidos totales de 14,06% y volátiles de 9,71%. Estos resultados proporcionan información valiosa al momento de determinar los rendimientos de extracción y en la eventual optimización del proceso.

4.2. Estudio de ajuste de cinética de hidrólisis para extracción de EPS

Siguiendo la metodología detallada en el Capítulo 3.2, y teniendo en cuenta que para estudiar la cinética de la hidrólisis se utilizaron las técnicas de Bradford y el método fenol-sulfúrico, para la cuantificación de proteínas y polisacáridos, respectivamente, se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Figura 4.1 se observa el ajuste de los tres ensayos al modelo planteado de cinética de pseudo primer orden, tanto para proteínas (a) como polisacáridos (b). Se determinó que las EPS se solubilizan aceleradamente durante las primeras 4 horas (240 min) para luego alcanzar una concentración máxima en su estado estacionario. Esto permitió comprobar que el tiempo puede ser omitido como variable en el diseño experimental, al dejar las muestras la suficiente cantidad de tiempo donde se alcance el máximo nivel de solubilización.

Por otro lado, el comportamiento del ensayo B revela que el incremento de temperatura genera un

aumento significativo en la cantidad de macromoléculas cuantificadas, lo cual puede ser un indicio de una degradación de macromoléculas de mayor peso molecular. No obstante, también presentan una mayor dispersión de datos, que puede deberse a la alta heterogeneidad del lodo inicial. El efecto del incremento de pH se evidencia al comparar los ensayos A y C, donde es evidente que el ensayo que trabaja a concentraciones más altas de reactivo alcalino (Ensayo C), induce a una mayor cuantificación de macromoléculas en la EPS. Ruiz-Hernando et al., (2015), descubrió que el tratamiento alcalino solubilizó las proteínas de alto peso molecular, mientras que el tratamiento térmico las desnaturalizó, hallazgos que sugieren que tratamiento térmico y alcalino pueden alterar la distribución del peso molecular de las EPS. A pesar de que estos ajustes permitieron definir la tendencia de la solubilización en el tiempo, resultaría interesante estudiar y cuantificar la posible degradación de las macromoléculas y los efectos que puede tener sobre la cinética de la hidrólisis.

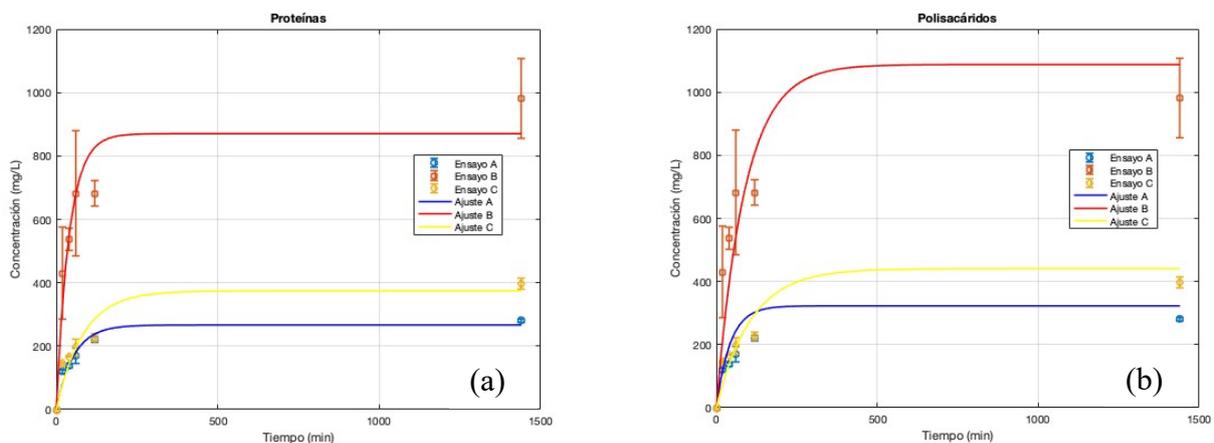


Figura 4.1: (a) Ajuste de datos experimentales de cuantificación de proteínas para los ensayos A, B, y C a modelo cinético de pseudo primer orden para concentraciones iniciales de proteína de 194 mg/L (b) Ajuste de datos experimentales de cuantificación de polisacáridos para los ensayos A, B, y C a modelo cinético de pseudo primer orden para concentraciones iniciales de polisacáridos de 124 mg/L. Ensayo A: 20°C, 10% lodo y Na_2CO_3 0,05M; Ensayo B: 80°C, 10% lodo y Na_2CO_3 0,05M; Ensayo C: 20°C, 10% lodo y Na_2CO_3 1M.

4.3. Caracterización de EPS

4.3.1. Proteínas y polisacáridos

En base a la cuantificación de proteínas y polisacáridos de los extractos de EPS mostrada en la Figura 4.2, las condiciones de extracción para el experimento 12 obtienen un mayor porcentaje de estas macromoléculas sobre el total de la masa de EPS, con un 50% de la EPS contenida por proteínas y polisacáridos de alto peso molecular restantes luego de la purificación. Las condiciones de operación utilizadas en dicho ensayo corresponden a una temperatura de 80°C, 10% p/p de lodo y el

reactivo alcalino utilizado fue Na_2CO_3 a 1M. Mientras que, el experimento 14 es el que obtuvo menores porcentajes, con 21% de proteínas y polisacáridos contenidas en la masa total de la EPS liofilizada. Las condiciones de operación de ésta última corresponden a una temperatura de 80°C , 50% p/p de lodo y el reactivo alcalino utilizado fue Na_2CO_3 a 0,05M. Se evidencia el efecto que tiene el pH en la solubilización de la matriz de EPS, pues los experimentos con mayor alcalinidad extraen un mayor porcentaje de proteínas de mayor peso molecular. Esto se puede atribuir a que un pH más elevado induce una mayor carga negativa de las cadenas de aminoácidos ácidos que favorece la repulsión entre moléculas. Dicha repulsión potencia las interacciones proteína-agua, contribuyendo a la mejora de la solubilidad de las proteínas (Bou-Sarkis et al., 2022).

Se aprecia que, en la mayoría de los experimentos, el contenido de proteínas es el más alto, lo cual es consistente con lo mostrado por una serie de estudios que involucran extracción de EPS desde lodos sanitarios (Wei et al., 2017).

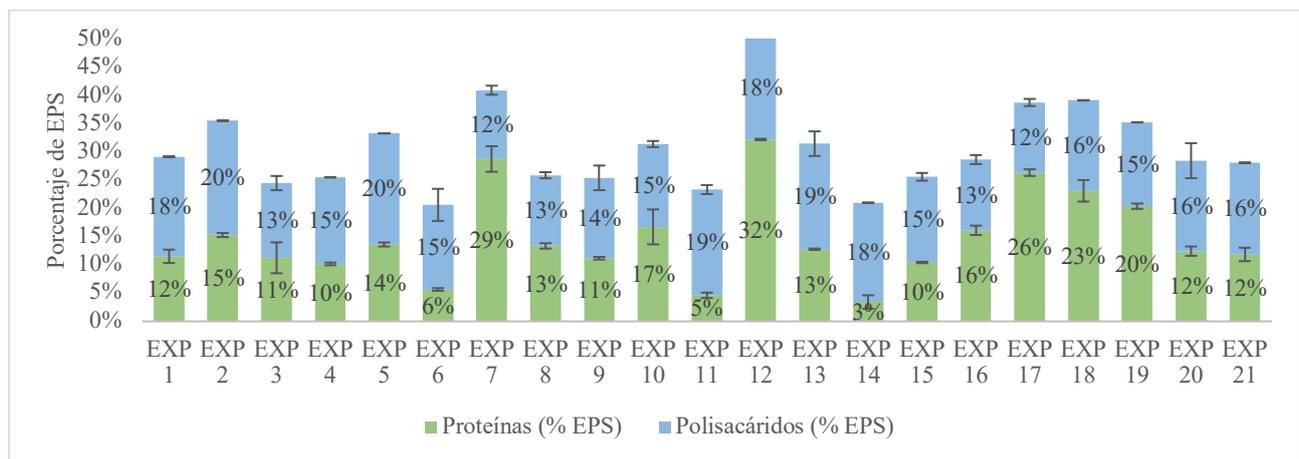


Figura 4.2: Porcentajes de proteínas y polisacáridos sobre la masa total de EPS para cada extracto. Variables de operación para cada experimento: **Exp 1:** 20°C , 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 2:** 80°C , 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 3:** 20°C , 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 4:** 80°C , 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 5:** 20°C , 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 6:** 80°C , 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 7:** 20°C , 10% lodo, NaOH 1M; **Exp 8:** 80°C , 10% lodo; NaOH 1M; **Exp 9:** 20°C , 50% lodo, Na_2CO_3 0,05M; **Exp 10:** 80°C , 50% lodo; Na_2CO_3 0,05M; **Exp 11:** 20°C , 50% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 12:** 80°C , 50% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 13:** 20°C , 10% lodo; Na_2CO_3 0,05M; **Exp 14:** 80°C , 10% lodo, Na_2CO_3 0,05M; **Exp 15:** 20°C , 10% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 16:** 80°C , 10% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 17:** 50°C , 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 18:** 50°C , 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 19:** 50°C , 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 20:** 50°C , 30% lodo, Na_2CO_3 0,525M; **Exp 21:** 50°C , 30% lodo, Na_2CO_3 0,525M.

Estos resultados inciden directamente en la pureza de los extractos de EPS, pero no permiten definir el porcentaje de EPS extraída desde el lodo inicial. Por ende, para evaluar cada experimento en términos de eficiencia de extracción de macromoléculas, se observó el contenido de proteínas y polisacáridos extraído por cada experimento con respecto a la cantidad inicial de estas

macromoléculas presentes en el lodo inicial (Figura 4.3), obteniendo los mejores resultados en el experimento 3, con condiciones de temperatura de 20°C, 10% p/p de lodo y utilizando NaOH 1M. Se observa que los experimentos bajo condiciones agresivas resultan en menos contenido de proteínas y polisacáridos y, por ende, una menor cantidad de EPS. Esto puede deberse a la alta degradación de macromoléculas provocada y la consecuente eliminación de las EPS de menor peso molecular en las etapas de purificación.

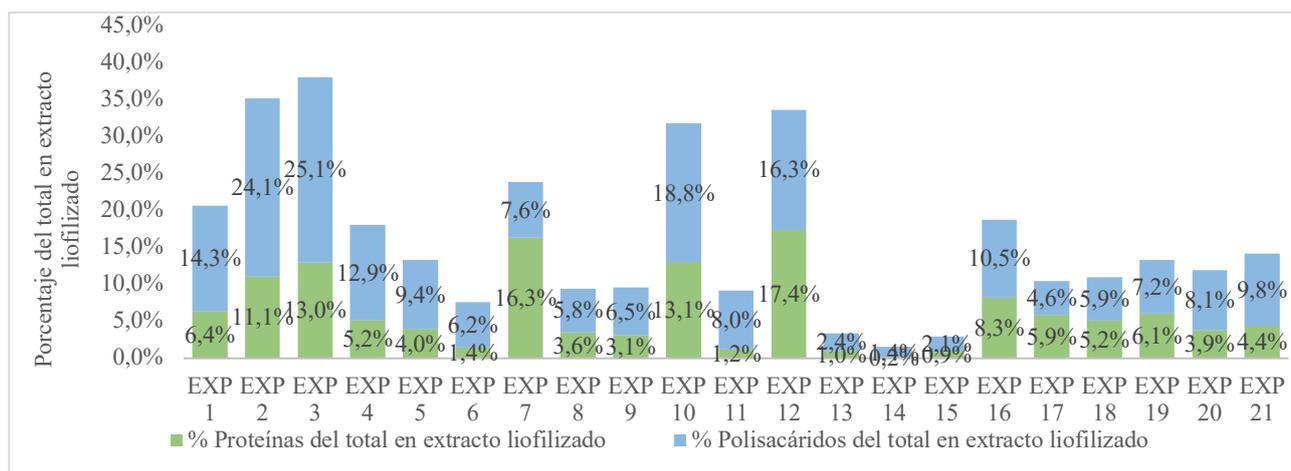


Figura 4.3: Porcentaje dentro del rango de pesos moleculares mayores a 3500 Da de proteínas y polisacáridos del total en extracto liofilizado para cada experimento. Variables de operación para cada experimento: **Exp 1:** 20°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 2:** 80°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 3:** 20°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 4:** 80°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 5:** 20°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 6:** 80°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 7:** 20°C, 10% lodo, NaOH 1M; **Exp 8:** 80°C, 10% lodo; NaOH 1M; **Exp 9:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 10:** 80°C, 50% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 11:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 12:** 80°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 13:** 20°C, 10% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 14:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 15:** 20°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 16:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 17:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 18:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 19:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 20:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M; **Exp 21:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M.

El tratamiento alcalino inducido con altas temperaturas ioniza los grupos funcionales comunes en los componentes del EPS, como lo son los grupos amino de las proteínas y los grupos carboxílicos de los polisacáridos. Esto no solo puede desestabilizar la matriz de EPS e inducir fragmentación, pero también puede causar la lisis de la membrana celular y la fuga de sustancias celulares internas, resultando en una alta degradación de las moléculas presentes en la EPS (Hong et al., 2017).

Por el proceso de diálisis utilizado para purificar los extractos de EPS, los componentes finales sólo representan aquellos con pesos moleculares mayores a 3500 Da, por lo que proteínas y polisacáridos altamente degradados no pudieron apreciarse en las mediciones, pues se perdieron en los procesos de purificación. Wu et al. (2021) comprobó que la composición del EPS cambiaba después de la diálisis porque el EPS crudo perdía las moléculas pequeñas de proteínas y polisacáridos durante esta etapa.

Específicamente, estos autores estimaron que las proteínas, polisacáridos y ADN disminuyeron en un 39,3%, 39,2% y 16,2%, respectivamente, luego de la purificación. Por ende, aquellos experimentos que combinan las condiciones más agresivas para cada variable operativa tienen menor rendimiento (relativo) de EPS. Por ejemplo, en el experimento 8, que operó a temperatura de 80°C, 50% p/p de lodo y utilizó NaOH 1M, se cuantificó tan solo un 3,6% de proteínas y un 5,8% de polisacáridos luego de la purificación; estos resultados pueden llevar a la conclusión errónea de que condiciones extremas de reacción reducen el rendimiento de EPS cuando en realidad se está perdiendo gran cantidad de moléculas pequeñas en la fracción descartada del proceso de purificación. Si bien es complejo notar la tendencia de los datos por las interacciones entre variables, es evidente que las condiciones moderadas corresponden a las mejores para extraer EPS.

4.3.2. Potencial Z

El punto isoeléctrico corresponde al pH que alcanza la solución en la que la carga neta de la EPS es cero. Si el pH se encuentra por encima del punto isoeléctrico, la carga superficial de la EPS es aniónica, dado que tiene predominancia de grupos cargados negativamente, y, por tanto, las moléculas de carga similar mostrarán fuerzas de repulsión. Caso contrario, cuando el pH de la solución es inferior a su punto isoeléctrico, la carga superficial de la EPS es catiónica, por lo que predominan los grupos cargados positivamente en la superficie de la EPS.

Tabla 4.1: Punto isoeléctrico de cada extracto obtenido.

Experimento	Punto isoeléctrico	Experimento	Punto isoeléctrico
EXP 1	1,90	EXP 12	1,85
EXP 2	1,95	EXP 13	1,83
EXP 3	2,05	EXP 14	1,48
EXP 4	2,00	EXP 15	2,25
EXP 5	1,98	EXP 16	2,05
EXP 6	1,85	EXP 17	2,70
EXP 7	2,28	EXP 18	1,65
EXP 8	2,20	EXP 19	2,35
EXP 9	1,78	EXP 20	1,80
EXP 10	2,05	EXP 21	1,55
EXP 11	1,73		

En este caso, dado que las adsorciones fueron realizadas bajo pH 5, todos los experimentos que se llevaron cabo demuestran un comportamiento aniónico ($pI < pH$ solución), lo que favorece la interacción con cationes metálicos mediante interacciones electrostáticas en los procesos de adsorción. A mayores valores de pH, dado que la superficie de la EPS se carga negativamente, se

incrementa la capacidad de la EPS de interactuar con metales pesados cargados positivamente, como lo es el Cu^{2+} .

Este ensayo buscó comprender cuáles son los mecanismos que predominan en el proceso de adsorción utilizando las EPS extraídas. No obstante, observando los datos y comparando con las capacidades de adsorción obtenidas para cada extracto, no se cumple la tendencia de que los extractos con cargas superficiales más aniónicas adsorben mayores concentraciones de cobre. Esto lleva a la suposición de que deben coexistir más de un mecanismo que colaboran en el proceso de adsorción, requiriendo de una investigación más profunda para explicarlo. Este resultado va de acuerdo con lo reportado en literatura, pues debido a la gran diversidad y complejidad de la composición de las EPS, en los nichos prácticos suelen darse simultáneamente múltiples mecanismos de adsorción (W. W. Li & Yu, 2014). Algunos autores plantean que el mecanismo de adsorción implica una combinación de interacción electrostática, intercambio iónico, complejación y precipitación (Pagliaccia et al., 2022).

4.4. Rendimiento de extracción de EPS

El rendimiento de extracción de las EPS obtenidas se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 3.6 y por medio de la Ecuación 3.6.

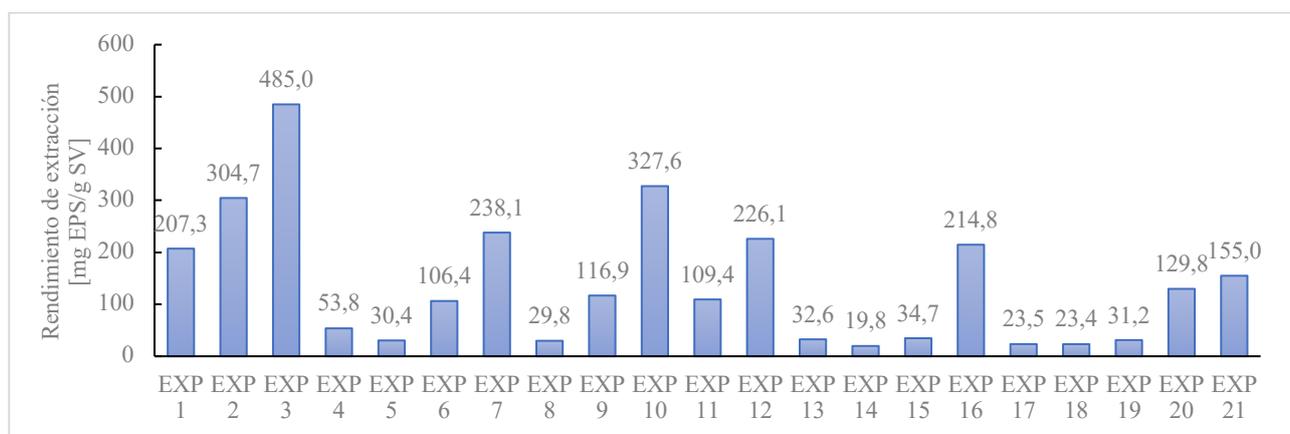


Figura 4.4: Rendimientos de extracción de los 21 experimentos realizados. Variables de operación para cada experimento: **Exp 1:** 20°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 2:** 80°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 3:** 20°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 4:** 80°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 5:** 20°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 6:** 80°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 7:** 20°C, 10% lodo, NaOH 1M; **Exp 8:** 80°C, 10% lodo; NaOH 1M; **Exp 9:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 10:** 80°C, 50% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 11:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 12:** 80°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 13:** 20°C, 10% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 14:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 15:** 20°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 16:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 17:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 18:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 19:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 20:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M; **Exp 21:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M.

La Figura 4.4 compara los resultados del rendimiento de extracción, donde se observa que el experimento 3 obtuvo el mayor rendimiento de extracción a 20°C, 10% p/p de lodo y NaOH a 1M ; en este se cuantificó la mayor cantidad de proteínas y polisacáridos desde el lodo inicial. Estas observaciones hacen suponer que la hidrólisis moderada no deteriora la estructura macromolecular de la EPS evitando la eliminación de macromoléculas aptas para la adsorción durante la etapa de purificación.

Adicionalmente, la Tabla 4.2 comprara los resultados del rendimiento de extracción obtenidos mediante diversos métodos, donde se destaca que las mejores condiciones de rendimiento obtenidas son mayores que las obtenido por estudios que utilizaron los mismos métodos de extracción, como el de Hong et al. (2017); el cual también comprobó que dicha metodología obtiene los mayores niveles de lisis celular, que puede resultar en una sobreestimación de EPS debido a posibles fugas de compuestos intracelulares, dependiendo siempre de la aplicación que se le quiera dar al producto. Para determinar si la lisis celular interfiere en los resultados obtenidos de rendimientos de extracción, resultaría interesante estudiar la cuantificación del contenido de ADN en el extracto, pues un menor contenido de ADN presente en la EPS es indicio de baja lisis celular (Hong et al., 2017).

Se evidencia que los valores de rendimiento se encuentran dentro de los rangos obtenidos por los diversos métodos de extracción, en particular los correspondientes a métodos físico-químicos. Los resultados demuestran que la hidrólisis alcalina es un método eficiente para extraer EPS, si se realiza bajo las condiciones correctas. Se sugiere estudiar el efecto de la diálisis para comprobar su efecto en el rendimiento de extracción y capacidad adsorbente de las EPS, basándose en el postulado que las moléculas de menor tamaño también podrían ser aprovechadas en el proceso.

Tabla 4.2: Rendimientos de extracción de EPS reportados en literatura distribuidos según el método de extracción utilizado.

Método de extracción	Rendimiento de extracción (mg/g SV)	Referencia
Formaldehído/NaOH	164	(Hong et al., 2017)
	165	(Liu & Fang, 2002)
	198	(Guibaud et al., 2005)
	120	(Domínguez et al., 2010)
CER	51	(Hong et al., 2017)
	58	(Liu & Fang, 2002)
	198	(Guibaud et al., 2005)

	120	(Domínguez et al., 2010)
NaOH + calor	421 (@ 80°C)	(Hong et al., 2017)
Calor	57	(Guibaud et al., 2005)
	39	(Domínguez et al., 2010)
	58 (@ 80°C)	(Liu & Fang, 2002)
Sonificación	172	(Hong et al., 2017)
	26	(Guibaud et al., 2005)

4.5. Capacidad adsorbente de los extractos de EPS

La capacidad de adsorción de los extractos obtenidos permitió completar el segundo objetivo específico del estudio, pues permite relacionar de manera directa los efectos que tiene la composición de las EPS sobre la capacidad de adsorción de metales y, por ende, la calidad del producto. Figura 4.5 desprende los resultados de los ensayos de adsorción en una solución conocida de Cu^{2+} .

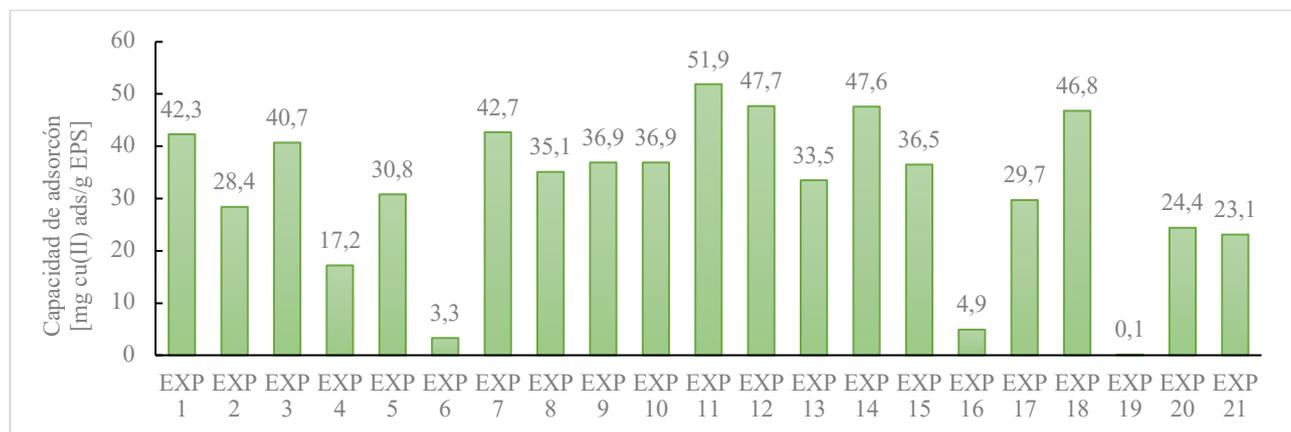


Figura 4.5: Capacidades de adsorción para cada extracto de EPS. Variables de operación para cada experimento: **Exp 1:** 20°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 2:** 80°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 3:** 20°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 4:** 80°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 5:** 20°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 6:** 80°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 7:** 20°C, 10% lodo, NaOH 1M; **Exp 8:** 80°C, 10% lodo; NaOH 1M; **Exp 9:** 20°C, 50% lodo, Na_2CO_3 0,05M; **Exp 10:** 80°C, 50% lodo; Na_2CO_3 0,05M; **Exp 11:** 20°C, 50% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 12:** 80°C, 50% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 13:** 20°C, 10% lodo; Na_2CO_3 0,05M; **Exp 14:** 80°C, 10% lodo, Na_2CO_3 0,05M; **Exp 15:** 20°C, 10% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 16:** 80°C, 10% lodo, Na_2CO_3 1M; **Exp 17:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 18:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 19:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 20:** 50°C, 30% lodo, Na_2CO_3 0,525M; **Exp 21:** 50°C, 30% lodo, Na_2CO_3 0,525M.

Analizando las capacidades de adsorción de cada extracto se destaca que los experimentos con Na_2CO_3 obtienen los mejores resultados, en comparación con los que utilizaron NaOH. Los experimentos 11, 12 y 14 son los que demuestran capacidades de adsorción por sobre los 47 mg Cu ads/g EPS, indicando que el Na_2CO_3 puede ser más selectivo en la obtención de componentes que benefician la adsorción de Cu(II) en comparación con NaOH. Se propone que la menor alcalinidad

permite preservar mejor la integridad estructural de las macromoléculas que componen las EPS durante la extracción, manteniendo así la actividad de los grupos funcionales en su superficie, lo que favorece la adsorción de iones metálicos (Li et al., 2022). Para comprobar dicha integridad y evaluar los niveles de actividad de los grupos funcionales, se sugiere la realización de ensayos FTIR para estudiar el efecto de la composición de la superficie en la adsorción de metales. Además, se propone evaluar la presencia de metales alcalinotérreos, tales como Na, K, o Mg unidos a la EPS, pues pueden interferir en las mediciones de la capacidad de adsorción debido a una competencia por los sitios activos entre esos metales y el cobre (Wu et al., 2021).

Jin et al. (2014). reporta que las EPS que contienen proteínas tienen grupos funcionales más abundantes, como los grupos amino y carboxilo, que favorecen la adsorción de iones metálicos. Por lo tanto, se postula que establecer condiciones de extracción de EPS con mayor cantidad de proteínas puede favorecer la adsorción de iones metálicos en una producción masiva.

Debido a la importancia de determinar la interacción entre los métodos de extracción y su influencia en los rendimientos de adsorción de cobre, se determinó una variable de rendimiento global que evalúa ambos parámetros para proponer una condición favorable. Para obtener este parámetro, se multiplicaron ambas respuestas con tal de representar la cantidad de cobre que ha logrado adsorber la EPS.

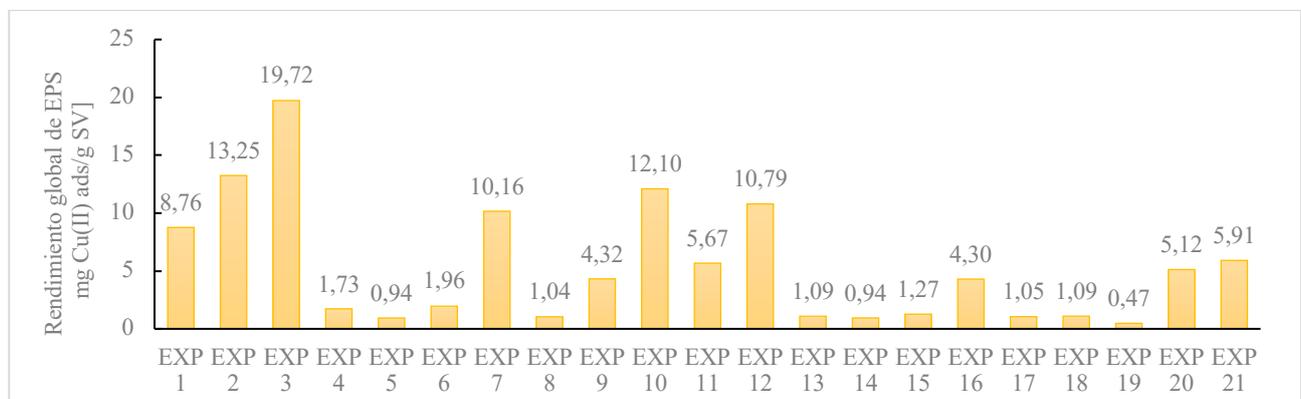


Figura 4.6: Rendimiento global de extracción para los 21 experimentos. Variables de operación para cada experimento: **Exp 1:** 20°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 2:** 80°C, 50% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 3:** 20°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 4:** 80°C, 50% lodo, NaOH 1M; **Exp 5:** 20°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 6:** 80°C, 10% lodo, NaOH 0,05M; **Exp 7:** 20°C, 10% lodo, NaOH 1M; **Exp 8:** 80°C, 10% lodo; NaOH 1M; **Exp 9:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 10:** 80°C, 50% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 11:** 20°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 12:** 80°C, 50% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 13:** 20°C, 10% lodo; Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 14:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 0,05M; **Exp 15:** 20°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 16:** 80°C, 10% lodo, Na₂CO₃ 1M; **Exp 17:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 18:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 19:** 50°C, 30% lodo, NaOH 0,525M; **Exp 20:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M; **Exp 21:** 50°C, 30% lodo, Na₂CO₃ 0,525M.

Así, se aprecia que el experimento 3 obtiene los mejores resultados en términos de eficiencia de extracción de EPS y adsorción de cobre, el cual se llevó a cabo a 20°C, 10% p/p de lodo y utilizando NaOH 1M. Este ensayo no solo obtiene altas eficiencias en la remoción de cobre, sino que también obtiene un buen rendimiento de extracción. En la sección a continuación se validó mediante análisis estadístico si dicha condición corresponde al mejor punto dentro del rango experimental.

4.6. Análisis estadístico de experimentos

Los resultados obtenidos, si bien ofrecen información valiosa, no son suficientes para llegar a una conclusión definitiva o determinar la existencia de un punto óptimo. Es por ello que se llevó a cabo la metodología de superficie de respuesta que consideró todas las variables de operación relevantes y analizó sus posibles interacciones. Este enfoque permitió una evaluación más rigurosa y una identificación más precisa de las condiciones óptimas, o bien, de las tendencias que optimicen los resultados. En primer lugar, se llevó a cabo el análisis estadístico considerando todas las variables y sus interacciones para dos respuestas, el rendimiento de extracción y la capacidad de adsorción.

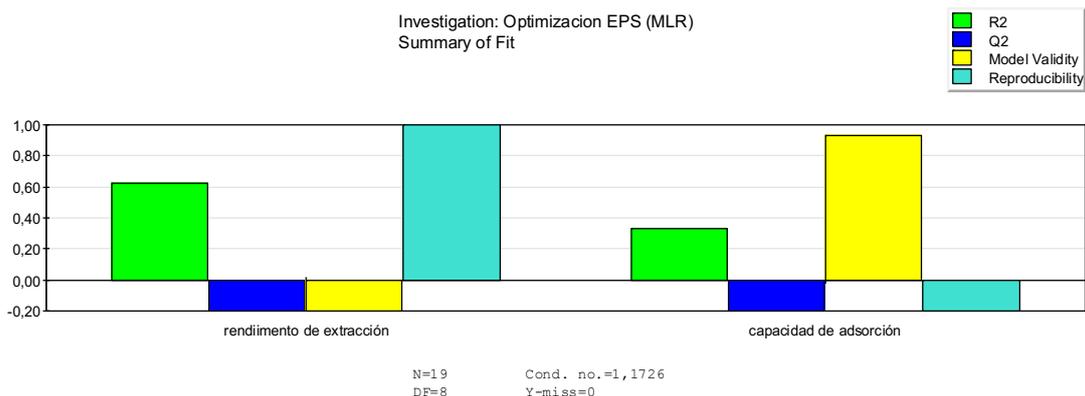


Figura 4.7: Resumen de ajuste para las respuestas de rendimiento de extracción y capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7)

La Figura 4.7 resume el ajuste del modelo analizado, donde se aprecian cuatro parámetros relevantes para cada respuesta estudiada: R^2 , Q^2 ; validez del modelo (Model Validity) y la reproducibilidad (Reproducibility); las cuales se encuentran definidas en el Anexo 7.1.3.1. Al analizar el rendimiento de extracción, se observa que el R^2 es más alto y la reproducibilidad del modelo es buena, indicando que modelo se ajusta bien a los datos; sin embargo, un R^2 elevado no significa que necesariamente el modelo sea bueno, considerando que Q^2 y la validez del modelo son negativos. Cuando la validez del modelo es inferior a 0,25 implica que el error del modelo es significativamente mayor que el error puro, por lo tanto, se recomienda eliminar términos insignificantes para mejorar la validez. En este caso, la reproducibilidad del modelo es 1, lo que indica que el error puro es 0; es decir, que a las

mismas condiciones las respuestas son idénticas, pero esto probablemente no es representativo del verdadero error.

Por otro lado, la respuesta de capacidad de adsorción muestra una validez de modelo alta y un R^2 moderado, pero el Q^2 y la reproducibilidad son negativas. En casos como estos, un Q^2 bajo suele deberse a términos insignificantes en el modelo. Además, que la reproducibilidad sea inferior a 0,5 significa que el error puro es grande, el nivel de ruido es alto y no se puede evaluar la validez del modelo. Esto se traduce en valores de R^2 y Q^2 bajos, por lo que se debería buscar mejorar la reproducibilidad.

Considerando lo anterior, para obtener superficies de respuesta estadísticamente válidas para cada respuesta fue necesario ajustar el diseño experimental de acuerdo con siguientes tres parámetros:

- Comprobación de mejor transformación de la respuesta: en el caso que los valores de respuesta varíen de orden de magnitud, es recomendable realizar una transformación de potencia de Y (respuesta). En el caso de detectar necesidad de una transformación, el gráfico Box Cox determina la mejor transformación para la respuesta.
- Significancia de las variables y sus interacciones sobre la respuesta: para mejorar el Q^2 y la validez del modelo, es recomendable eliminar los términos menos significantes. Esto se puede verificar visualizando las gráficas de coeficientes de regresión (MLR).
- Detección de valores atípicos en el modelo: detectar valores atípicos y evaluar la normalidad de los residuos en el modelo es fundamental para mejorar su validez estadística. Estos se pueden detectar mediante el Diagrama de Probabilidad Normal de los Residuos o mediante la Gráfica de Observación vs Predicción de la respuesta, donde los valores alejados de la línea de regresión corresponden a valores atípicos que pueden ser eliminados (Modde 7 ®, s.f).

4.6.1. Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción

Realizando los ajustes necesarios, detallados en el Anexo 7.5.1, se aprecia una mejora significativa en los parámetros de ajuste, tal como se muestra en la Figura 4.8. Además, el ANOVA verifica que el modelo es estadísticamente válido, obteniendo un valor-p de 0,001, que indica que la probabilidad de regresión es significativa al 95%.

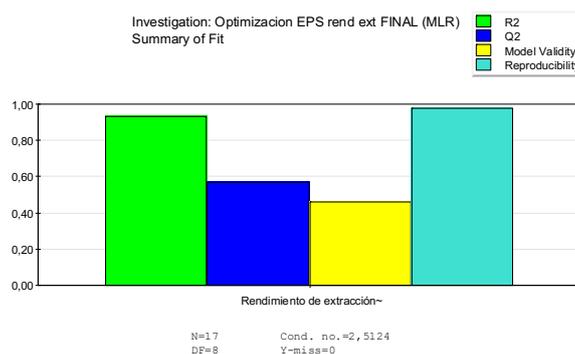


Figura 4.8: Resumen de ajuste del modelo modificado para el rendimiento de extracción de EPS. (Fuente: Modde 7).

Las variaciones en dos de las variables independientes están representadas en los ejes X e Y, mientras que la variable dependiente se presenta en el eje Z de las graficas. Los cambios en los colores y contornos de la superficie revelan cómo las interacciones entre las variables afectan la respuesta. Áreas mas elevadas y con colores más cálidos de la superficie indican resultados mas favorables de la respuesta, mientras que las áreas más bajas y de colores fríos representan resultados menos deseables.

Los efectos de las variables y sus interacciones en el rendimiento de extracción se encuentran esquematizados en el conjunto de superficies presentadas en la Figura 4.9 y Figura 4.10 considerando los experimentos que utilizaron NaOH y Na₂CO₃, respectivamente.

Para los casos en que se utilizó NaOH como reactivo, se detecta una curvatura que indica la existencia de un punto mínimo cercano a los rangos de la región experimental. Sin embargo, para la determinación de un punto máximo no se detecta curvatura alguna. La Figura 4.9 (a) encuentra el mayor valor de rendimiento (340 mg EPS/g SV) a condiciones mínimas de temperatura (20°C) y máximas de concentración de reactivo (1M). Además, se aprecia la gran influencia que tiene la temperatura en la respuesta, notando además que a temperaturas mayores a 65°C, el rendimiento de extracción de EPS es casi nulo. La Figura 4.9 (b) alcanza el mayor valor de la respuesta (280 mg EPS/g SV) a temperaturas muy cercanas a los 20°C y con 10% p/p de lodo. También se aprecia que la temperatura tiene mayor influencia en la respuesta que el porcentaje de lodo, pues el rendimiento de extracción se reduce en gran medida con el aumento de la temperatura. Por último, la Figura 4.9 (c) detecta que el valor más alto para la respuesta dentro de los rangos estudiados (140 mg EPS/g SV) se encuentra a condiciones altas de concentración de reactivo (1M) y a bajos porcentajes de lodo (10% p/p). No obstante, la superficie indica mayor influencia de la concentración de reactivo sobre la respuesta, pues esta es más susceptible a cambios tras pequeñas variaciones en dicho parametro.

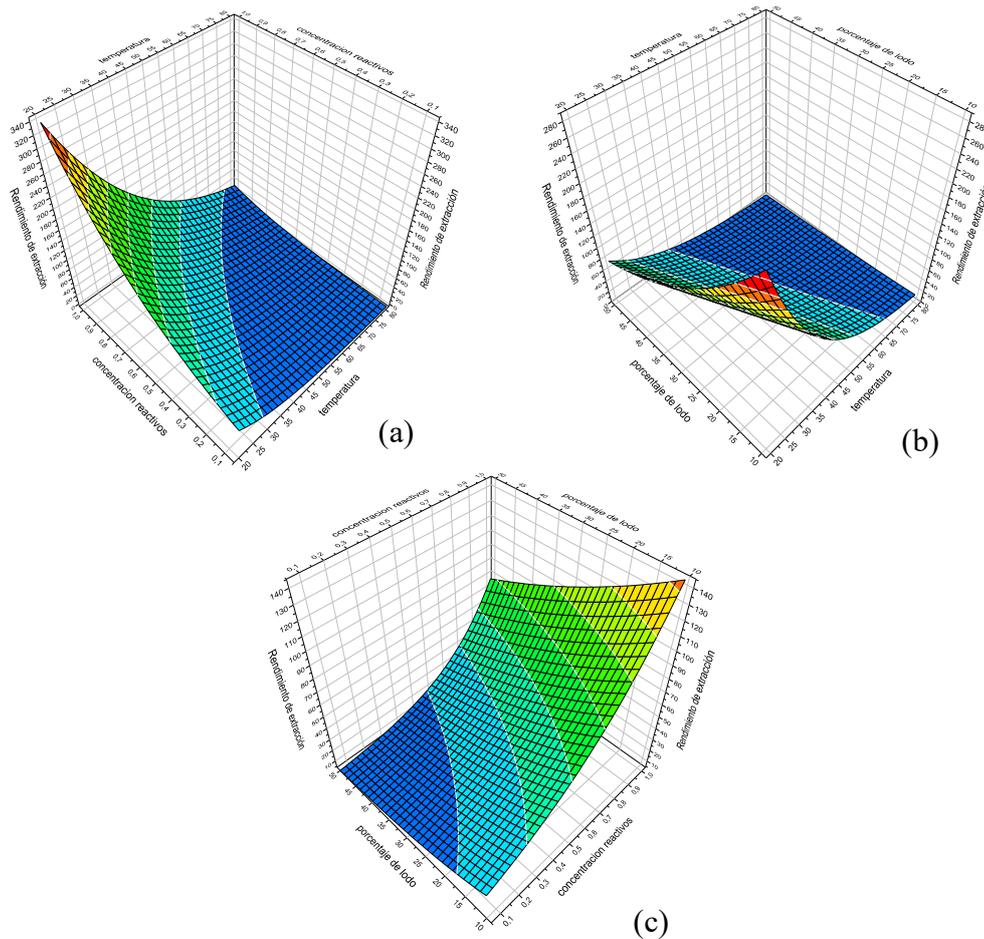


Figura 4.9: Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs Temperatura para NaOH con 30% de lodo. (Fuente: Modde 7).

Por otro lado, analizando las mismas superficies de respuesta considerando los experimentos en los que se trabajó con Na_2CO_3 , mostradas en la Figura 4.10, se aprecia que la curvatura provocada posee una tendencia similar.

La Figura 4.10 (a) muestra que ambas variables son directamente proporcionales a la respuesta pero no se visualiza una influencia significativa entre variables sobre la respuesta, es decir al variar cualquiera de las variables, el efecto sobre la respuesta es proporcional. Los parámetros que obtuvieron un mayor rendimiento (240 mg EPS/g SV) fueron a 80°C y concentración de reactivo de 1M. La Figura 4.10 (b) representa la influencia de la temperatura y el porcentaje de lodo, donde se aprecia que la respuesta aumenta conforme aumenta la temperatura, pero disminuye al incrementar el porcentaje de lodos. Se aprecia una mayor influencia por parte del porcentaje de lodo que por la temperatura y el punto de mejor tratamiento para obtener mayor rendimiento de extracción (260 mg EPS/g SV) se delimita para temperaturas de 80°C y 10% p/p de lodo. La Figura 4.10 (c) exhibe la

baja influencia que tiene la concentración de reactivo comparado con la influencia del porcentaje de lodo. Se aprecia que las condiciones que obtiene un mejor rendimiento (190 mg EPS/g SV) son a concentración de reactivo de 0,1M y 10% p/p de lodo.

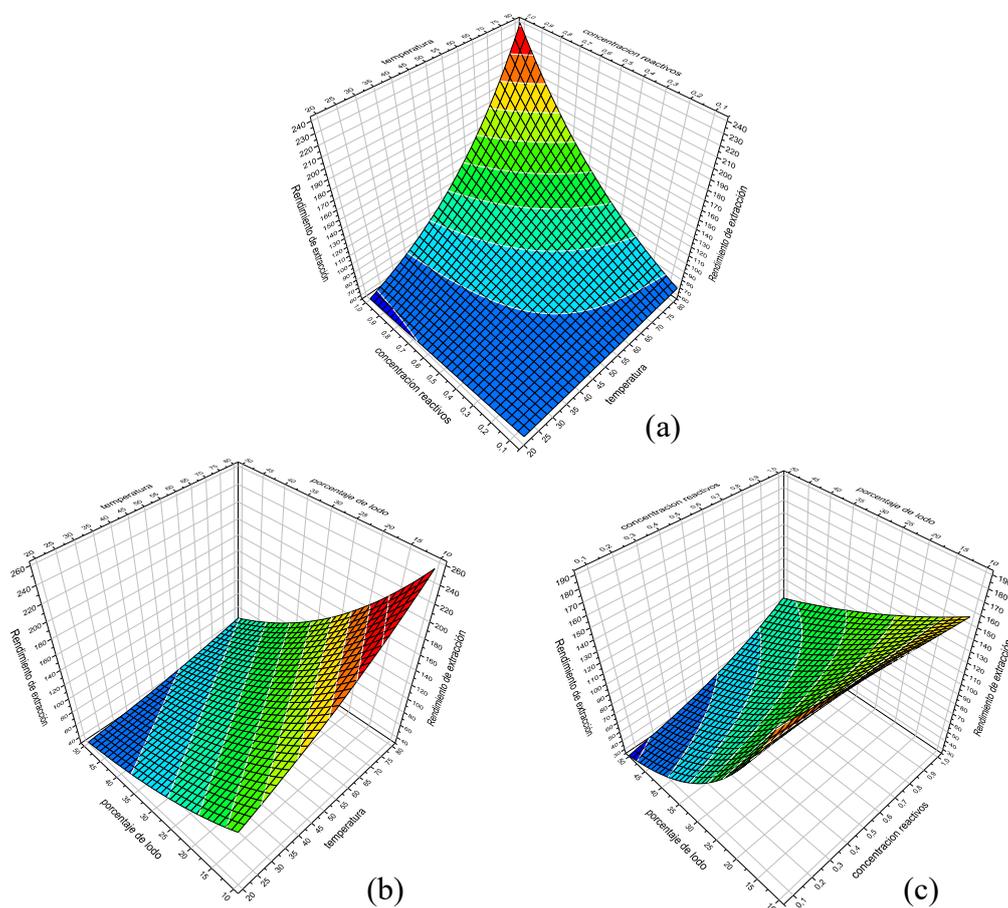


Figura 4.10: Superficies de respuesta para el rendimiento de extracción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para Na_2CO_3 con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para Na_2CO_3 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs porcentaje de lodo para Na_2CO_3 a 50°C. (Fuente: Modde 7).

En resumen, las superficies de respuesta para el rendimiento de extracción determinan lo siguiente:

- No se encontró un punto óptimo para esta respuesta dentro de los parámetros estudiados, más bien se presentan superficies planas que indican una condición de mejor tratamiento, donde se maximiza el rendimiento de extracción a condiciones mínimas de temperatura (20°C), máximas de concentración de reactivo (1M) y mínimas de porcentaje de lodo (10% p/p). Analizando las superficies, el modelo recomienda evaluar nuevas regiones considerando menores temperaturas, mayores concentraciones de reactivo y menor porcentaje de lodo.
- Las variables que tienen una mayor influencia en el rendimiento de extracción de EPS son la temperatura y el porcentaje de lodos, no obstante analizando los valores de los coeficientes en

la Figura 7.7, se evidencia la fuerte influencia que tiene la interacción entre la temperatura y el tipo de reactivo, por lo que se propone estudiar en profundidad los efectos de dichos parámetros y sus interacciones.

4.6.2. Superficies de respuesta para la respuesta de capacidad de adsorción

Siguiendo el mismo procedimiento de ajuste, detallado en el Anexo 7.5.2, se evidencia una mejora significativa en los parámetros de ajuste presentados en la Figura 4.11. Además, el ANOVA verifica que el modelo es estadísticamente válido, donde se obtuvo un valor-p de 0,020, indicando que la probabilidad de regresión es significativa al 95%.

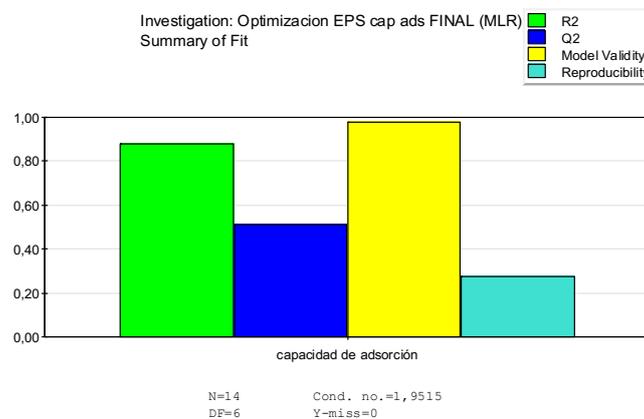


Figura 4.11: Resumen de ajuste del modelo modificado para la capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7).

La visualización de los efectos de las variables y sus interacciones sobre la capacidad de adsorción de la EPS se encuentran esquematizados en el conjunto de superficies presentadas en la Figura 4.12 y Figura 4.13, para los ensayos en los que se utilizó NaOH y Na₂CO₃, respectivamente.

Las superficies de respuestas obtenidas no presentan una curvatura que permita visualizar un punto máximo o mínimo sobre la respuesta; más bien, la mayoría de las gráficas exhiben superficies planas denominadas “cordilleras estacionarias” (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008). Esto es esperable porque representan un modelo de primer orden, que puede usarse para moverse experimentando en la mejor dirección hasta detectar un cambio de tendencia. Aun así, estos resultados permitieron caracterizar de forma preliminar el tipo de superficie de respuesta y definir de manera concreta la influencia de las variables de interés.

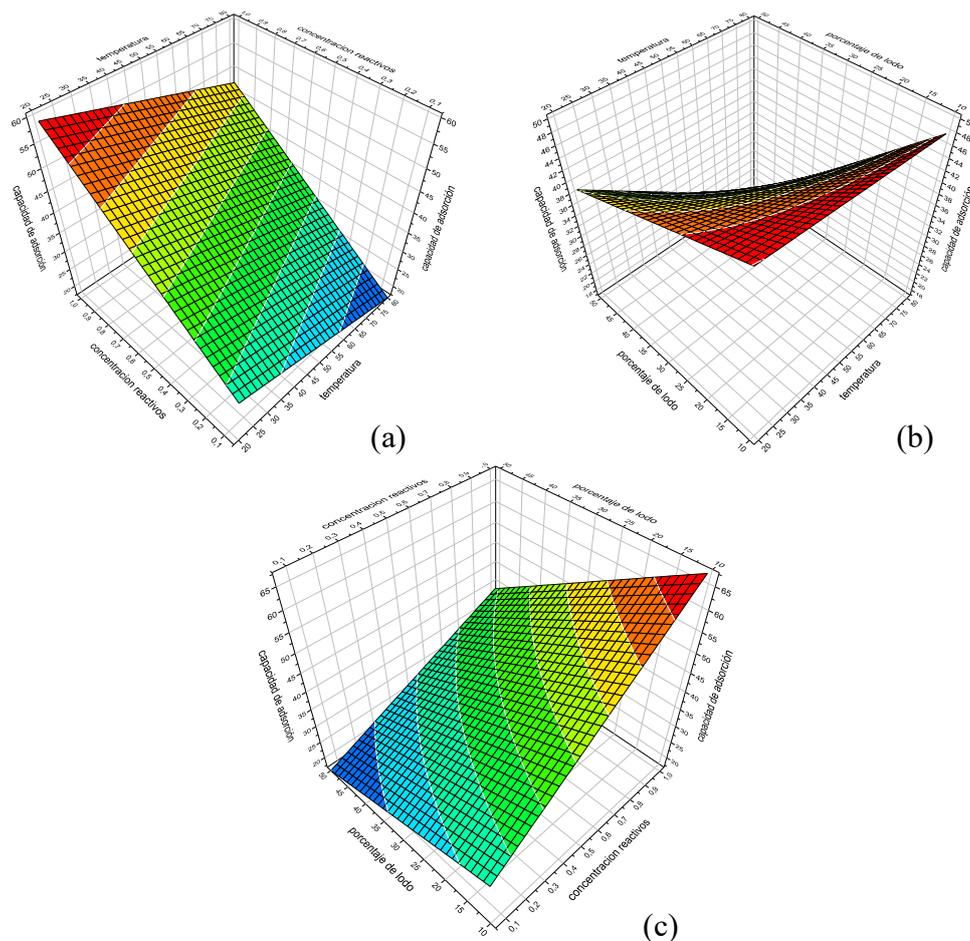


Figura 4.12: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para NaOH con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (Fuente: Modde 7).

La influencia mutua de la temperatura y la concentración de reactivo se indica en la Figura 4.12 (a), considerando el punto central de porcentaje de lodo (30% p/p) y el reactivo alcalino NaOH. Se presenta una región donde se maximiza la respuesta dentro de los parámetros estudiados; a temperaturas bajas pero concentración de reactivo alta (20 °C y a 1M) se alcanza una capacidad de adsorción cercana a los 60 mg Cu(II) ads/g EPS, que corresponde a aproximadamente un 60% más que lo obtenido en literatura, bajo la misma metodología. Adicionalmente, se evidencia una mayor influencia de la concentración de reactivo que de la temperatura. La Figura 4.12 (b) muestra un comportamiento similar a lo conocido como un “punto de silla” donde la superficie asciende a gran pendiente pero llega un punto donde la pendiente disminuye y la respuesta se estabiliza. Se aprecia que la mayor respuesta se obtiene a temperaturas de 20°C y 10% p/p de lodo. Por último, la Figura 4.12 (c) alcanza el mayor valor de capacidad de adsorción (67 mg Cu(II) ads/g EPS) a una concentración de reactivo de 1 M y considerado un 10% p/p de lodo. También se evidencia la fuerte influencia que tiene la concentración de reactivo sobre la respuesta.

Por otro lado, en la Figura 4.13 se aprecia que el comportamiento de las tres superficies de respuesta esquematizadas considerando Na_2CO_3 exhiben un comportamiento similar a las mostradas anteriormente para NaOH , donde se visualiza que dos de las superficies obtenidas son planos y una presenta un punto de silla.

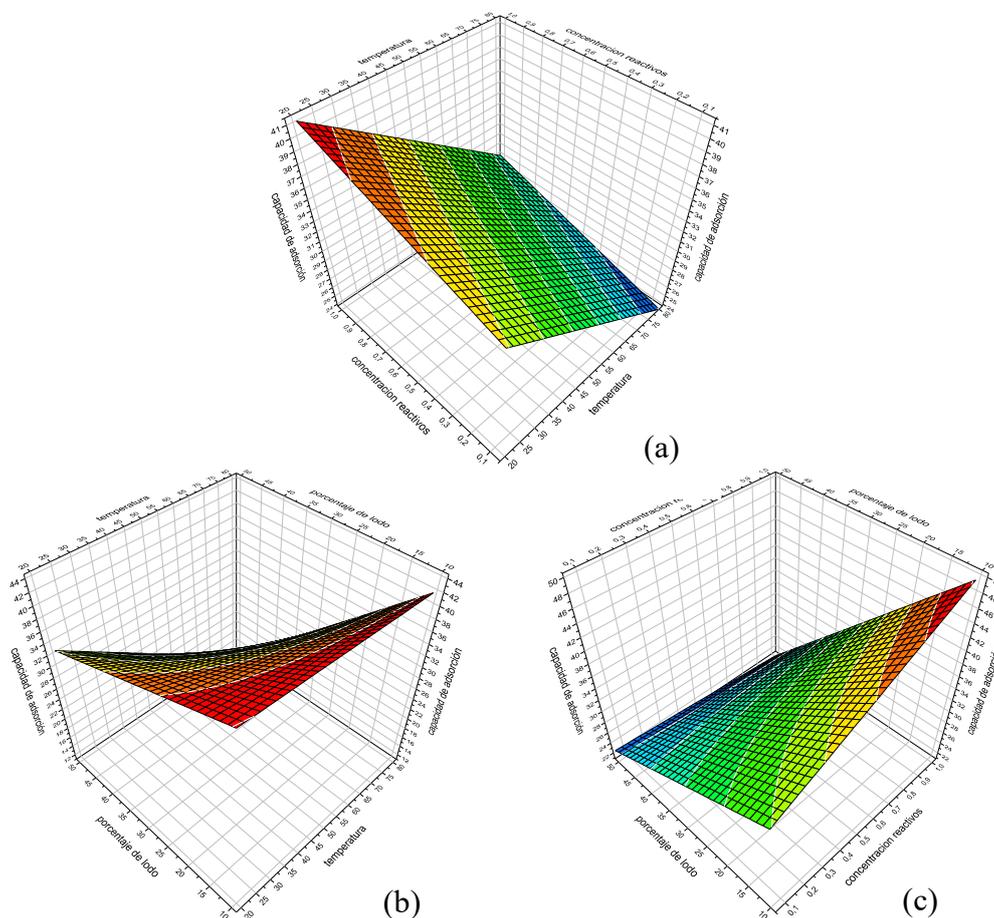


Figura 4.13: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS.. (a) Concentración de reactivo vs Temperatura para Na_2CO_3 con 30% de lodo. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para Na_2CO_3 0,525M. (c) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para Na_2CO_3 a 50°C. (Fuente: Modde 7)

La Figura 4.13 (a) indica que la capacidad de adsorción incrementa a temperaturas bajas y concentraciones de reactivo altas, obteniendo su punto más alto a 20°C y a una concentración de 1M. Además, se evidencia la fuerte influencia que tiene la temperatura por sobre la concentración de reactivo, opuesto a lo analizado en las gráficas de NaOH . La Figura 4.13 (b) presenta un punto de silla similar al obtenido con NaOH , donde a medida que disminuye la temperatura y el porcentaje de lodo, la respuesta se estabiliza acercándose hacia sus valores más altos. El punto de mayor respuesta se obtiene a condiciones de 20°C y 10% p/p de lodo. Por último, la Figura 4.13 (c) muestra la respuesta aumenta conforme a la concentración de reactivos pero disminuye a medida que se incrementa el porcentaje de lodo. El punto de mayor capacidad de adsorción (50 mg Cu(II) ads/g EPS) se alcanza

bajo condiciones de concentración de 1M y 10% p/p de lodo. Aquí se aprecia como el porcentaje de lodo tiene mayor influencia sobre la capacidad de adsorción que la concentración de reactivos.

En resumen, las superficies de respuesta para la capacidad de adsorción desprenden lo siguiente:

- No se encontró un punto máximo de la respuesta que permita optimizar el proceso estudiado evidenciado por la inexistencia de curvatura en las superficies de respuesta. No obstante, estas sugieren el desplazamiento de las condiciones de reacción hacia la región experimental con menores temperaturas, mayores concentraciones de reactivo y menores porcentajes de lodo para obtener la zona de optimización de condiciones.
- Los “puntos de silla” obtenidos en ambos casos al analizar el efecto del porcentaje de lodo y la temperatura de reacción, pueden atribuirse a la existencia de más de un punto óptimo dentro de la región de operabilidad. En el caso que y porcentaje de lodo en la mezcla de lodo y reactivo es alto, existe un menor requerimiento de temperatura para hidrolizar el lodo y extraer las EPS, mientras que, cuando hay bajo porcentaje de lodo en la mezcla de lodo y reactivo, un aumento de la temperatura lograría solubilizar las EPS que no pudieron reaccionar con el reactivo alcalino, obteniendo de igual forma, altos rendimientos de extracción esperados.
- Las variables más influyentes en la capacidad de adsorción son la concentración de reactivo y el porcentaje de lodo; no obstante, según los coeficientes presentes en la Figura 7.10 (Ver Anexo 7.5.2), se evidencia una fuerte influencia de la interacción entre la temperatura y el reactivo alcalino utilizado.
- A temperaturas más bajas se logra maximizar la capacidad de adsorción; no obstante, siempre dependerá de los valores las demás variables.
- Dentro de los parámetros estudiados, existe una aproximación al punto óptimo evidenciada por la curvatura de la superficie de respuesta. Es difícil predecir si el punto óptimo está presente en la región experimental estudiada, pero considerando que existe una formación de elipses en torno a un máximo, sería adecuado comprobar dicha existencia con modelos de regresión de segundo orden.

Analizando todos los resultados obtenidos de superficies de respuesta del rendimiento de extracción y la capacidad de adsorción de EPS, se recalca que el modelo indica que, para llegar al punto óptimo, se debe desplazar la región experimental.

Para la temperatura, el modelo sugiere la búsqueda del punto óptimo a temperaturas menores a los 20°C, pues se indica que las respuestas son inversamente proporcionales al aumento de temperatura. No obstante, llevar a la práctica esta modificación, implica encarecer el proyecto significativamente,

dado que el enfriamiento es un proceso costoso que tiene un efecto negativo en el costo capital de planta concluyendo que no amerita su aplicación. Por otro lado, los resultados presentados en bibliografía contraindican la implementación de bajas temperaturas, dado que los rendimientos de extracción aumentan con el incremento de temperatura (Hong et al., 2017).

Por su parte, respecto a la concentración de reactivo, el modelo sugiere explorar incrementos en dicha variable, con el propósito de encontrar un punto óptimo. Dicho interés radica en determinar el nivel de incremento que requiere la concentración del reactivo alcalino para potenciar el rendimiento de extracción, evaluando simultáneamente su viabilidad en términos de eficiencia económica.

Por último, respecto al desplazamiento de la región experimental relacionada al porcentaje de lodo utilizado en la hidrólisis alcalina, se puede señalar que el factor incidente en la modificación del contenido de lodo es la cantidad de agua utilizada en el proceso. Es evidente que al utilizar mayores volúmenes de agua obtiene mayores eficiencias, pues se asegura que todo el lodo presente se solubilice, liberando la mayor cantidad posible de EPS. No obstante, utilizar muy poco lodo en relación con el reactivo alcalino presente, produce un excedente de reactivo alcalino que no participa en ninguna reacción, lo que resulta en un proceso ineficiente con exceso de agua. Por otro lado, el exceso de lodo y una cantidad insuficiente de agua también resultarían perjudiciales, dado que no hay suficiente reactivo que solubilice la cantidad de lodo presente. En términos de costos, el aumento en la cantidad de agua implica trabajar con flujos mayores, incorporando la necesidad de dimensionar equipos de mayor capacidad. Adicionalmente, los volúmenes requeridos tienen un directo impacto en el medio ambiente y en el manejo eficiente de recursos bajo la óptica de la sustentabilidad. Por lo tanto, se busca operar cerca de la relación óptima entre lodo y agua, con el fin de maximizar la eficiencia del proceso y minimizar los costos asociados y el impacto medioambiental de la actividad industrial.

4.6.3. Búsqueda de punto óptimo

Los resultados indican que la extracción de EPS mediante hidrólisis alcalina en los rangos estudiados para cada condición de operación tiene altos rendimientos de extracción comparados con otros autores y se corrobora su viabilidad como un adsorbente de cobre implementado en la industria y en los sistemas de tratamientos de aguas residuales. Utilizando *Optimizer*, una herramienta proporcionada por el software *Modde 7*® que ayuda a encontrar las condiciones óptimas o el mejor compromiso como punto de consigna de manera iterativa y funciona de acuerdo con una serie de especificaciones dadas, se determinó que las mejores condiciones que maximizan tanto el rendimiento de extracción como la capacidad adsorbente del producto son a 20°C, 10% p/p de lodo y utilizando NaOH 1M,

alcanzando valores de rendimiento y capacidad de adsorción de 465 mg EPS/g SV y 46,5 mg Cu(II) ads/g EPS, respectivamente.

No obstante, para completar la optimización de este proceso y determinar el punto óptimo real de operación, se debe proceder con nuevos ensayos de cribado que desplacen la región experimental en la dirección que apunta el mejor tratamiento obtenido en este estudio. Por lo general, ensayos nuevos suelen requerir varias etapas para detectar curvaturas. Una vez detectada la curvatura, se procede a realizar un nuevo diseño experimental de segundo orden que permita determinar el efecto cuadrático que posee cada variable. Ejemplos de este tipo de diseños corresponde al Diseño Central Compuesto o un Diseño Box-Behnken, que corresponden a análisis de tres niveles donde su función polinómica incluye los términos cuadráticos de cada variable estudiada.

Para facilitar el seguimiento del estudio a futuro, se graficó una superficie de respuesta para el diseño factorial realizado que considera el efecto cuadrático de una variable para ejemplificar la búsqueda de un punto óptimo en la presencia de curvaturas. En este caso, se eligió estudiar el efecto cuadrático del porcentaje de lodo, ya que detectó una mayor influencia sobre la capacidad de adsorción. Esto permite visualizar de manera preliminar si las condiciones de operación consideradas permitirán detectar curvaturas en la respuesta, pero no permite concluir sobre la significancia de las variables sobre la respuesta. No obstante, al detectar curvaturas, se evidencia que el efecto asociado al término cuadrático es cualitativamente significativo, lo que indica la necesidad de aplicar un diseño de segundo orden para estudiar este efecto en profundidad.

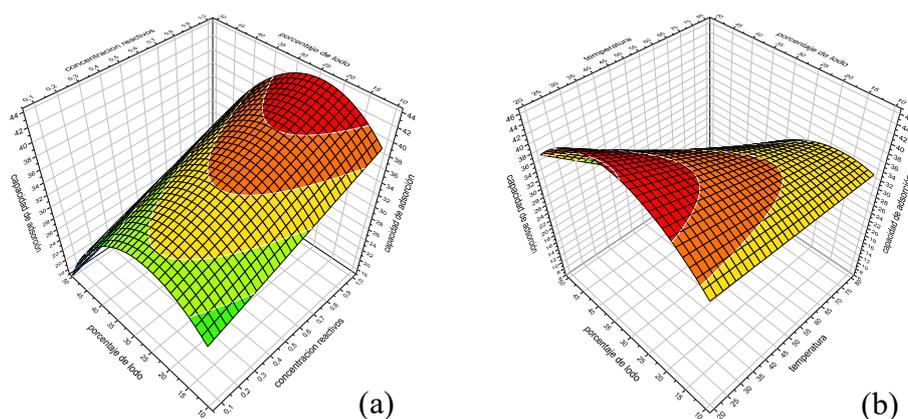


Figura 4.14: Superficies de respuesta para la capacidad de adsorción de EPS, considerando el efecto cuadrático de la variable de porcentaje de lodo. (a) Concentración de reactivo vs Porcentaje de lodo para NaOH a 50°C. (b) Porcentaje de lodo vs Temperatura para NaOH 0,525M.

Conclusiones

La presente investigación propuso determinar condiciones óptimas de extracción de Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) desde lodos sanitarios utilizando la metodología de superficie de respuesta como herramienta estadística, centrándose en maximizar el rendimiento de extracción bajo la metodología planteada y la capacidad adsorbente del producto obtenido. En el estudio se analizaron los efectos de la temperatura, el pH, el porcentaje en masa de lodo y el tipo de reactivo alcalino sobre estas respuestas, para estudiar la contribución de cada una en el proceso de extracción y su influencia sobre la adsorción de metales pesados.

A partir de lo estudiado, se concluye que las condiciones de operación óptimas no se encuentran dentro de los parámetros estudiados; no obstante, se logró determinar otras condiciones de reacción que permitan alcanzar la mayor respuesta dentro de la región estudiada. Las condiciones que obtuvieron una alta capacidad de adsorción de EPS, considerando un buen rendimiento de extracción en el rango experimental estudiado, son: una temperatura de 20°C, 10% p/p en masa de lodo y utilizando NaOH 1M. Estas condiciones permitieron alcanzar un valor de rendimiento de 465 mg EPS/g SV y una capacidad de adsorción de 46,5 mg Cu (II) ads/g SV, valores que van conforme a lo mostrado reportado en literatura, pero que estadísticamente no corresponde al punto óptimo en la región de operabilidad.

Las superficies de respuesta permitieron determinar el peso de cada factor sobre las respuestas, donde se evidenció que la temperatura y el porcentaje de lodo son las variables más influyentes en el rendimiento de extracción, mientras que la concentración de reactivo y el porcentaje de lodos son las más influyentes en la capacidad de adsorción.

La caracterización de los extractos de EPS proporcionó la información necesaria para justificar los efectos que tienen los factores estudiados sobre capacidad de adsorción. La cuantificación de proteínas y polisacáridos mediante técnicas de espectrofotometría permitió comprobar que las EPS extraídas poseen mayor porcentaje de proteínas que polisacáridos, en especial aquellas que utilizan altas concentraciones de reactivos, pues pH altos inducen una mayor carga negativa de las cadenas de aminoácidos, favoreciendo la solubilidad de las proteínas presentes en la matriz de la EPS.

El efecto provocado por el incremento de la temperatura sobre la extracción de EPS contradice lo reportado en literatura, pues se esperaba que al incrementar esta variable, aumentara la cantidad de EPS extraída desde el lodo inicial y por ende, el rendimiento de extracción. No obstante, se aprecia que temperaturas muy extremas desfavorecen la extracción, dado que las altas temperaturas ionizan los grupos amino de las proteínas y los grupos carboxílicos de los polisacáridos, lo que puede

desestabilizar la matriz de la EPS y causar lisis de la membrana celular, resultando en una alta degradación de las moléculas presentes en la EPS que implicó una disminución en su peso molecular y en su eventual pérdida de los componentes en la purificación.

Por otro lado, se planteó que la inconsistencia en los resultados fue debido a la cuantificación incompleta de proteínas y polisacáridos, dado que la etapa de diálisis utilizada para purificar los extractos de EPS eliminó todos los componentes con pesos moleculares menores a 3500 Da. En consecuencia, las macromoléculas altamente degradadas debido a las condiciones agresivas de temperatura no pudieron ser apreciadas en las mediciones.

Se observaron mejores resultados de capacidades de adsorción al utilizar EPS que fueron extraídas utilizando Na_2CO_3 como reactivo alcalino, que los que utilizaron NaOH. Una posible explicación para este comportamiento es que la menor alcalinidad permite preservar mejor la integridad estructural de las macromoléculas que componen las EPS durante la extracción, manteniendo así la actividad de los grupos funcionales en su superficie, lo que favorece la adsorción de iones metálicos.

Los ensayos de potencial Z indicaron que la interacción electrostática no permite justificar el comportamiento de las EPS en los procesos de adsorción, por lo que se infiere que deben existir múltiples mecanismos que requieren de análisis para explicar su comportamiento.

Es importante tener en cuenta las limitaciones de este estudio en la interpretación de resultados. La principal limitación de este trabajo es el modelo de regresión utilizado en el diseño experimental. Si bien, el método factorial completo seleccionado es adecuado para un cribado inicial y para la determinación de los principales factores y los rangos experimentales a los que se someten, no es un modelo completo para una optimización. No obstante, este modelo permitió orientar de manera eficiente la búsqueda de la región experimental para completar la optimización.

A pesar de no haber encontrado el punto óptimo presente en la región de operabilidad, la investigación realizada proporciona una base sólida en la dirección correcta para la optimización de parámetros. Se recomienda desplazar la región experimental, donde resultaría interesante explorar condiciones de mayor concentración de reactivo y llevar a cabo un diseño experimental con un modelo de regresión de segundo orden, que permita estudiar los efectos cuadráticos de cada variable para obtener una curvatura en las superficies de respuesta. Ejemplos como el Diseño Central Compuesto o el Diseño Box-Behnken, que involucran un análisis de tres niveles, son adecuados para llevar a cabo la continuación de esta investigación.

Referencias

- APHA, AWWA, & WPCF. (1992). *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
- Bou-Sarkis, A., Pagliaccia, B., Ric, A., Derlon, N., Paul, E., Bessiere, Y., & Girbal-Neuhauser, E. (2022). Effects of alkaline solvents and heating temperatures on the solubilization and degradation of gel-forming Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted from aerobic granular sludge. *Biochemical Engineering Journal*, *185*, 108500. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108500>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cambi. (2022, April 15). *Anaerobic Digestion for Sewage Sludge Management*. <https://www.cambi.com/resources/blog/anaerobic-digestion-for-sewage-sludge-management/>
- Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb²⁺ and Cd²⁺ complexation. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.023>
- Domínguez, L., Rodríguez, M., & Prats, D. (2010). Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: Influence of extraction methods over three-dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. *Desalination*, *261*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.054>
- Espinoza, J. F. (2022). *Capacidad de adsorción de cationes de las Sustancias Poliméricas Extracelulares obtenidas desde lodos sanitarios*. Universidad de Concepción.
- Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., & Baudu, M. (2005). Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere*, *59*, 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.028>
- Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda Edición). McGraw Hill. México.

- Hong, P. N., Honda, R., Noguchi, M., & Ito, T. (2017). Optimum selection of extraction methods of extracellular polymeric substances in activated sludge for effective extraction of the target components. *Biochemical Engineering Journal*, *127*, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.002>
- Li, C., Yu, Y., Fang, A., Feng, D., Du, M., Tang, A., Chen, S., & Li, A. (2022). Insight into biosorption of heavy metals by extracellular polymer substances and the improvement of the efficacy: a review. *Letters in Applied Microbiology*, *75*, 1064–1073. <https://doi.org/10.1111/lam.13563>
- Li, W. W., & Yu, H. Q. (2014). Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresource Technology*, *160*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.074>
- Liu, H., & Fang, H. H. P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, *95*, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)
- Lotti, T., Carretti, E., Berti, D., Martina, M. R., Lubello, C., & Malpei, F. (2019). Extraction, recovery and characterization of structural extracellular polymeric substances from anammox granular sludge. *Journal of Environmental Management*, *236*, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.01.054>
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, *144*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>
- Pagliaccia, B., Carretti, E., Severi, M., Berti, D., Lubello, C., & Lotti, T. (2022). Heavy metal biosorption by Extracellular Polymeric Substances (EPS) recovered from anammox granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*, *424*, 126661. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126661>
- Peccia, J., & Westerhoff, P. (2015). We Should Expect More out of Our Sewage Sludge. *Environmental Science and Technology*, *49*, 8271–8276. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01931>
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., & Girbal-Neuhauser, E. (2011). Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Research*, *45*, 1529–1538. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.021>

- Ruiz-Hernando, M., Cabanillas, E., Labanda, J., & Llorens, J. (2015). Ultrasound, thermal and alkali treatments affect extracellular polymeric substances (EPSs) and improve waste activated sludge dewatering. *Process Biochemistry*, *50*, 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.001>
- Seviour, T., Derlon, N., Dueholm, M. S., Flemming, H. C., Girbal-Neuhauser, E., Horn, H., Kjelleberg, S., van Loosdrecht, M. C. M., Lotti, T., Malpei, M. F., Nerenberg, R., Neu, T. R., Paul, E., Yu, H., & Lin, Y. (2019). Extracellular polymeric substances of biofilms: Suffering from an identity crisis. *Water Research*, *151*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.020>
- Solon, K., Volcke, E. I. P., Spérandio, M., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2019). Resource recovery and wastewater treatment modelling. *Environmental Science: Water Research and Technology*, *5*, 631–642. <https://doi.org/10.1039/c8ew00765a>
- Tang, C. J., Chen, X., Feng, F., Liu, Z. G., Song, Y. X., Wang, Y. Y., & Tang, X. (2021). Roles of bacterial cell and extracellular polymeric substance on adsorption of Cu(II) in activated sludges: A comparative study. *Journal of Water Process Engineering*, *41*, 102094. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102094>
- Turovskiy, I. S., & Mathai, P. K. (2006). *Wastewater Sludge Processing* (1st Edition). Wiley - Interscience. Hoboken, New Jersey.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., & Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*, *28*, 939–951. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.03.028>
- Wei, L., Li, Y., Noguera, D. R., Zhao, N., Song, Y., Ding, J., Zhao, Q., & Cui, F. (2017). Adsorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ by extracellular polymeric substances (EPS) in different sludges: Effect of EPS fractional polarity on binding mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, *321*, 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.016>
- Wu, Y., Li, Z., Yang, Y., Purchase, D., Lu, Y., & Dai, Z. (2021). Extracellular polymeric substances facilitate the adsorption and migration of Cu²⁺ and Cd²⁺ in saturated porous media. *Biomolecules*, *11*, 1715. <https://doi.org/10.3390/biom11111715>
- Zhang, Z., Wang, P., Zhang, J., & Xia, S. (2014). Removal and mechanism of Cu (II) and Cd (II) from aqueous single-metal solutions by a novel biosorbent from waste-activated sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(18), 10823–10829. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3013-6>

Anexos

7.1. Antecedentes teóricos adicionales

7.1.1. Sustancias Poliméricas Extracelulares

Tabla 7.1: Composición general de las EPS y propiedades predominantes de cada grupo funcional (More et al., 2014).

Componente de la EPS	Composición	Propiedades
Polisacáridos	40 – 95%	Adhesión, retención de agua, adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos, donante o aceptor de electrones y barrera protectora de células.
Proteínas	1 – 60%	Adhesión, retención de agua, adsorción de compuestos orgánicos e inorgánicos, donante o aceptor de electrones y barrera protectora de células.
Ácidos nucleicos	1 – 10%	Fuente de nutrientes, intercambio de información genética y exportación de componentes celulares
Lípidos	1 – 10%	Exportación de componentes celulares.
Sustancias húmicas	-	Adhesión, donante o aceptor de electrones.

7.1.2. Mecanismos de adsorción de metales pesados utilizando EPS

El intercambio iónico es un mecanismo útil para justificar la adsorción de metales utilizando EPS, aunque bien se sabe que no es el único. Este fenómeno radica en que la capacidad de las especies metálicas para el intercambio iónico y su consecuente afinidad de adsorción depende en gran medida de su densidad de carga (Pardo et al., 2003). Adicionalmente, los estados de ionización y la capacidad adsorbente de la EPS están condicionados fuertemente por su composición y el pH utilizado. Generalmente, a altos pH hay menos protones disponibles en la solución para competir por los sitios de unión en la EPS, lo que conduce a una mayor adsorción de metal en el equilibrio de intercambio iónico.

7.1.3. Análisis estadístico de experimentos: Definiciones relevantes

7.1.3.1. Summary of Fit (Resumen de Ajuste)

Para cada respuesta ajustada, se presenta un gráfico de 4 barras que resume los parámetros de ajuste del modelo. Estas son las siguientes:

- R²: Corresponde a la fracción de variación de la respuesta explicada por el modelo y calcula mediante la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{SS\ REG}{SS}$$

Donde SS REG corresponde a la suma de los cuadrados de Y corregida para media, explicada por el modelo, y SS es la suma total de los cuadrados de Y corregida para la media.

- Q²: Es la fracción de variación de la respuesta que puede predecir el modelo, se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SS}$$

Donde PRESS corresponde a la suma de cuadrados de la predicción residual.

Los valores de R² y Q² son números que suelen estar entre 0 y 1, donde valores cercanos a 1 tanto para R² como Q² son una representación de un buen modelo.

- Validez del Modelo: Es una medida de la validez del modelo, cuando la barra de validez del modelo es superior a 0,25, no hace falta de ajuste de modelo. Mientras que, cuando este valor es menor a 0.25, existe una falta de ajuste significativa y el error del modelo es significativamente mayor que el error puro.
- Reproducibilidad: Es la variación de la respuesta en las mismas condiciones (error puro), a menudo en los puntos centrales, en comparación con la variación total de la respuesta. Se representa mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Reproducibilidad} = 1 - \left(\frac{MS(\text{error puro})}{MS(SS\ \text{total corregido})} \right)$$

Donde MS corresponde a los cuadrados medios, o bien, la varianza.

Un valor de reproducibilidad de 1 indica que el error puro es 0, esto significa que bajo las mismas condiciones las respuestas son idénticas. Por otro lado, cuando la reproducibilidad es 0, el error puro equivale a la variación total de la respuesta.

7.1.3.2. Gráficas relevantes

- Box-Cox Plot: Corresponde a una gráfica que representa los valores de lambda obtenidos vs la máxima probabilidad que permite determinar la mejor transformación matemática de la respuesta. Si los valores de respuesta varían más de una magnitud de diez en el dominio experimental, a menudo se recomienda una transformación. El punto máximo en el gráfico Box-Cox da el valor

de lambda para la transformación de respuesta Y que da el mejor ajuste del modelo. Las transformaciones requeridas según el valor obtenido de lambda se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7.2: Transformada de la respuesta de acuerdo a los valores lambda obtenidos en el gráfico Box Cox

Lambda	Tranformada
-1	1/Y
-1/2	1/Y ²
0	Ln(Y)
1/2	Y ^{1/2}
1	Y
2	Y ²

Si $\lambda = 1$ está incluido en ese intervalo, entonces no se recomienda ninguna transformación. Si $\lambda = 1$ no está incluido en el intervalo, entonces el valor de lambda max es la transformación recomendada. No es necesario utilizar el valor exacto de max, sino el valor más cercano conveniente en la secuencia de potencia de las transformaciones soportadas por el software.

- Gráfica de Probabilidad Normal de Residuos: Esta grafica facilita la detección de dos parámetros, la normalidad de los residuos, donde los residuos se distribuyen normalmente si es que los puntos del grafico de probabilidad se aproximan a una línea recta, y la de valores atípicos, o bien, puntos que se desvían de la línea de probabilidad normal y que presentan valores absolutos elevados de los residuos estudiados, es decir, superiores a 4 desviaciones típicas indicadas por las líneas rojas del gráfico.
- Gráfica de Observado vs Previstos: Representa los valores observados versus los valores ajustados de la respuesta. Gráficas con puntos que se ajustan a una línea recta indican buenos modelos.

7.2. Metodología: Diseño experimental.

Tabla 7.3: Matriz de experimentos para el diseño experimental de optimización de extracción de EPS

Experimento	Run order	Factores			
		T	CR	DL	RA
N1	9	-1	-1	-1	+1
N2	14	+1	-1	-1	+1
N3	6	-1	+1	-1	+1

N4	17	+1	+1	-1	+1
N5	18	-1	-1	+1	+1
N6	15	+1	-1	+1	+1
N7	11	-1	+1	+1	+1
N8	5	+1	+1	+1	+1
N9	1	-1	-1	-1	-1
N10	2	+1	-1	-1	-1
N11	13	-1	+1	-1	-1
N12	12	+1	+1	-1	-1
N13	7	-1	-1	+1	-1
N14	16	+1	-1	+1	-1
N15	8	-1	+1	+1	-1
N16	4	+1	+1	+1	-1
N17	19	0	0	0	0
N18	3	0	0	0	0
N19	10	0	0	0	0
N20	20	0	0	0	+1
N21	21	0	0	0	+1

Tabla 7.4: Criterios de optimización de proceso de extracción de EPS.

Respuesta	Notación	Unidad	Tipo de Optimización	Peso
Rendimiento de extracción	REND	mg EPS/g SV	Maximizar	1
Capacidad de adsorción	ADS	mg Cu(II) ads/g EPS	Maximizar	1

7.3. Metodología: Procedimientos de laboratorio

7.3.1. Caracterización de lodo

7.3.1.1. Protocolo para análisis de ST y SV

Discusión general

- a. **Aplicabilidad:** Este método se aplica en la determinación de sólidos totales y sus fracciones fijas y volátiles en muestras sólidas y semisólidas como sedimentos de río o lago, lodos aislados en procesos de tratamiento de aguas limpias y residuales y aglomeraciones de lodo de filtrado al vacío, de centrifugación u otros procesos de deshidratación de lodos.
- b. **Interferencias:** La determinación de sólidos, tanto volátiles como totales, en dichos materiales está sujeta a error negativo, debido a la pérdida de carbonato amónico y materia orgánica volátil experimentada durante la desecación. Aunque otro tanto sucede con las aguas residuales, el efecto tiende a ser más pronunciado con los sedimentos y, especialmente, con los lodos y aglomeraciones de lodos. La masa de materia orgánica recuperada del lodo y del sedimento requiere un tiempo de ignición más prolongado que el especificado para aguas residuales. Obsérvese cuidadosamente el tiempo y la temperatura de ignición especificados para controlar las pérdidas de sales inorgánicas volátiles. Realícese el pesado inmediatamente, ya que las muestras húmedas tienden a perder peso por evaporación. Después del secado o de la ignición, los residuos son a menudo muy higroscópicos y absorben rápidamente humedad del aire.

Materiales y equipos

- Crisoles de porcelana
- Pinzas metálicas
- Balanza analítica
- Lodo desaguado (al menos 1g por muestra)
- Mufla

Procedimiento

Sólidos totales:

1. **Preparación de la placa de evaporación:** Si van a medirse sólidos volátiles, incinérese una placa de evaporación limpia en un horno de mufla a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Si solamente se desea medir sólidos totales, calientese la placa en un horno a $103-105^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Enfriese en desecador, pésese y consérvese en el desecador hasta que haya de usarse.
2. **Análisis de la muestra:**

- Muestras líquidas: Si la muestra contiene suficiente humedad para fluir con mayor o menor facilidad, agítese para homogeneizarla; a continuación, colóquese de 25 a 50 g en una placa de evaporación y pése. Evapórese hasta desecación al baño María, séquese a 103-105 °C durante una hora, enfríese para equilibrar la temperatura en un desecador individual con desecante activo, y pése.
- Muestras sólidas: Si la muestra consta de partículas discretas de material sólido (lodo deshidratado, por ejemplo), extraíganse los fragmentos con un sacabocados del n.º 7 o pulverícese toda la muestra sobre una superficie limpia con los dedos, utilizando guantes de goma. Despositese de 25 a 30 g en una placa de evaporación y pése. Déjese en un horno a 103-105 °C durante toda la noche. Enfríese para equilibrar la temperatura en un desecador individual con desecante activo y pése.

Sólidos volátiles

Transfírase la muestra a un horno de mufla frío, caliéntese éste hasta 550 ± 50 °C e incinérese durante una hora. [Si el residuo obtenido en el apartado 2) contiene grandes cantidades de materia orgánica, incinérese primero el residuo en un quemador de gas protegido por una campana de extracción, en presencia de aire suficiente para disminuir pérdidas por reducción y evitar olores en el laboratorio.] Enfríese en desecador para equilibrar la temperatura y pése.

Cálculo

$$\% \text{ de sólidos totales} = \frac{(A - B) \cdot 100}{C - B}$$

$$\% \text{ de sólidos volátiles} = \frac{(A - D) \cdot 100}{A - B}$$

Donde, A es el peso del residuo seco + crisol, mg, B es el peso de la crisol, mg, C es el peso de la muestra húmeda + crisol, mg, y D es el peso del residuo + crisol después de ignición, mg.

7.3.2. Protocolo para extracción de EPS

7.3.2.1. Hidrólisis alcalina

Materiales y equipos:

- Lodo activado desaguado (50g a 100g)
- Pellets de NaOH de grado analítico
- Na₂CO₃ anhídrido de grado analítico
- Matraz de 1000 ml
- Agua Milli-Q
- Vaso precipitado de 400 ml o de 1000 ml (dependiendo de la dilución)
- Serpentin calefactor

- Recipiente plástico o vaso precipitado de 5L para el baño térmico

Procedimiento:

1. Se prepara un litro de solución de reactivo alcalino que se utilizará (NaOH o Na₂CO₃).
2. Se agregan el lodo a un vaso precipitado.
3. En los casos que los ensayos requieran temperaturas mayores a la ambiente, se prepara un baño térmico para someter la muestra a la temperatura deseada durante todo el proceso de hidrólisis.
4. Se le añade la solución de reactivo al vaso precipitado con el lodo. Dependiendo de la dilución deseada se agrega desde 100 ml (dilución 1:1) a 900 ml (dilución 1:10).
5. Utilizando un agitador magnético, se agita la muestra para homogenizarla.
6. Sin dejar de agitar, se mide y registra el pH de la muestra.
7. Dejar en agitación y a temperatura constante durante 24 horas.



Figura 7.1: Hidrólisis alcalina para extracción de EPS a partir de lodos sanitarios.

7.3.2.2. Centrifugación

Materiales y equipos:

- Tubos Falcon de 50 ml.
- Centrífuga *Biofuge primo de Heraeus*.

Procedimiento:

1. Se distribuye toda la muestra hidrolizada en tubos Falcon de 50 ml.
2. Se ingresan los tubos a la centrífuga, asegurándose que la masa se distribuya uniformemente en cada tubo.
3. Se centrifuga a 10000 G por 20 minutos.

4. Se recolecta el sobrenadante de los tubos y se mide el volumen obtenido.

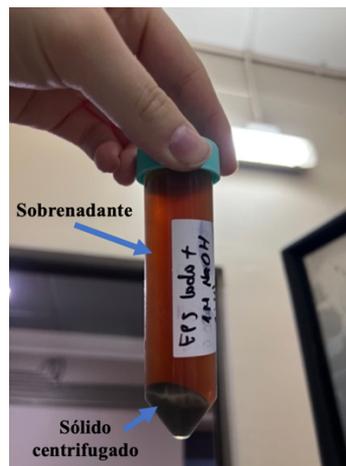


Figura 7.2: Muestra centrifugada.

7.3.2.3. Filtración

Materiales y equipos:

- Filtros de fibra de vidrio de 0,7 μm y 1 μm
- Matraz de Kitasato de 1000 ml
- Pinza metálica
- Embudo
- Base de vidrio
- Adaptador de goma
- Bomba de succión (conexión a sistema de vacío)

Procedimiento:

1. Se realiza el montaje del sistema de vacío, ajustando el embudo al matraz de Kitasato utilizando el adaptador de goma.
2. Se coloca el filtro sobre el embudo, asegurándose que esté centrado, y utilizando las pinzas metálicas, se fija la base de vidrio.
3. Se conecta el matraz a la bomba de vacío y se enciende el sistema.
4. Se vierte el líquido a filtrar en la base de vidrio para que pase por el filtro.
5. Cuando se vea la saturación del filtro, apagar la bomba de vacío y cambiar filtro.
6. Recolectar el líquido filtrado y registrar volumen final.

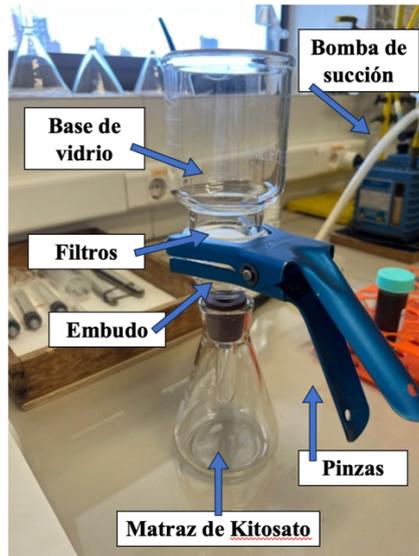


Figura 7.3: Ensamblado del sistema para filtrado de muestras.

7.3.2.4. Purificación mediante diálisis

Materiales y equipos:

- Vaso precipitado de 5 L
- Agua Milli-Q
- Membranas de diálisis de acetato de celulosa con corte de 3500 Da
- Pinzas de plástico
- Agitador magnético

Procedimiento:

1. La muestra previamente filtrada se traspara a membranas de diálisis de 3500 Da.
2. Utilizando las pinzas se sellan las bolsas por ambos extremos.
3. Se colocan las membranas cargadas en un vaso precipitado de 5 litros y se llena con agua Milli-Q.
4. Las membranas sumergidas se dejan en agitación durante 72 horas, cambiando el agua cada 24 horas y notando una saturación del agua según el cambio en coloración (Figura 7.4).
5. Cuando el agua ya no demuestre saturación, se retiran las membranas de diálisis y se traspara el líquido para su posterior liofilización.



Figura 7.4: Sistema de membranas de diálisis con peso molecular de corte de 3500 Da

7.3.2.5. Liofilización

Materiales y equipos:

- Potes de plástico de 400 mL
- Parafilm
- Liofilizador *Freezone 6 de Labconco*.
- Congelador Biomédico de -25°C de *Haier Biomedical*.

Procedimiento:

1. La muestra dializada se traspasa a potes plásticos de 400 ml, procurando de no llenarlos mucho para aumentar la superficie de contacto del líquido.
2. Las muestras se congelan en el ultra freezer, a una temperatura de -20°C . Se dejan congelando de un día para otro con el fin de asegurar que la totalidad de la muestra se congele.
3. Se enciende el liofilizador y se configura la temperatura a -40°C
4. Se colocan las muestras ya congeladas en el liofilizador por niveles, asegurando que no se toquen los potes entre sí.
5. Se enciende el vacío del liofilizador y se deja secando por 72 horas, o hasta que se obtengan fibras de la muestra seca.



Figura 7.5: Extractos de EPS en liofilizador

7.3.3. Protocolo para ensayos de adsorción de cobre

Materiales y equipos:

- Matraces Erlenmeyer de 50 mL y 250 mL
- Membranas de diálisis de acetato de celulosa con corte de 3500 Da
- Solución de NaOH 0,1M
- Solución HNO₃ 0,1M
- Jeringas de 3 mL
- Agitadores magnéticos
- Medidor de pH *HI2002 Edge*[®] pH/ORP de *Hanna Instruments*.
- Pinzas metálicas
- Agitador *Small Capacity Thermostatic Shaking Incubator - BJPX-N* de *Biobase*

Procedimiento:

1. Preparar la solución de Cu(II) madre, utilizando Cu(NO₃)₂ de grado analítico disuelto en agua Milli-Q a una concentración de 50 mg/L
2. Masar 50 mg de EPS liofilizada en un matraz Erlenmeyer de 25 mL y disolver en 20 mL de la solución madre de Cu(II)
3. Ajustar a pH 5 la muestra de EPS disuelta; utilizando HNO₃ 0,1M para acidificar y NaOH 0,1M para alcalinizar.
4. Traspasar las muestras de EPS a membranas de diálisis
5. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, agregar 200 mL de la solución madre de Cu(II) y dejar caer la membrana de diálisis, asegurándose que esta quede completamente sumergida en la solución de cobre.

6. Dejar los matraces por 12 horas, a 20 °C y en agitación a 150 rpm, en la incubadora de agitación (*Small Capacity Thermostatic Shaking Incubator - BJPX-N*).
7. Luego de completadas las 12 horas, recolectar las muestras, tanto de la solución de cobre, como de la EPS encapsulada dentro de la membrana, en tubos Falcon de 50 mL.
8. Medir la cantidad de cobre presente en las muestras utilizando la metodología de adsorción atómica.

7.3.4. Protocolo para medición de proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteínas presentes en los extractos de EPS, se siguió el método de Bradford, el cual se describe a continuación.

Materiales y equipos:

- Espectrofotómetro UV/VIS - 2300
- Reactivo de Bradford
- Cubetas de 4 mL
- Muestras de EPS liofilizadas
- Agua Milli-Q
- Micropipeta de 5 mL
- Micropipeta de 1 mL

Procedimiento:

En primer lugar, realizar una curva de calibración con una muestra patrón de albumina de suero bovino (BSA).

Para preparar la solución patrón disolver en un matraz aforado 100 mg de albúmina de suero bovino en 100 ml de agua milli-Q. Esta solución primaria (1 mg/ml) se continúa diluyendo en proporción 1:10 con agua milli Q para lograr una concentración de 0.1 mg/ml, luego armar una curva de calibración como se describe:

Tabla 7.5: Preparación de soluciones de BSA a distintas concentraciones para efectuar la curva de calibración.

Nº	Concentración (mg/ml)	Volumen de solución primaria (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen total (mL)
1	0,01	1	9	
2	0,02	2	8	10
3	0,04	4	6	

4	0,06	6	4
5	0,08	8	2
6	0,10	10	-

A cada una de las soluciones preparadas realizar lo siguiente:

1. Extraer 0.25 ml de solución
2. Añadir 2.5 ml de reactivo de Bradford
3. Agitar la mezcla por 2 minutos
4. Medir absorbancia en espectrofotómetro a longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco muestra de agua milli Q tratada con la misma metodología anterior.
5. Graficar la relación lineal absorbancia vs concentración y utilizar fórmula para el cálculo de concentración en muestras a partir de absorbancia.
6. Realizar el mismo procedimiento descrito para los extractos de EPS. En el caso de extractos liofilizados (secos) disolver 3 mg en 10 ml, para asegurar un resultado dentro del rango de la curva de calibración estimando un contenido de entre 20 - 80% de proteínas.

7.3.5. Protocolo para medición de polisacáridos

Para cuantificar la cantidad de polisacáridos presentes en los extractos de EPS, se siguió el método fenol-sulfúrico, el cual se describe a continuación.

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro UV/VIS - 2300
- Glucosa
- Fenol al 5%
- Ácido sulfúrico 95%
- Recipiente plástico para baño térmico
- Tubos de ensayo
- Cubetas de 4 mL
- Muestras de EPS liofilizadas
- Agua Milli-Q
- Micropipeta de 5 mL
- Micropipeta de 1 mL

Procedimiento:

Realizar una curva de calibración con una muestra patrón de glucosa en el rango 1-100 mg/L. Armar una solución de glucosa de 1000 mg/L. Extraer 5 ml de la muestra patrón y completar con agua en matraz aforado de 50 mL para obtener una muestra con concentración 100 mg/L. Con esta muestra realizar la curva de calibración en el rango 1-100 mg/L como se ilustra a continuación:

Tabla 7.6: Preparación de soluciones de glucosa a distintas concentraciones para efectuar la curva de calibración.

Nº	Concentración (mg/ml)	Volumen de solución primaria (mL)	Volumen de agua (mL)	Volumen total (mL)
1	0,001	0,1	9,9	
2	0,005	0,5	9,5	
3	0,01	1	9	
4	0,02	2	8	10
5	0,04	4	6	
6	0,06	6	4	
7	0,08	8	2	
8	0,10	10	-	

A cada una de las soluciones realizar lo siguiente:

1. Extraer 2 ml de solución
2. Añadir 1 ml de fenol al 5%.
3. Añadir 5 ml de ácido sulfúrico 95%.
4. Reposar la mezcla por 10 segundos.
5. Agitar la mezcla por 30 segundos.
6. Colocar la mezcla en baño de agua a temperatura ambiente por 20 minutos.
7. Medir en espectrofotómetro a longitud de onda 490 nm, utilizando como blanco muestra de agua milli-Q tratada con la misma metodología anterior.
8. Obtener relación lineal absorbancia vs concentración y utilizar para cálculo de concentración a las muestras a medir.
9. Realizar el mismo procedimiento descrito para los extractos de EPS. En el caso de extractos liofilizados (secos) disolver 3 mg en 10 ml, para asegurar un resultado dentro del rango de la curva de calibración, estimando un contenido de entre 20 - 40% de polisacáridos.

7.4. Resultados y discusión: Tablas de datos obtenidos

7.4.1. Resultados obtenidos para la caracterización del lodo inicial

- Ensayos para determinación de densidad aparente

Tabla 7.7: Resultados de mediciones de densidad del lodo utilizado.

Ensayo	Vol. inicial (mL)	Masa inicial (g)	Vol. final (mL)	Masa final (g)	Densidad (g/mL)
1	10,0 ± 0,1	9,8520 ± 0,001	10,5 ± 0,1	10,5202 ± 0,001	1,3364 ± 0,001
2	10,0 ± 0,1	10,0012 ± 0,001	11,0 ± 0,1	11,0440 ± 0,001	1,0428 ± 0,001
3	4,0 ± 0,1	4,2018 ± 0,001	4,25 ± 0,1	4,7016 ± 0,001	1,9992 ± 0,001
4	3,0 ± 0,1	3,1115 ± 0,001	3,3 ± 0,1	3,3365 ± 0,001	0,7500 ± 0,001
Densidad promedio (g/mL)					1,2821 ± 0,001

- Ensayos para determinación de sólidos totales y volátiles

Tabla 7.8. Resultados de mediciones de sólidos totales y volátiles del lodo en estudio.

Ensayo	Masa crisol (g)	Masa lodo + crisol (g)	Masa post estufa 105 C (g)	Masa post mufla 600 C (g)	%ST (g ST/100g muestra)	%SV (g SV/100g muestra)
1	10,2021	11,8421	10,4294	10,2727	13,86	9,555
2	9,5590	11,5666	9,8400	9,6464	14,00	9,643
3	9,2212	11,7419	9,5826	9,3323	14,34	9,930
% Promedio					14,06%	9,71%

7.4.2. Resultados obtenidos para estudios de cinética de hidrólisis alcalina.

Tabla 7.9: Concentración de proteínas en mg/L para cada intervalo de tiempo de los ensayos A, B y C de cinética de hidrólisis.

Ensayo	A		B		C	
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar
20	119	6,6	429	145	146	3

40	137	6,1	537	36	167	2
60	170	23,4	682	199	197	26
120	221	8,0	682	40	226	12
1440	280	5,6	982	125	396	17

Tabla 7.10: Concentración de polisacáridos en mg/L para cada intervalo de tiempo de los ensayos A, B y C de cinética de hidrólisis.

Ensayo	A		B		C	
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar	Concentración (mg/L)	Desviación Estándar
20	174	18,6	405	12	164	10
40	195	15,4	470	22	178	20
60	236	29,8	541	37	192	34
120	225	13,1	651	39	229	36
1440	381	24,3	1140	72	458	81

7.4.3. Resultados obtenidos para la caracterización de todos los extractos estudiados

Tabla 7.11: Porcentaje de proteínas, polisacáridos y la suma de ambos sobre la masa total de EPS para los 21 experimentos.

Experimento	Proteínas (% EPS)	Desv. Est. Prote	Polisacáridos (% EPS)	Desv. Est. Poli	% EPS
EXP 1	12%	0,012	18%	0,09%	29%
EXP 2	15%	0,004	20%	0,00%	36%
EXP 3	11%	0,027	13%	1,26%	25%
EXP 4	10%	0,002	15%	0,04%	26%
EXP 5	14%	0,004	20%	0,00%	33%
EXP 6	6%	0,002	15%	2,85%	21%
EXP 7	29%	0,023	12%	0,80%	41%
EXP 8	13%	0,005	13%	0,54%	26%
EXP 9	11%	0,002	14%	2,18%	25%
EXP 10	17%	0,031	15%	0,54%	31%
EXP 11	5%	0,005	19%	0,80%	23%

EXP 12	32%	0,001	18%	0,00%	51%
EXP 13	13%	0,001	19%	2,18%	31%
EXP 14	3%	0,012	18%	0,00%	21%
EXP 15	10%	0,001	15%	0,68%	26%
EXP 16	16%	0,008	13%	0,80%	29%
EXP 17	26%	0,006	12%	0,64%	39%
EXP 18	23%	0,019	16%	0,04%	39%
EXP 19	20%	0,005	15%	0,02%	35%
EXP 20	12%	0,008	16%	3,11%	28%
EXP 21	12%	0,012	16%	0,04%	28%

7.4.4. Rendimientos de extracción y capacidades de adsorción obtenidos para los 21 experimentos estudiados y sus condiciones de operación correspondientes.

Tabla 7.12: Rendimientos de extracción y capacidad de adsorción para los 21 experimentos realizados en el diseño experimental.

EXP	Temp. (°C)	Concentración		Reactivo alcalino	pH	Masa EPS liofilizada (g)	Rendimiento	Capacidad
		de reactivo (M)	de lodo (%)				de extracción [mg EPS/g SV lodo]	de adsorción (mg Cu(II) ads/g EPS)
EXP 1	20	0,05	10	NaOH	12,14	2,0126	207	42,3
EXP 2	80	0,05	10	NaOH	11,48	2,9591	305	28,4
EXP 3	20	1	10	NaOH	13,52	4,7095	485	40,7
EXP 4	80	1	10	NaOH	13,85	1,0439	54	17,2
EXP 5	20	0,05	50	NaOH	8,92	0,5909	30	30,8
EXP 6	80	0,05	50	NaOH	8,82	1,0331	106	3,3
EXP 7	20	1	50	NaOH	13,23	2,3124	238	42,7
EXP 8	80	1	50	NaOH	13,49	0,5785	30	35,1
EXP 9	20	0,05	10	Na ₂ CO ₃	10,21	1,1353	117	36,9
EXP 10	80	0,05	10	Na ₂ CO ₃	-	3,1808	328	36,9
EXP 11	20	1	10	Na ₂ CO ₃	-	1,0623	109	51,9
EXP 12	80	1	10	Na ₂ CO ₃	11,19	2,1956	226	47,7

EXP 13	20	0,05	50	Na ₂ CO ₃	8,99	0,3165	33	33,5
EXP 14	80	0,05	50	Na ₂ CO ₃	9,08	0,1920	20	47,6
EXP 15	20	1	50	Na ₂ CO ₃	10,47	0,3373	35	36,5
EXP 16	80	1	50	Na ₂ CO ₃	10,45	2,0856	215	4,9
EXP 17	50	0,525	30	NaOH	13,83	0,4560	23	29,7
EXP 18	50	0,525	30	NaOH	12,38	0,4536	23	46,8
EXP 19	50	0,525	30	NaOH	13,53	0,6057	31	0,1
EXP 20	50	0,525	30	Na ₂ CO ₃	10,52	1,2603	130	24,4
EXP 21	50	0,525	30	Na ₂ CO ₃	10,57	1,5054	155	23,1

7.5. Resultados y discusión: Modificación de modelos del diseño experimental

7.5.1. Ajuste de modelo de rendimiento de extracción de EPS

En primer lugar, se verificó que existe una diferencia significativa de los órdenes de magnitud de las respuestas, por lo que fueron transformadas de acuerdo con lo expresado en la Figura 7.6.

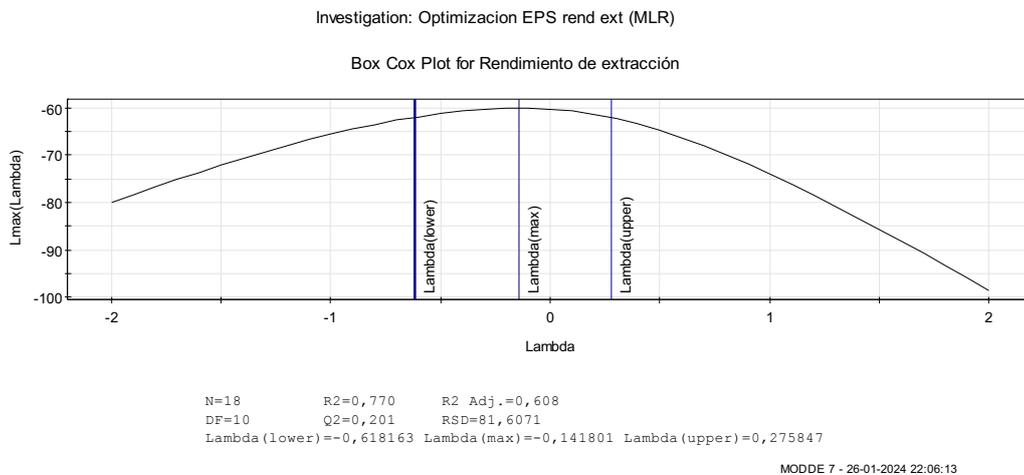


Figura 7.6: Box Cox Plot para transformación de respuesta. (Fuente: Modde 7).

Como el valor máximo de lambda se aproxima a 0 y según lo indicado por el software, se aplicó una transformación de datos de tipo logarítmica.

A continuación, para incrementar Q^2 y la validez del modelo para esta respuesta se eliminaron los coeficientes menos significativos que, de acuerdo a la Figura 7.7, corresponden a las interacciones entre la temperatura y la concentración de reactivo ($T \cdot \text{conc}$), entre la temperatura y el porcentaje de lodo ($T \cdot \text{lodo}$), entre la concentración del reactivo y el tipo de reactivo ($\text{conc} \cdot \text{reac}$) y entre la dilución el porcentaje de lodo y el tipo de reactivo ($\text{lodo} \cdot \text{reac}$).

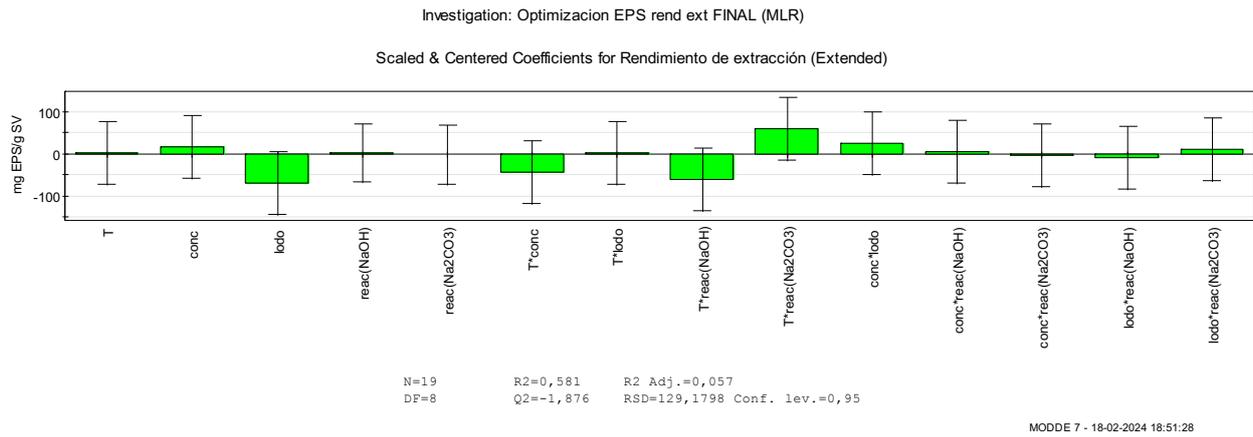


Figura 7.7: Coeficientes escalados y centrados para el rendimiento de extracción de EPS (Fuente: Modde 7)

Por último, se eliminaron los experimentos que obtuvieron valores atípicos según lo mostrado por la Figura 7.8 y Figura 7.9, los experimentos 2 y 6.

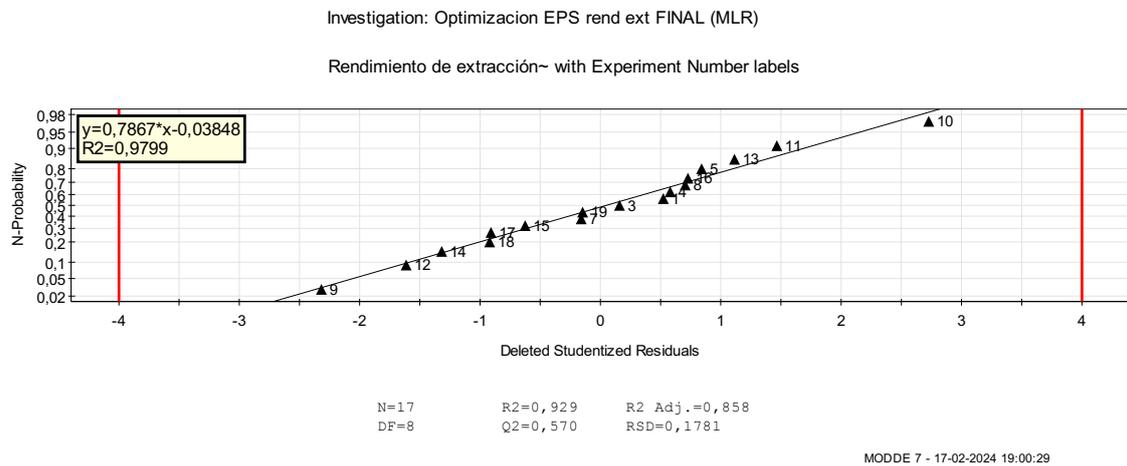


Figura 7.8: Diagrama de Probabilidad Normal de Residuos para el rendimiento de extracción de EPS (Fuente: Modde 7).

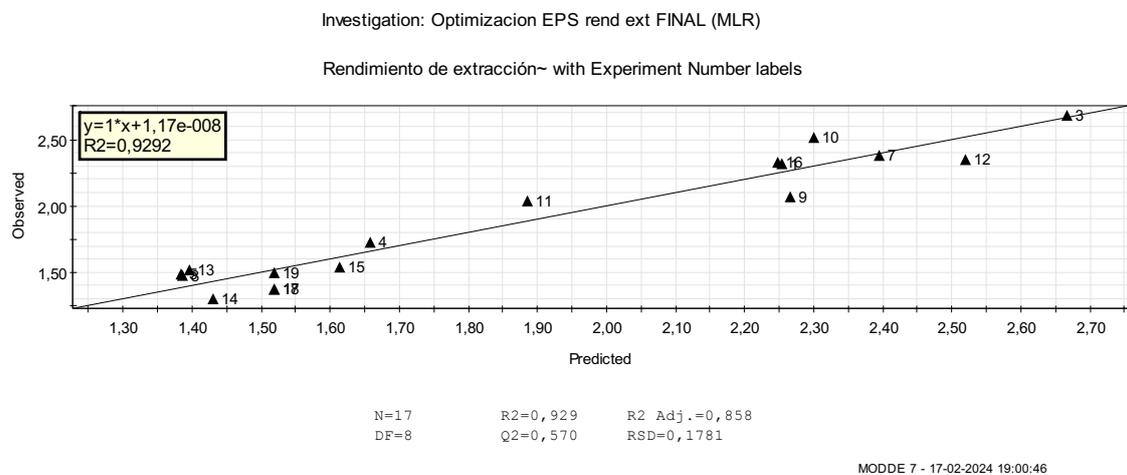


Figura 7.9: Valores observados vs predichos para el rendimiento de extracción de EPS. (Fuente: Modde 7)

7.5.2. Ajuste de modelo de capacidad de adsorción de EPS

Siguiendo el mismo procedimiento para la capacidad de adsorción, se eliminaron los coeficientes menos significativos según lo mostrado en la Figura 7.10, las interacciones entre la temperatura y la concentración de reactivo (T*conc), entre la temperatura y el porcentaje de lodo (T*lodo), entre la concentración del reactivo y el porcentaje de lodo (conc*lodo), entre la concentración de reactivo y tipo de reactivo (conc*reac) y entre el porcentaje de lodo y el tipo de reactivo (lodo*reac).

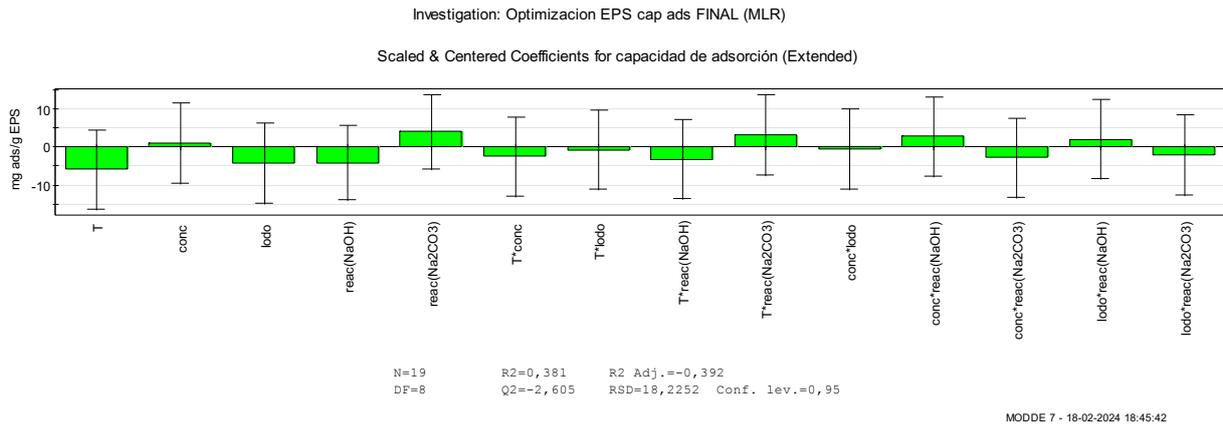


Figura 7.10: Coeficientes escalados y centrados para la capacidad de adsorción de EPS (Fuente: Modde 7).

Además, para mejorar la reproducibilidad del modelo, se eliminaron los experimentos 1, 3, 4, 14 y 19, pues de acuerdo con lo mostrado en la

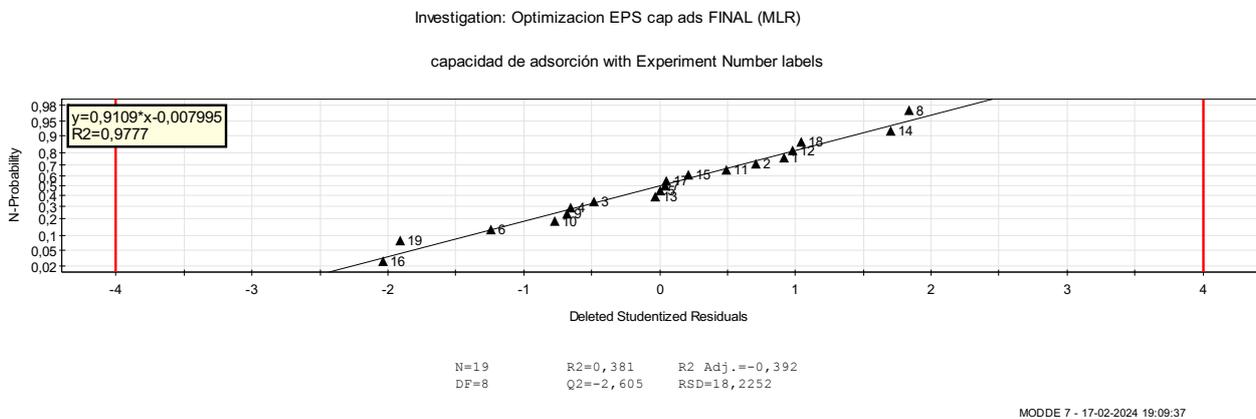


Figura 7.11, todos representaban respuestas atípicas en el modelo.

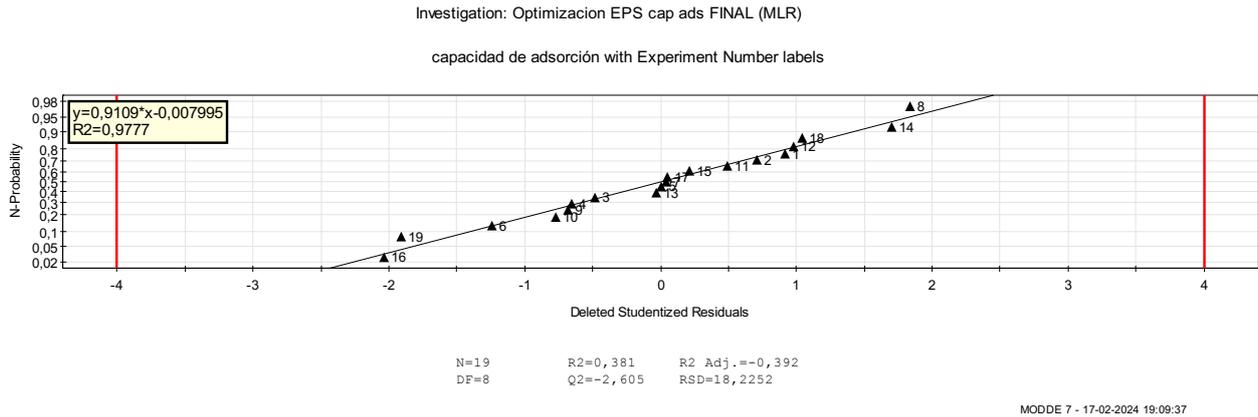


Figura 7.11: Diagrama de Probabilidad Normal de Residuos para la capacidad de extracción de EPS (Fuente: Modde 7).

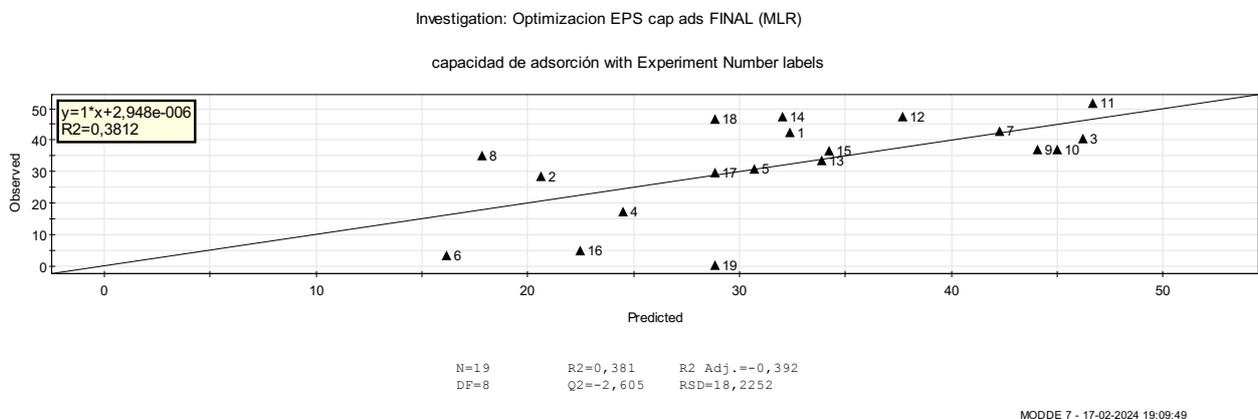


Figura 7.12: Valores observados vs predichos para la capacidad de adsorción de EPS. (Fuente: Modde 7)

7.6. Script de MATLAB para ajuste de modelo a cinética de hidrólisis

```

%%PROTEINAS%%
tiempo = [0, 20, 40, 60, 120, 1440];
concentracion_protA = [0, 119, 137, 170, 221, 280];
desviacion_protA = [0, 6.6, 6.1, 23.4, 8, 5.6];

concentracion_protB = [0, 429, 537, 682, 682, 982];
desviacion_protB = [0, 145, 36, 199, 40, 125];

concentracion_protC = [0, 146, 167, 197, 226, 396];
desviacion_protC = [0, 3, 2, 26, 12, 17];

% Definir la función de cinética de psuedo primer orden (exponencial)
fun = @(x, t) x(1) * (1 - exp(-x(2) * t));

% Ajuste de curva para Ensayo A
params_initial_guess_A = [204, 0.25]; %[CA0, k] k = 0.25-0.8 1/dia
params_fit_A = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_A, tiempo, concentracion_protA);

% Ajuste de curva para Ensayo B
params_initial_guess_B = [204, 0.015]; %[CA0, k] k = 0.015-0.075
params_fit_B = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_B, tiempo, concentracion_protB);

% Ajuste de curva para Ensayo C
params_initial_guess_C = [204, 0.25]; %[CA0, k] k = 0.25-0.8
  
```

```

params_fit_C = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_C, tiempo, concentracion_protC);

% Crear un vector de tiempo para el ajuste suave de la curva
tiempo_fit = linspace(min(tiempo), max(tiempo), 100);

% Calcular las concentraciones ajustadas con los parámetros estimados
concentracion_Aprot_fit = fun(params_fit_A, tiempo_fit);
concentracion_Bprot_fit = fun(params_fit_B, tiempo_fit);
concentracion_Cprot_fit = fun(params_fit_C, tiempo_fit);

% Graficar los datos experimentales y las curvas ajustadas con barras de error
figure;
errorbar(tiempo, concentracion_protA, desviacion_protA, 'o', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo A');
hold on;
errorbar(tiempo, concentracion_protB, desviacion_protB, 's', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo B');
errorbar(tiempo, concentracion_protC, desviacion_protC, 'd', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo C');
plot(tiempo_fit, concentracion_Aprot_fit, 'b', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste
A');
plot(tiempo_fit, concentracion_Bprot_fit, 'r', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste
B');
plot(tiempo_fit, concentracion_Cprot_fit, 'y', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste
C');

xlabel('Tiempo (min)');
ylabel('Concentración (mg/L)');
title('Proteínas');
legend('Ensayo A', 'Ensayo B', 'Ensayo C', 'Ajuste A', 'Ajuste B', 'Ajuste C',
'Location', 'best');
grid on;
hold off;

% Calcular los valores ajustados para cada ensayo
concentracion_Aprot_fit = fun(params_fit_A, tiempo);
concentracion_Bprot_fit = fun(params_fit_B, tiempo);
concentracion_Cprot_fit = fun(params_fit_C, tiempo);

% Parámetros del modelo cinético para cada Ensayo
A0_fit_A = params_fit_A(1); %A0 en mg/L
k_fit_A = params_fit_A(2);

A0_fit_B = params_fit_B(1);
k_fit_B = params_fit_B(2);

A0_fit_C = params_fit_C(1);
k_fit_C = params_fit_C(2);

disp('Parámetros del modelo cinético para Ensayo A proteínas:');
disp(['Concentración inicial (A0) = ', num2str(A0_fit_A)]);
disp(['Constante de velocidad (k) = ', num2str(k_fit_A)]);

disp('Parámetros del modelo cinético para Ensayo B proteínas:');
disp(['Concentración inicial (A0) = ', num2str(A0_fit_B)]);
disp(['Constante de velocidad (k) = ', num2str(k_fit_B)]);

disp('Parámetros del modelo cinético para Ensayo C proteínas:');
disp(['Concentración inicial (A0) = ', num2str(A0_fit_C)]);
disp(['Constante de velocidad (k) = ', num2str(k_fit_C)]);

% Calcular los valores de la suma de los cuadrados residuales (SSR) y el total (SST) para
cada ensayo
SSR_A = sum((concentracion_protA - concentracion_Aprot_fit).^2);
SST_A = sum((concentracion_protA - mean(concentracion_protA)).^2);
R2_A = 1 - SSR_A / SST_A;

SSR_B = sum((concentracion_protB - concentracion_Bprot_fit).^2);

```

```

SST_B = sum((concentracion_protB - mean(concentracion_protB)).^2);
R2_B = 1 - SSR_B / SST_B;

SSR_C = sum((concentracion_protC - concentracion_Cprot_fit).^2);
SST_C = sum((concentracion_protC - mean(concentracion_protC)).^2);
R2_C = 1 - SSR_C / SST_C;

disp('Coeficiente de determinación (R^2) para Ensayo A proteínas:');
disp(['R^2 = ', num2str(R2_A)]);

disp('Coeficiente de determinación (R^2) para Ensayo B proteínas:');
disp(['R^2 = ', num2str(R2_B)]);

disp('Coeficiente de determinación (R^2) para Ensayo C proteínas:');
disp(['R^2 = ', num2str(R2_C)]);

%%POLISACÁRIDOS%%
% Datos proporcionados
tiempo = [0, 20, 40, 60, 120, 1440];
concentracion_poliA = [0, 174, 195, 236, 225, 381];
desviacion_poliA = [0, 18.6, 15.4, 29.8, 13.1, 24.3];

concentracion_poliB = [0, 405, 470, 541, 651, 1140];
desviacion_poliB = [0, 12, 22, 37, 39, 72];

concentracion_poliC = [0, 164, 178, 192, 229, 458];
desviacion_poliC = [0, 10, 20, 34, 36, 81];

% Definir la función de cinética de pseudo primer orden
fun = @(x, t) x(1) * (1 - exp(-x(2) * t));

% Ajuste de curva para Ensayo A
params_initial_guess_A = [124, 0.5]; %[CA0, k] k = 0.5-2
params_fit_A = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_A, tiempo, concentracion_poliA);

% Ajuste de curva para Ensayo B
params_initial_guess_B = [124, 0.001]; %[CA0, k] k = 0.025-0.2
params_fit_B = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_B, tiempo, concentracion_poliB);

% Ajuste de curva para Ensayo C
params_initial_guess_C = [124, 0.5]; %[CA0, k] k = 0.5-2
params_fit_C = lsqcurvefit(fun, params_initial_guess_C, tiempo, concentracion_poliC);

% Crear un vector de tiempo para el ajuste suave de la curva
tiempo_fit = linspace(min(tiempo), max(tiempo), 100);

% Calcular las concentraciones ajustadas con los parámetros estimados
concentracion_Apoli_fit = fun(params_fit_A, tiempo_fit);
concentracion_Bpoli_fit = fun(params_fit_B, tiempo_fit);
concentracion_Cpoli_fit = fun(params_fit_C, tiempo_fit);

% Graficar los datos experimentales y las curvas ajustadas con barras de error
figure;
errorbar(tiempo, concentracion_protA, desviacion_protA, 'o', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo A');
hold on;
errorbar(tiempo, concentracion_protB, desviacion_protB, 's', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo B');
errorbar(tiempo, concentracion_protC, desviacion_protC, 'd', 'LineWidth', 1.5,
'DisplayName', 'Ensayo C');
plot(tiempo_fit, concentracion_Apoli_fit, 'b', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste A
(1er orden)');
plot(tiempo_fit, concentracion_Bpoli_fit, 'r', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste B
(1er orden)');
plot(tiempo_fit, concentracion_Cpoli_fit, 'y', 'LineWidth', 1.5, 'DisplayName', 'Ajuste C
(1er orden)');

```

```
xlabel('Tiempo (min)');  
ylabel('Concentración (mg/L)');  
title('Polisacáridos');  
legend('Ensayo A', 'Ensayo B', 'Ensayo C', 'Ajuste A', 'Ajuste B', 'Ajuste C',  
'Location', 'best');  
grid on;  
hold off;
```