



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**VALORIZACIÓN DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA
CONSERVERA MEDIANTE EXTRACCIÓN CON SISTEMAS
DE DOS FASES ACUOSAS**

POR

Paula Fernanda Ortega Contreras

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

Profesor Guía:

Andrés Mejía

Óscar Rodríguez (Universidad de Santiago de Compostela)

Ana Soto (Universidad de Santiago de Compostela)

Agosto 2023

Concepción (Chile)

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres, a quienes agradezco sinceramente por su apoyo incondicional en mi desarrollo como persona y por brindarme la increíble oportunidad de formarme profesionalmente tanto en Chile como en España.

Expreso mi gratitud a mis hermanos, Isa y Alain, por su constante presencia y apoyo a lo largo de cada etapa de mi camino.

Deseo manifestar mi reconocimiento a mis tutores de la USC, Óscar y Ana, por permitirme participar en esta investigación, abriéndome las puertas del laboratorio y por su respaldo y confianza en la realización de este trabajo.

Asimismo, agradezco a mi profesor guía en la UdeC, Andrés, por su disposición desde el principio, sus enseñanzas a lo largo de la carrera y por guiarme en esta etapa final de mi formación.

A mi amiga, Vale, por su amistad vitamina, su apoyo inquebrantable y las tantas alegrías compartidas que han sido fuente de ánimos y alegría a lo largo de mi experiencia.

Mi reconocimiento se extiende fuertemente a mi familia y amigos, en especial a Diego, Flo, Mati, Cata, Dani P, Basti, Dani C y Paula, cuya compañía ha sido un componente esencial a lo largo de todo el proceso, haciéndolo único e irrepetible.

A mis amigos que conocí gracias a la USC, cómplices de mis días en España, por su inestimable compañía y amistad durante mi estancia allí.

RESUMEN

La industria conservera, una actividad de gran importancia en España y especialmente en Galicia, genera volúmenes significativos de efluentes con alto contenido de materia orgánica durante la producción de pescados y mariscos, que suponen un importante problema medioambiental. El objetivo principal de este trabajo es la valorización de las aguas residuales de la industria conservera mediante la recuperación de compuestos de alto valor añadido, en este caso proteínas, utilizando sistemas de dos fases acuosas, un enfoque adecuado para la separación de biomoléculas.

Los sistemas de dos fases acuosas se generaron con polietilenglicol de distintos pesos moleculares (entre 1500 y 8000 g/mol) y sales (citrato de sodio y tartrato de potasio), debido a su compatibilidad con medios biológicos. Se desarrolló una técnica experimental para la cuantificación de proteína total en los sistemas a estudiar. Se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) para analizar el reparto de proteínas de una harina de pescado entre las fases acuosas superior e inferior. Se estudió la influencia del peso molecular, el tipo de sal y la concentración del sistema de dos fases acuosas en la partición de proteínas. Los sistemas de dos fases acuosas formulados con polietilenglicol (1500 o 8000) y citrato de sodio, usando rectas de reparto concentradas a 23 °C, proporcionaron los mejores coeficientes de partición de proteínas de la harina de pescado. Estos sistemas ofrecen una vía efectiva para la separación de biomoléculas, y abren oportunidades para el desarrollo y optimización de procesos sostenibles que transformen los efluentes en nuevos productos, con una perspectiva de economía circular.

ABSTRACT

The canning industry is highly relevant in Spain and Galicia but generates significant volumes of effluents with high organic matter, which is an important environmental problem. The main objective of this work is the valorization of waste streams of this industry by recovery of value-added products. For this purpose, Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) will be used, which has been proved as an adequate approach for recovery of biomolecules.

Aqueous Two-Phase Systems were generated with polyethylene glycol of different molecular weights (within the 1500-8000 g/mol range) and salts (sodium citrate, potassium tartrate) due to their compatibility with biological media. An experimental technique for quantification of total protein in selected systems was developed, using the bicinchoninic acid (BCA) method to analyze the partitioning of proteins from fish flour in the equilibrium phases. The influence of polymer molecular weight, salt type and tie-line of the equilibrium chosen in the protein partitioning were evaluated. Aqueous Two-Phase Systems formulated with polyethylene glycol (1500 or 8000) and sodium citrate using concentrated tie-lines at 23 °C, provided the best results. Such systems are promising for an effective biomolecule separation, opening opportunities to develop and optimize sustainable processes that transform residues into new products, within a circular economy perspective.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Economía circular	1
1.2. Industria conservera	4
1.3. Sistemas de dos fases acuosas	6
1.3.1. Diagrama de fases	6
1.3.2. Coeficientes de reparto	8
1.3.3. Factores que influyen en la partición de solutos en los ATPS	8
1.3.4. Aplicaciones de ATPS industria conservera	10
2. Objetivos	12
3. Experimental	13
3.1. Materiales	13
3.2. Equipos	14
3.3. Métodos	17
3.3.1. Preparación de ATPS	17
3.3.2. Métodos de análisis	19
3.3.3. Determinación de coeficientes de reparto	21
4. Resultados y discusión	22
4.1. Puesta a punto de la metodología analítica	22
4.1.1. Espectrofotometría Ultravioleta	22
4.1.2. Método Bradford	26
4.1.3. Método BCA	28
4.2. Estudios formulación ATPS	31
4.2.1. Coeficientes de reparto	31
4.2.2. Influencia del peso molecular del polímero	38
4.2.3. Influencia del tipo de sal	39
5. Conclusiones	40
6. Referencias	42

1. Introducción

1.1. Economía circular

Actualmente, los conceptos de tratamiento de residuos, impacto ambiental, cambio climático, entre otros, son parte de discusiones tanto cotidianas como en paneles de expertos, y es debido a la gravedad asociada a la escasez de recursos y su coste medioambiental que resulta imperativo realizar cambios, principalmente en los procesos productivos y en el modelo económico.

De acuerdo con el informe global de riesgos de este año presentado por el *World Economic Forum*, se plantea que en un horizonte de 10 años el impacto negativo que ha tenido la intervención humana en el ecosistema natural, reflejado en la pérdida de biodiversidad, el consumo de recursos, la contaminación y el cambio climático, tendrán consecuencias económicas y sociales de gran alcance, debido a que la mitad de la producción económica mundial depende de la naturaleza. [1]

No obstante, a pesar de que el panorama futuro no es optimista, y siendo claro que el modelo actual será insostenible en el tiempo, existe una alternativa que se denomina economía circular, impulsada fuertemente por organismos internacionales y en directa relación a más de uno de los objetivos de la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible [2]. Siendo los objetivos número 12 (producción y consumo responsable), 13 (acción por el clima) y 15 (vida de ecosistemas terrestres), presentados en la Figura 1, los más destacados.

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE



Figura 1. Objetivos de desarrollo sostenible, agenda 2030. [3]

¿Qué es la economía circular? El concepto de economía circular ha sido definido casi de tantas maneras como investigadores y practicantes de la economía circular hay, y así lo han demostrado esclarecidamente Kirzherr *et al*, 2017 [4]. Sin embargo, acorde a la *Fundación Ellen MacArthur*, líderes en el tema, la economía circular consiste en una serie de soluciones sistémicas diseñadas para combatir los desafíos globales que suponen los residuos, la contaminación y el cambio climático [5].

La economía actual se basa en extraer materias primas, producir bienes de consumo y desecharlos tras su uso, un proceso lineal el cual debido al uso de recursos naturales siempre tendrá un cierto grado de impacto ambiental y potenciales consecuencias relacionadas al consumo indiscriminado de materias primas. A diferencia de este modelo, la economía circular propone el uso de energías renovables, la eliminación de productos químicos tóxicos que impiden la revalorización de residuos, y apunta a la reducción de residuos mediante el diseño de materiales, productos y sistemas con el objetivo de hacerlos desde un inicio duraderos, fáciles de reparar, actualizar y reciclar.

Como todo modelo, la economía circular se basa en una serie de principios, entre ellos el “diseño del residuo”. El concepto se ilustra en el diagrama de mariposa de la Figura 2: Si los componentes biológicos de un producto son diseñados para encajar dentro de un ciclo

biológico o técnico como el presentado, tanto los nutrientes biológicos no tóxicos como los técnicos pueden ser reutilizados y así valorizados con gran calidad. [5]

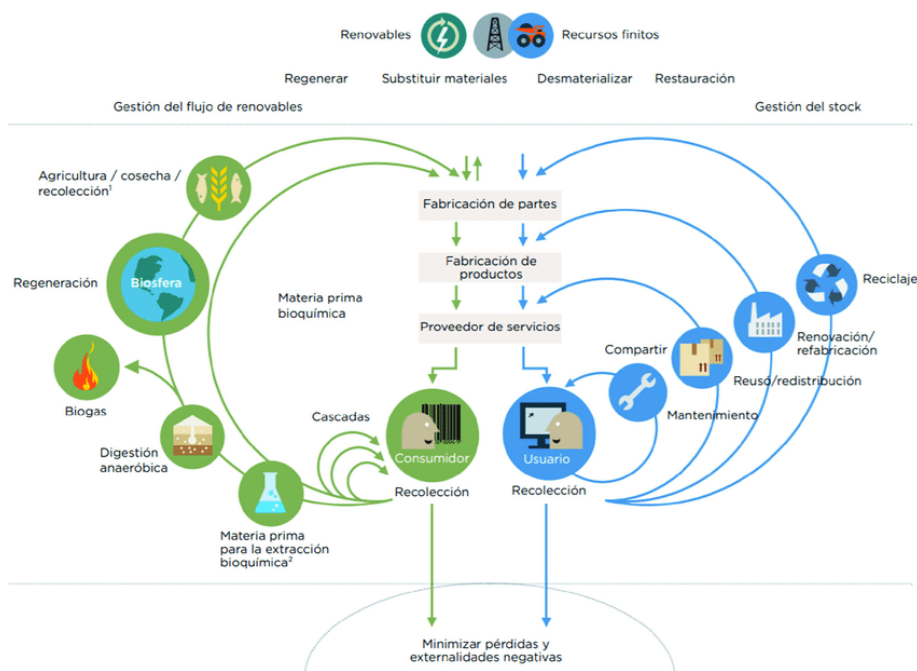


Figura 2. Diagrama de mariposa para una economía circular. [5]

La iniciativa de adoptar un modelo de producción circular es un hecho en distintos lugares del mundo, tanto en forma de acuerdos internacionales como estrategias nacionales. Particularmente en España, un compromiso explícito se estableció en 2017 mediante un Pacto por la Economía Circular y el desarrollo de la Estrategia Española de Economía Circular para el año 2030. En el documento *España Circular 2030 Estrategia Española de Economía Circular* [6], desarrollado por el Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, se detallan una serie de objetivos propuestos, donde destacan:

- Reducir la generación de residuos un 15% con respecto a los generados en 2010.
- Mejorar un 10% la eficiencia del uso del agua.

Esta estrategia se enfoca principalmente en 6 sectores productivos prioritarios: construcción, textil y confección, turismo, bienes de consumo, industrial y el sector agroalimentario, pesquero y forestal. Cabe destacar que, dentro de este último, España ocupa el primer lugar en producción de conservas de pescados y mariscos de la Unión Europea, y

el segundo lugar a nivel mundial según la *Memoria de Actividades Científico-Tecnológicas* [7], desarrollada por el clúster mar-alimentario ANFACO-CECOPESCA.

1.2. Industria conservera

Como se mencionó en el apartado anterior, España destaca a nivel mundial por su producción de conservas de pescados y mariscos. La producción anual al año 2020 fue de 359.081 t, de las cuales el 85%, 305.219 t, sólo en la comunidad autónoma de Galicia. [7]

Si bien la producción de esta industria es el principal motor económico de una amplia zona del litoral, supone una gran problemática en términos de residuos, dado que la industria que procesa productos pesqueros como las enlatadoras de especies de túnidos, sardinas, y moluscos, por mencionar algunos ejemplos, generan varios tipos de efluentes, tanto por las operaciones de lavado como descongelado y cocción, así como residuos sólidos del despiece de estas especies [8].

En promedio, una planta en el proceso de cocción de 1000 kg de pescado genera 15 m³ de efluentes de agua residual [9], siendo la elevada carga orgánica lo que caracteriza estas aguas. Esto se debe a que parte de la materia orgánica, como proteínas, grasas y otros compuestos orgánicos de los pescados y mariscos, son eliminados en estas corrientes debido al desprendimiento de partes como carne y piel durante el proceso, y sus características específicas dependen de la especie procesada. En la Tabla 1 se presentan como ejemplo algunos parámetros de un análisis de efluentes de cocción de túnidos.

Tabla 1. Caracterización de un efluente de cocción de túnidos. [10]

Parámetros	Valor
DQO (mg/L)	4300
DBO5 (mg/L)	2970
Sólidos solubles (mg/L)	480
Nitrógeno total Kjeldahl (mg/L)	720
Grasa (mg/L)	400

En relación a la alta carga orgánica de los efluentes generados en el procesamiento de productos conserveros, una mala gestión de los residuos supone un aporte importante de

carga de contaminación orgánica al medio ambiente, lo cual tiene como consecuencia la desestabilización del ecosistema en el punto de descarga y la descomposición anaeróbica de compuestos nitrogenados y proteínas que liberan dióxido de carbono, metano, aminas, entre otros gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático y al calentamiento global. [8]

Sin embargo, ya que el efluente generado por la industria contiene una alta carga orgánica y resulta imperativo tratarlo antes de su descarga para evitar impactos negativos en el medio ambiente, es posible recuperar una cantidad significativa de proteínas potencialmente valiosa [11]. De esta forma, la recuperación de parte de la materia orgánica presente reducirá en parte los costes de tratamiento de manera estratégica, generando a su vez nuevos productos de interés industrial [8].

Diversos estudios han reportado que las aguas de cocción derivadas de la industria procesadora de productos pesqueros contienen alrededor de un 4% de proteína [12], [13]. Por su parte, Pérez-Santín *et al*, 2013 [8], realizaron la determinación de la composición aproximada de un efluente de la cocción de camarón, obteniendo que el componente principal correspondía a la fracción proteica (26,2 g/L), fracción que representaba aproximadamente un 53% de la materia seca total.

Las moléculas de proteína recuperadas tienen un rol importante tanto en la industria farmacéutica como en la producción de alimento para animales. Entre los métodos que se utilizan para la recuperación y purificación de proteínas de los efluentes de la industria pesquera destacan hidrólisis enzimática, filtración, floculación, o filtración con membranas, entre otras tecnologías emergentes [11]. Sin embargo, las proteínas que se obtienen a partir de algunos de estos procesos pueden presentar un déficit tanto en funcionalidad como en valor nutritivo [14]. En consecuencia, el diseño de un proceso que permita mejorar estos parámetros es una gran oportunidad para la industria.

Los sistemas de dos fases acuosas son una alternativa para la separación y purificación de biomoléculas que se ha aplicado en distintas áreas de la biotecnología, recuperando proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, o incluso células vivas. [15]

1.3. Sistemas de dos fases acuosas

Los sistemas de dos fases acuosas (ATPS, en inglés) son sistemas principalmente compuestos por agua. Es posible obtenerlos al combinar disoluciones acuosas de distintos compuestos, que dadas ciertas condiciones de concentración o temperatura se vuelven inmiscibles, separándose en dos fases cada una rica en uno de los compuestos [16]. Al haber dos fases líquidas, cualquier conjunto de solutos añadido al sistema debe repartirse entre ambas fases. Una selección juiciosa de los compuestos que generan el sistema de dos fases y las condiciones de operación puede permitir que los solutos se repartan de forma muy asimétrica entre las fases, logrando así su separación en un proceso clásico de extracción líquida. Una descripción ilustrativa se presenta en la Figura 3. Además, el alto contenido de agua en los ATPS les otorga una ventaja sobre otros métodos en términos de biocompatibilidad. La baja tensión interfacial proporciona una alta transferencia de materia y permite así recuperar biomoléculas con mínima degradación. [17]

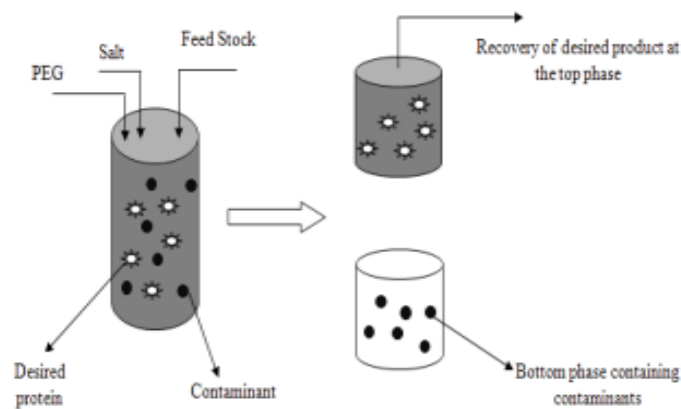


Figura 3. Esquema de la separación de fases de un sistema de dos fases acuoso polímero – sal. [17]

1.3.1. Diagrama de fases

Un ATPS corresponde a un equilibrio líquido-líquido de 2 fases acuosas a unas determinadas condiciones. La representación gráfica del equilibrio de fases permite visualizar toda la información asociada al sistema y se conoce como diagrama de fases. Un esquema de la representación se muestra en la Figura 4. [18]

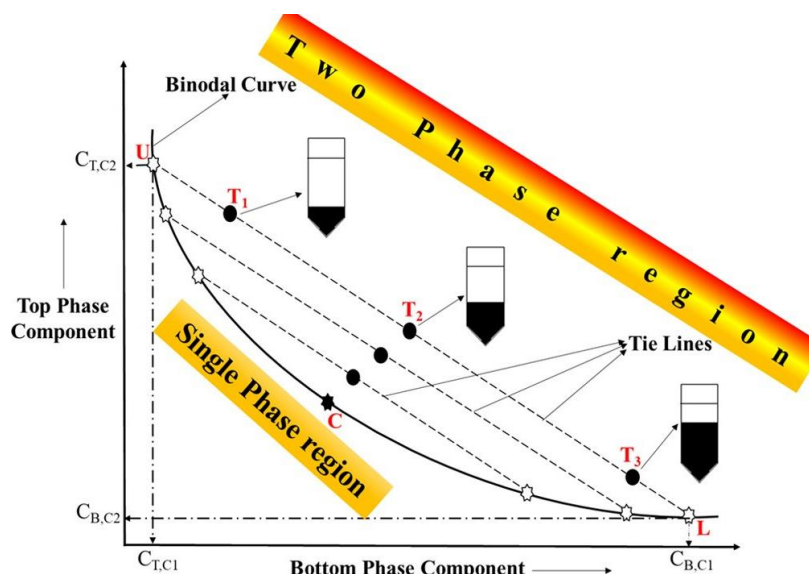


Figura 4. Esquema de un diagrama de 2 fases. [18]

Un diagrama de fases contiene toda la información sobre los componentes y sus respectivas concentraciones, mediante los cuales es posible replicar un sistema con los datos del equilibrio previamente establecidos. Normalmente, los equilibrios líquido-líquido de mezclas terciarias son representados mediante diagramas triangulares. Sin embargo, dado el alto contenido de agua de los ATPS, lo más habitual en la bibliografía es que se representen en diagramas rectangulares, omitiendo los datos de concentración del agua (que es el disolvente común) en el diagrama de fases.

En el diagrama de fases deben destacarse algunos conceptos. La curva binodal es la línea que separa las regiones homogénea y heterogénea (con dos fases líquidas). En la Figura 4, la región sobre la curva binodal corresponde a concentraciones que generan dos fases líquidas, y las concentraciones por debajo de la curva binodal corresponden a la región homogénea (una única fase líquida). La caracterización del equilibrio líquido-líquido se hace por medio de las rectas de reparto, segmentos de recta que conectan las concentraciones de las dos fases en equilibrio. Dentro de una misma recta de reparto, todos los puntos intermedios tendrán una composición idéntica en las fases de equilibrio, pero las masas y volúmenes de las fases serán diferentes. En la Figura 4, se muestra una serie de rectas de reparto, con un punto de mezcla T_2 que generará dos fases en equilibrio de composición T_1 y T_3 , respectivamente.

1.3.2. Coeficientes de reparto

Como se ha indicado antes, en un ATPS las moléculas de cualquier soluto añadido deberán repartirse entre las 2 fases en equilibrio, frecuentemente designadas simplemente como fases superior e inferior, y se caracteriza mediante el denominado coeficiente de reparto (K). El coeficiente de reparto de un componente *i* es la relación entre la concentración de soluto en la fase superior (C_{Top}) con respecto a la fase inferior (C_{Bottom}).

$$K = \frac{C_{Top}}{C_{Bottom}} \quad (1)$$

Estos coeficientes son utilizados para la caracterización del proceso de separación, donde una K mayor que la unidad significa que el soluto será recuperado mayoritariamente en la fase superior y una K inferior a la unidad que será recuperado mayoritariamente en la fase inferior. Los valores de K cercanos a 1 indican que el reparto es similar entre ambas fases, por lo cual la separación es poco efectiva.

1.3.3. Factores que influyen en la partición de solutos en los ATPS

La formulación de estos sistemas se realiza generalmente mezclando dos polímeros solubles en agua o un polímero y una sal. La formulación polímero + sal es generalmente preferida sobre la formulación polímero + polímero, dada la gran diferencia de densidad entre las fases, que facilita la separación, y el menor coste asociado a las sales. No obstante, la selección de un ATPS adecuado para la partición de proteínas en un efluente específico es un proceso complejo que depende tanto de las características y propiedades fisicoquímicas del soluto, como del polímero, la sal y recta de reparto seleccionados.

Algunos de los efectos de la formulación de los sistemas acuosos de dos fases son:

- Efecto del peso molecular del polímero

Dado que los solutos a recuperar mediante los ATPS tienen un tamaño definido, están sujetos a efectos estéricos impuestos por los compuestos formadores de fases, relacionados con el volumen libre que queda disponible en las fases, particularmente en la fase de afinidad (aquella donde se acumulará mayoritariamente). Esto se conoce como el efecto de volumen

libre. Al formular un ATPS con polímero, el volumen libre que hay disponible en la fase está limitado por la longitud y peso molecular de este compuesto. [19]

En la Figura 5 se presenta un ejemplo de un estudio del reparto de proteínas de efluentes industriales del procesado del pescado mediante ATPS comparando el coeficiente de reparto obtenido mediante sistemas con sulfato de sodio como sal fija y PEG de distintos pesos moleculares (de 2000 a 8000 g/mol) a concentraciones fijas de 22,5 y 15 % (w/w), respectivamente. Se aprecia que a menor peso molecular aumenta tanto el coeficiente de reparto como el rendimiento. [11]

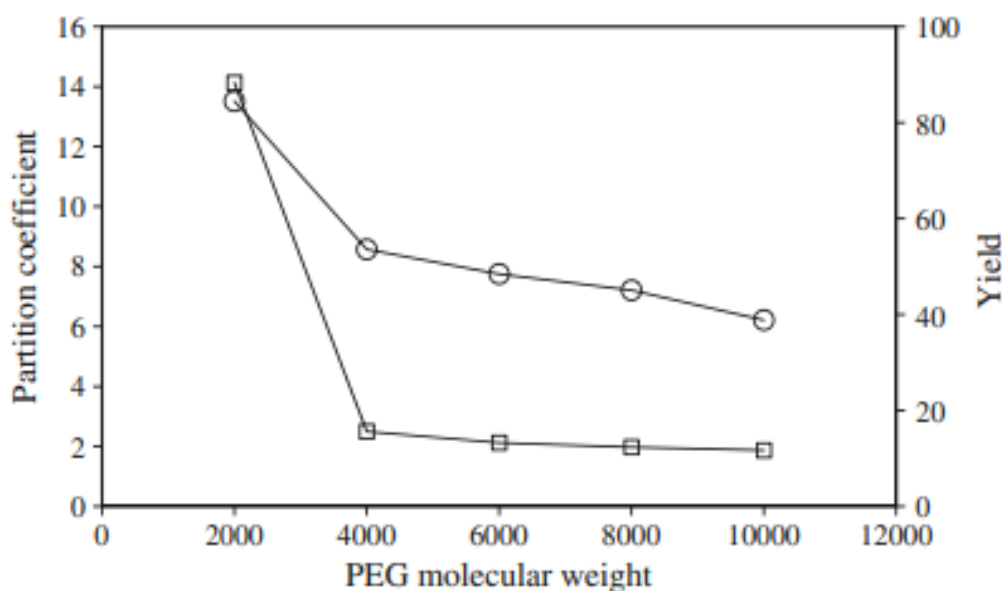


Figura 5 Coeficientes de reparto de proteínas crudas de pescado en ATPS de sulfato de sodio 22% (w/w) y PEG 15% (w/w) de distintos pesos moleculares a 25 °C. (□) Coeficiente de reparto y (○) rendimiento. [11]

- Efecto del tipo de sal

La influencia de la adición de una sal al sistema suele relacionarse a la diferencia de hidrofobicidad que provoca entre las fases (y que suelen tener relación con la serie de Hoffmeister o la energía de Gibbs de hidratación de sus iones), debido al potencial eléctrico que se genera entre las fases. Dicho aumento depende de la disminución de la cantidad de agua necesaria para alcanzar la composición final del sistema, y de la solvatación de iones [16]. Dada la influencia de los iones, anión y catión, cada sal tendrá diferentes consecuencias en el reparto del soluto.

Como ejemplo se presenta un estudio del reparto de proteínas de efluentes industriales del procesado del pescado mediante ATPS, comparando el coeficiente de reparto obtenido mediante PEG2000 como polímero fijo con concentración constante de 15% (w/w) y distintas sales (fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de amonio, citrato de potasio) a distintas concentraciones. En la Figura 6 se pueden ver los resultados del estudio, donde el fosfato de potasio y el sulfato de sodio mostraron mejor coeficiente de reparto que el fosfato de amonio, citrato de sodio y citrato de potasio. [11]

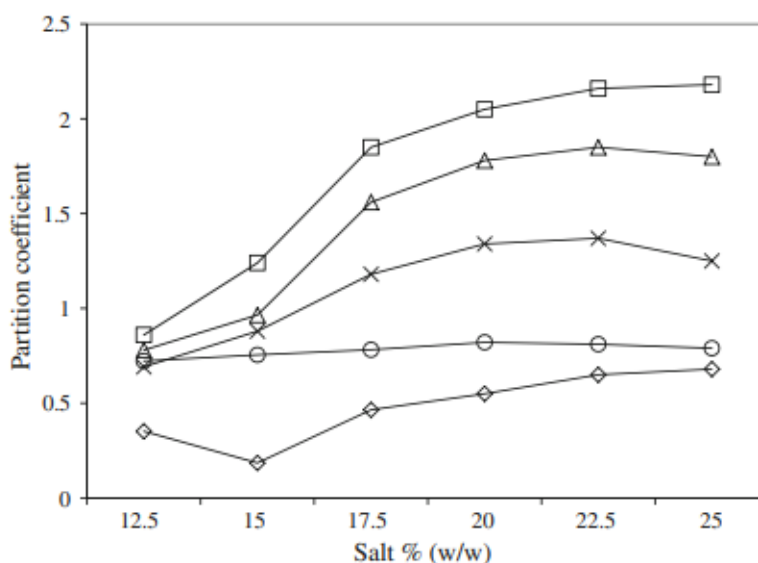


Figura 6. Coeficientes de reparto de proteínas crudas de pescado en ATPS de PEG2000 al 15% (w/w) con diferentes sales a distintas concentraciones a 25 °C. (□) Fosfato de potasio, (Δ) Sulfato de sodio, (×) Citrato de potasio, (o) Citrato de sodio, (◇) Fosfato de amonio. [11]

- Recta de reparto

En un ATPS dado, cada recta de reparto tiene diferentes condiciones de composición y, por ende, efectuará un diferente balance de interacciones con el soluto que se reparte. En general, al aumentar la longitud de la recta de reparto (TL, de *tie-line* en inglés) se produce una reducción del contenido de agua, un aumento de los compuestos formadores de fase, y un aumento de las diferencias entra las fases en equilibrio. [19]

1.3.4. Aplicaciones de ATPS industria conservera

Como se mencionó antes, los efluentes de las conserveras contienen una gran cantidad de biomoléculas valiosas. Para valorizar estos residuos, particularmente las proteínas, se han realizado diversos estudios en los últimos años que se resumen a continuación.

Iyyaswami *et al.*, 2012 [20], realizaron un estudio para recuperar proteínas de aguas residuales de procesamiento industrial de pescado aplicando ATPS compuestos por PEG (4000, 6000 y 8000) con citrato de litio. Se estudió el efecto del peso molecular y recta de reparto utilizada, obteniendo como mejor resultado un coeficiente de reparto de 7,82 en el sistema PEG4000 y citrato de litio, recta de reparto diluida.

Proteínas de aguas residuales de procesado de camarones fueron recuperadas por primera vez en un estudio realizado por Ramyadevi *et al.*, 2012 [21]. Los autores utilizaron un diseño experimental para optimizar la partición mediante un sistema compuesto por PEG/citrato de sodio. Se consideró el peso molecular del PEG, pH, la adición de cloruro de sodio y la longitud de la recta de reparto como factores que influyen en el reparto de proteínas. Las mejores condiciones se alcanzaron utilizando PEG4000, citrato de sodio, pH 8, 1 molar de cloruro de sodio añadido y 40 de longitud de recta de reparto.

Posteriormente, Nagaraja *et al.*, 2015 [11], estudiaron la partición de proteínas de efluentes industriales del procesamiento de pescado empleando una serie de sistemas compuestos por PEG (2000 a 10000 g/mol) y sales como sulfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio, fosfato de amonio y citrato de potasio a distintas concentraciones. El mayor coeficiente se obtuvo con el sistema PEG2000/Sulfato de sodio.

El presente trabajo se formuló para evaluar diferentes ATPS para recuperación de proteínas de pescado, intentado un mejor desempeño en términos ambientales y que al mismo tiempo permita una buena recuperación de proteínas de los efluentes de la industria conservera. Para ello, se ha combinado polietilenglicol, compatible con medios biológicos, de distintos pesos moleculares (entre 1500 y 8000 g/mol), y sales de origen orgánico (citratos, tartratos) que al ser biodegradables reducen el impacto ambiental de la concentración salina utilizada en la formulación del ATPS. Se desarrolló una técnica de análisis que permite cuantificar las proteínas directamente en las fases en equilibrio, y se estudió el efecto del peso molecular, la sal formadora de fase y la recta de reparto seleccionada en cada ATPS. Los diagramas de fases utilizados se obtuvieron de la bibliografía.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la recuperación de proteínas a partir de aguas residuales (aguas de cocción o aguas de lavado) de la industria conservera mediante sistemas de dos fases acuosas (ATPS, en inglés). Este objetivo se enmarca bajo una perspectiva de Economía Circular, reduciendo la producción de residuos, de tal forma que estos efluentes se puedan utilizar como fuentes de nuevos productos o materias primas.

Para conseguir alcanzar este objetivo global, se han definido los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollar y optimizar una técnica experimental precisa y reproducible para la cuantificación de la proteína total en los sistemas objeto de estudio.
- Determinar experimentalmente los coeficientes de reparto de las proteínas encontradas en las aguas de la industria conservera entre las dos fases acuosas del sistema.
- Analizar la influencia de la formulación de los ATPS en el reparto de proteínas. Para ello, se evaluará el efecto del peso molecular del polímero y de la naturaleza de la sal utilizando polímeros de diferentes pesos moleculares (PEG de 1500 a 8000 g/mol) y distintas sales (citrato de sodio y tartrato de potasio). Además, se evaluará la influencia de la concentración de los agentes formadores de fases, sal y polímero, mediante el estudio de dos rectas de reparto para cada sistema (de alta y baja concentración).

3. Experimental

3.1. Materiales

Los polímeros polietilenglicol de peso molecular 1500 g/mol (BioUltra, PEG 1500), 2000 g/mol (BioUltra, PEG 2000), 4000 g/mol (BioUltra, PEG 4000) y 8000 g/mol (PhEur, PEG 8000) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Fueron secados durante la noche a 40 °C con el objetivo de eliminar el agua adsorbida. Las disoluciones acuosas de dichos polímeros, a las concentraciones requeridas, fueron preparadas con agua bidestilada en todos los casos.

Citrato de sodio tribásico dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), tartrato de potasio dibásico hemihidratado ($\text{C}_4\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) fueron también obtenidos de Sigma. Estas sales fueron secadas durante la noche a 60 °C con el objetivo de eliminar el agua adsorbida. Las disoluciones acuosas de dichas sales, a las concentraciones requeridas, fueron preparadas con agua bidestilada y en ambos casos se consideró la hidratación de las sales en la concentración final.

Los reactivos Coomassie (Bradford) *Protein Assay* y BCA *Protein Assay*, obtenidos de Thermo Fisher Scientific, fueron utilizados para la cuantificación de proteína en las fases de los sistemas de dos fases acuosas.

La harina de pescado fue facilitada por la empresa Conresa S.L. Se detallan las características de su ficha técnica en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de la harina de pescado.

Materia prima	
Origen	Subproductos de atún (<i>Thunnus</i> spp., <i>Katsuwonus pelamis</i>)
Propiedades fisicoquímicas	
Proteína bruta (mín.)	60%
Materia grasa bruta (máx.)	12%
Humedad (máx.)	10%
Cenizas (máx.)	22%
Ácidos grasos libres	10-12%
Digestibilidad	95% aprox.

3.2. Equipos

Para el correcto desarrollo del procedimiento experimental se utilizaron una serie de equipos específicos que se detallan a continuación:

Dada la precisión requerida en la composición y el peso agregado de cada componente de los sistemas para alcanzar el equilibrio, todo el pesaje se realizó en la balanza analítica de Mettler Toledo modelo XPE205 (Figura 7), con una precisión de 0,01 mg.



Figura 7. Balanza analítica Mettler Toledo modelo XPE205.

Para la obtención de mezclas homogéneas se trabajó con un agitador/mezclador Heidolph Reax Control (Figura 8). Este equipo puede funcionar tanto en modo continuo como automático, y en un intervalo de velocidad entre 0 y 2500 rpm.



Figura 8. Agitador/mezclador Heidolph Reax Control.

Dada la importancia del control de temperatura en el equilibrio de los sistemas y en algunos métodos de cuantificación de proteínas, se utilizaron dos equipos para control de temperatura: un baño termostático Selecta modelo Ultraterm (Figura 9) y un baño seco Ovan modelo BD200-RE, ambos con una precisión de 0,1 °C (Figura 10), para una incubación adecuada de muestras en viales de tamaño reducido (1 a 4 ml) a la temperatura deseada.



Figura 9. Baño termostático Selecta modelo Ultraterm.



Figura 10. baño seco Ovan modelo BD200-RE.

Los procesos de centrifugación se llevaron a cabo en una centrifuga Ortoalresa series Digicen 21 (Figura 11) que alcanza una velocidad máxima de 16500 rpm y cuenta con un sistema de control de temperatura.



Figura 11. Centrifuga Ortoalresa series Digicen 21.

Para la formulación de los sistemas de dos fases acuosas, los volúmenes requeridos fueron añadidos en viales de tamaño adecuado mediante una pipeta electrónica Multipipette E3x de Eppendorf (Figura 12), utilizando las puntas de pipeta Eppendorf Combitips Advanced de 1, 5 y 10 ml.



Figura 12. Pipeta electrónica Multipipette E3x de Eppendorf.

La absorbancia UV/Visible se midió con un espectrofotómetro Agilent modelo 8453 (Figura 13) controlado mediante un ordenador. Las muestras fueron analizadas en una cubeta de cuarzo Suprasil de la marca Hellma Analytics con un recorrido de 10 mm.



Figura 13. Espectrofotómetro UV/Vis Agilent modelo 8453.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de ATPS

3.3.1.1. Disoluciones acuosas

Para facilitar la preparación de los sistemas de dos fases acuosas, se prepararon por separado disoluciones acuosas de polímero, sal y proteína. Las concentraciones de cada una de las disoluciones se calcularon como porcentaje en masa, agregando cada componente y determinando por pesada en la balanza analítica las cantidades añadidas. A continuación, la disolución se facilitó mediante un agitador magnético en el caso del polímero y la sal. En el caso de la harina de pescado utilizada como fuente de proteína, se preparó en un tubo Falcon, se agitó mediante agitador/mezclador y se centrifugó a 3.500 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante de la fracción sólida no disuelta.

3.3.1.2. Preparación de los sistemas de dos fases acuosas

En este trabajo se han utilizado sistemas de dos fases acuosas cuyos diagramas de fases ya están disponibles en la bibliografía. En la Tabla 3 se muestran las composiciones de mezcla y de equilibrio, así como la temperatura de trabajo y la referencia bibliográfica, para todas las líneas de reparto y sistemas evaluados.

Tabla 3. Composiciones de alimentación y datos de equilibrio de fases de distintos ATPS.

TL	Alimentación (wt)		Fase superior		Fase inferior	
	Polímero	Sal	Polímero	Sal	Polímero	Sal
PEG 1500 + Citrato de sodio + Agua 23 °C [22]						
1	0,1304	0,1549	0,284	0,063	0,014	0,237
2	0,1521	0,1802	0,372	0,038	0,003	0,284
PEG 4000 + Citrato de sodio + Agua 25 °C [23]						
1	0,1361	0,0942	0,228	0,054	0,0185	0,146
2	0,1831	0,1268	0,3801	0,0249	0,0001	0,2193
PEG 8000 + Citrato de sodio + Agua 23 °C [22]						
1	0,1091	0,1027	0,193	0,062	0,014	0,15
2	0,1498	0,1382	0,345	0,029	0,0001	0,222
PEG 1500 + Tartrato de potasio + Agua 20 °C [24]						
1	0,142	0,177	0,233	0,119	0,041	0,243
2	0,129	0,287	0,442	0,06	0	0,378

Los sistemas fueron preparados por pesada en la balanza analítica donde, en base a las composiciones de mezcla y/o los datos de equilibrio de la Tabla 3, se añadieron las cantidades necesarias de las disoluciones acuosas de polímero, sal, proteína y agua en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para cada sistema y línea de reparto, se trabajó con una serie de réplicas con la misma composición de polímero y sal, pero concentración de proteínas creciente, en un rango de 0 a 1500 ppm. Los sistemas fueron temperados durante al menos 1 hora en el baño termostático a la correspondiente temperatura de equilibrio para su posterior agitación en el agitador/mezclador por al menos 30 segundos a velocidad media/alta. Luego, los tubos se sometieron a centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos para favorecer la separación de las fases cuyo resultado se puede apreciar en la Figura 14.



Figura 14. Muestras de un sistema de dos fases acuosas.

Posteriormente, se colocó una aguja en cada tubo, atravesando cuidadosamente la interfase del sistema, para la posterior extracción de muestra. Las muestras de las fases superiores de la serie fueron separadas utilizando la pipeta electrónica, mientras que para obtener las muestras de las fases inferiores se utilizó una jeringuilla con la aguja previamente colocada, como se aprecia en la Figura 15.

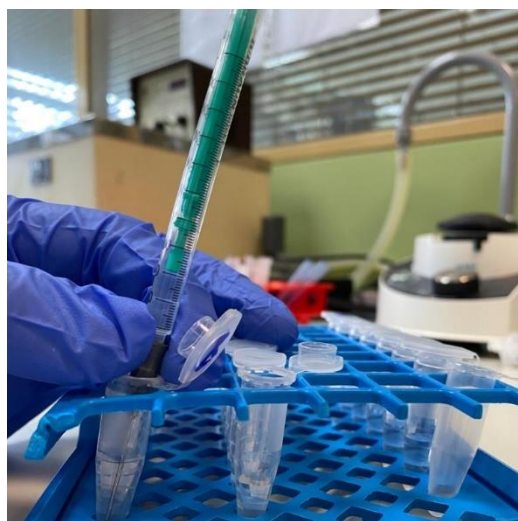


Figura 15. Procedimiento de extracción con aguja muestra de la fase inferior.

3.3.2. Métodos de análisis

Una vez separadas las fases, se procedió a la cuantificación de proteínas totales para la obtención de los respectivos coeficientes de reparto de cada sistema. Para ello, se realizaron pruebas con distintos métodos los cuales se describen a continuación.

3.3.2.1. *Espectrofotometría Ultravioleta*

En primer lugar, se trabajó con espectrofotometría ultravioleta dado que acorde a la bibliografía las proteínas alcanzan un máximo de absorbancia en el rango ultravioleta, comúnmente en un rango de 205 - 280 nm. [25]

Para cuantificar la partición de proteínas mediante espectrofotometría ultravioleta se realizó en primer lugar un barrido en todo el rango ultravioleta para determinar el valor de longitud de onda de mayor absorbancia. Para la validación del método se realizó una curva de calibrado con una disolución acuosa de harina de pescado.

Consecuentemente, se realizó la cuantificación de proteínas en las muestras de fases superior e inferior de un sistema de dos fases acuosas como sistema de referencia, considerando una muestra de blancos del sistema al cual no se añadió proteína para corregir posibles interferencias. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

3.3.2.2. *Método Bradford*

En segundo lugar, se trabajó con el método colorimétrico de Bradford dado que corresponde a un método sencillo, rápido y ampliamente utilizado en la cuantificación de proteínas de distintos tipos. Para cuantificar la partición de proteínas mediante el método Bradford se realizó en primer lugar un calibrado utilizando muestras de la disolución acuosa de harina de pescado diluidas en un rango de concentración estimado de entre 0 y 2 mg/ml. Para este procedimiento se mezcló 0,05 ml de cada muestra y 1,5 ml de Coomassie Plus Reagent en viales de 4 ml, se agitaron en el agitador/mezclador, y posteriormente se temperaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Se consideró un blanco al cual no se añadió proteína para corregir posibles interferencias.

3.3.2.3. *Método del Ácido Bicinconínico (BCA)*

En tercer lugar, se trabajó con el método colorimétrico de BCA debido a que corresponde a un método de alta sensibilidad. Para cuantificar la partición de proteínas mediante el método BCA se realizó en primer lugar un calibrado utilizando muestras de la disolución acuosa de harina de pescado diluidas en un rango de concentración estimado de entre 0 y 2 mg/ml. Para la realización de este procedimiento fue necesario preparar el reactivo de trabajo mediante los reactivos A y B incluidos en el *BCA Protein Assay Kit*, preparando

una disolución 50:1 de mezcla A:B) acorde al manual de uso, obteniendo una disolución color verde como la de la Figura 16.



Figura 16. Reactivo de trabajo método BCA.

Obtenido el reactivo de trabajo, se mezcló en cada caso 0,1 ml de muestra y 2 ml de reactivo en viales de 4 ml, que se mantienen a una temperatura de 60 °C en el baño seco durante 30 minutos. Una vez enfriadas a temperatura ambiente por al menos 30 minutos, se midió la absorbancia individualmente en el espectrofotómetro a 562 nm. En cada caso se consideró una muestra de blancos de los sistemas formadores de fases, a los cuales no se añadió proteínas, para corregir posibles interferencias. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Para el caso de muestras de valores de absorbancia superiores a 1 se realizó dilución con agua, con un factor de dilución determinado particularmente para cada muestra por pesada mediante la balanza analítica.

3.3.3. Determinación de coeficientes de reparto

Finalmente, definido el método de cuantificación de proteínas para los sistemas de dos fases acuosas de este trabajo, se estimaron los coeficientes de reparto de cada sistema en función de la absorbancia y el factor de dilución aplicado según la ecuación (2):

$$K = \frac{C_{Top}}{C_{Bottom}} = \frac{ABS_{Top} \cdot DF_{Top}}{ABS_{Bottom} \cdot DF_{Bottom}} \quad (2)$$

Siendo C_{Top} y C_{Bottom} las concentraciones de proteína en las fases superior e inferior, respectivamente, ABS_{Top} y ABS_{Bottom} las absorbancias en las fases superior e inferior, respectivamente, y DF_{Top} y DF_{Bottom} el factor de dilución en las fases superior e inferior, respectivamente. Dado que se trabajó con una serie de muestras de concentraciones crecientes de proteína en cada sistema, el coeficiente K se obtuvo mediante una regresión lineal de los puntos representados por $ABS_{Bottom} \cdot DF_{Bottom}$ en el eje de abscisas y $ABS_{Top} \cdot DF_{Top}$ en el eje de ordenadas, donde K corresponde a la pendiente de la recta. La regresión lineal para obtener el coeficiente de reparto, así como el error asociado a dicho coeficiente, se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el software de análisis estadístico IBM SPSS Statistics 25.

4. Resultados y discusión

4.1. Puesta a punto de la metodología analítica

La determinación analítica de la concentración de proteína en las fases de sistemas acuosos bifásicos, que además contienen polímero y sal, es un problema complejo que debe ser resuelto para cada aplicación específica. El trabajo experimental se inició por tanto con la evaluación de diferentes técnicas para determinar el contenido proteico en cada fase en equilibrio.

4.1.1. Espectrofotometría Ultravioleta

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de cuantificar el reparto de proteína de la harina de pescado en sistemas de 2 fases acuosos mediante espectrofotometría ultravioleta, como primer paso para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia de la proteína utilizada se midió la absorbancia de una serie de muestras de una disolución acuosa de harina de pescado de concentraciones desde 0 a 500 ppm en el rango de 190 a 400 nm de longitud de onda como se aprecia en la Figura 17.

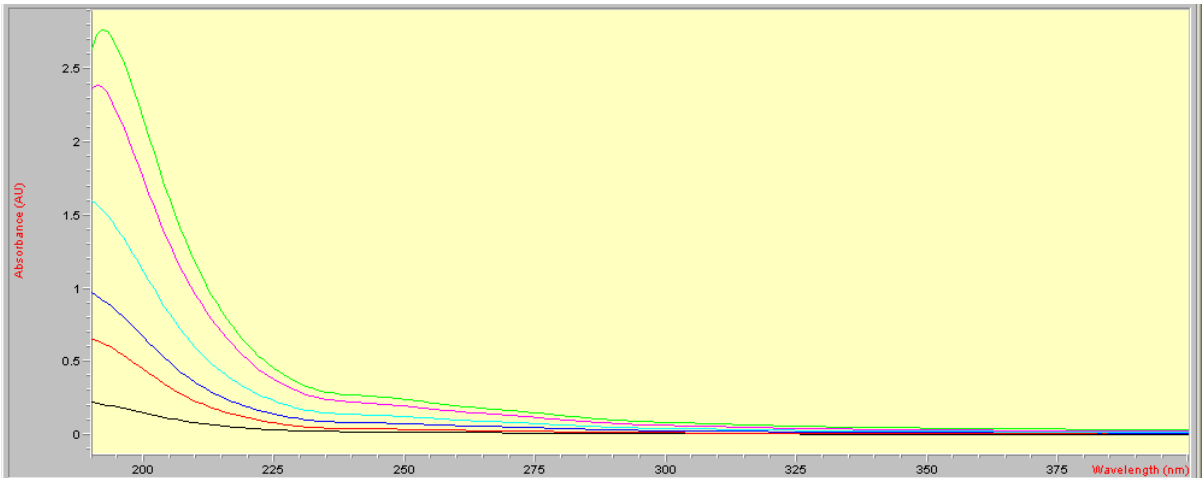


Figura 17. Absorbancia de las muestras de harina de pescado de 0 a 500 ppm de concentración en el espectro UV.

La determinación de la absorbancia de las muestras de disolución acuosa de harina de pescado presentó un máximo alrededor de los 195 nm de longitud de onda, pero no aparecen otros máximos en el rango de 205 a 300 nm.

Determinada la longitud de onda de máxima absorbancia de la harina de pescado, se procedió a realizar la curva de calibrado considerando una serie de 6 muestras patrón de disolución acuosa de harina de pescado en un rango de concentraciones de 25 a 330 ppm. La recta se determinó mediante una regresión lineal de las medidas de absorbancia en función de la concentración de las muestras, y se presenta en la Figura 18.

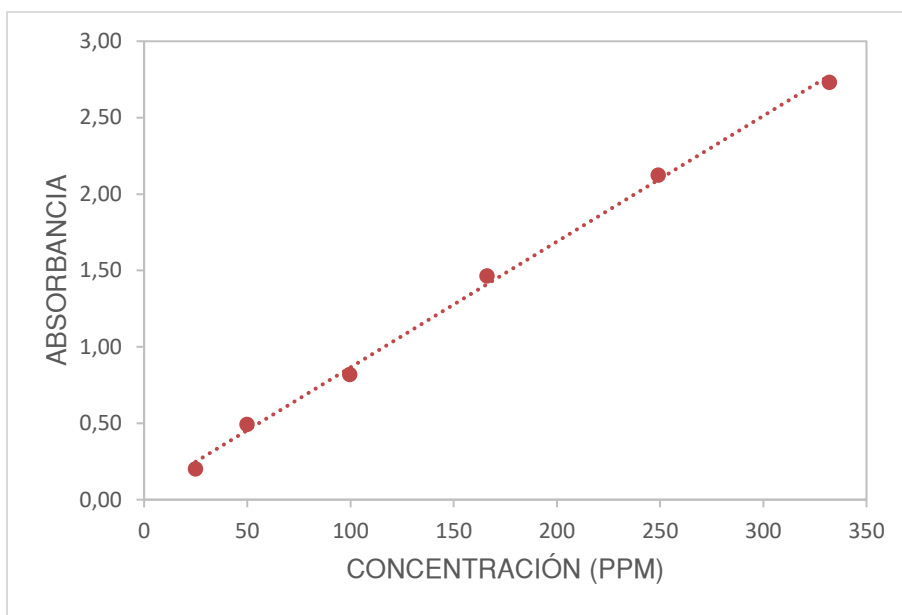


Figura 18. Curva de calibrado de muestras de harina de pescado con método de espectrofotometría ultravioleta.

Con el objetivo de validar la curva de calibración obtenida, se prepararon tres nuevas muestras por pesada (A,B,C) dentro del intervalo de composiciones del calibrado, y se procedió a la medida de la absorbancia. La comparación entre la composición real (C1) y la determinada a partir del calibrado (C2) se muestra en la Tabla 4, donde también se presenta el error absoluto y relativo para cada muestra.

Tabla 4. Concentraciones conocidas y estimadas mediante curva de calibrado para muestras de disolución acuosa de harina de pescado, y errores absolutos y relativos.

Muestra	C1 (ppm)	C2 (ppm)	Error absoluto (ppm)	Error relativo (%)
A	33	27	6	19%
B	62	58	4	6%
C	125	131	7	5%

En el caso de las muestras B y C, correspondientes a las mayores concentraciones, los errores relativos son menores al 10%, lo que permite estimar concentraciones aceptables. En el caso de la muestra A, la más diluida, el error relativo alcanza un 19%. Dicho error está asociado a trabajar con una concentración muy pequeña, lo que implica que una mínima diferencia entre valor real y calculado supone un gran porcentaje de error.

Los resultados obtenidos demuestran que la espectrofotometría ultravioleta es un método válido para cuantificar la proteína de la disolución de harina de pescado en el rango de concentración estudiado. Para completar la validación, se procedió a realizar la cuantificación de proteína total en un sistema de dos fases acuosas, de modo que se verifique si existen interferencias con los componentes formadores de los sistemas de dos fases acuosas. Se formuló el sistema de dos fases acuosas compuesto por PEG2000 y sulfato de sodio [11], utilizando una concentración de alimentación de 15% w/w de polímero y 9% w/w de sal, y su respectiva serie de replicas con concentración creciente de proteína (oscilando entre 0 y 250 ppm). Con ello se procedió a la medición de la absorbancia de las muestras de la fase superior e inferior a 195 nm de longitud de onda.

La determinación de la absorbancia de las fases en equilibrio llevó a valores superiores a 1, lo que implica una saturación de la señal. La absorbancia de las fases superior (T) e inferior (B) diluidas en un factor de dilución 1:50 se presenta en la Tabla 5. El factor de dilución se obtuvo mediante pruebas de dilución hasta alcanzar valores de absorbancia menores o iguales a 1 en todas las muestras.

Tabla 5. Absorbancia de las fases superior e inferior del sistema PEG2000/Sulfato de sodio.

Muestra	Fase superior	Fase inferior
0	1,01	0,52
1	0,93	0,50
2	0,82	0,47
3	0,93	0,50
4	0,87	0,54

En la Figura 19 es posible apreciar gráficamente el comportamiento de la absorbancia en las distintas muestras. La réplica blanco del sistema (muestra 0, sin proteína añadida) presenta valores de absorbancia similares al resto de replicas, tanto en la fase superior como inferior. Esto se interpreta como interferencias de los agentes formadores de fases, donde la medida de absorbancia se asocia a la presencia del polímero y sal en sus respectivas fases, y que se superponen a la señal de proteína. Estos resultados demuestran que el método de espectrofotometría ultravioleta no es adecuado para cuantificar la proteína de la harina de

pescado en sistemas de 2 fases acuosas sin una separación previa de los componentes formadores de fase.

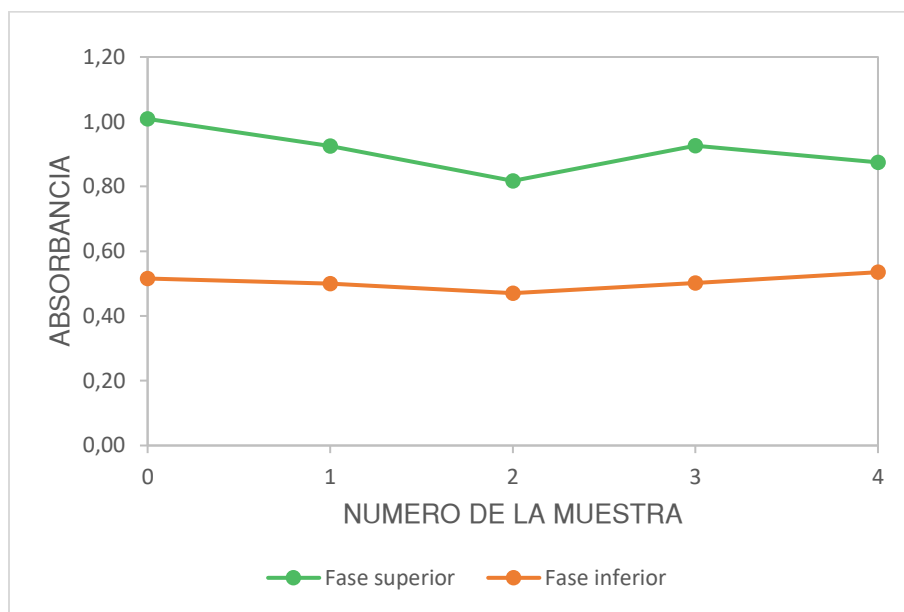


Figura 19. Absorbancia de las fases superior e inferior del sistema PEG2000/Sulfato de sodio.

4.1.2. Método Bradford

Como segundo método evaluado, se procedió a estudiar la viabilidad del método Bradford para cuantificar el reparto de proteína de la harina de pescado en sistemas de 2 fases acuosas. En primer lugar, se procedió a realizar una curva de calibrado de disoluciones acuosas de la proteína de pescado. Se preparó una serie de muestras patrón en base a una disolución acuosa de harina de pescado de 1 mg/ml y agua, cuyos respectivos volúmenes agregados a cada muestra y la concentración final de proteína en la muestra se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Muestras patrón de disolución acuosa de harina de pescado para calibrado con método Bradford.

N°	Disolución de proteína (μ l)	Agua destilada (μ l)	Concentración de proteína (mg/ml)
0	0	100	0
1	10	90	0,1
2	15	85	0,15
3	20	80	0,2
4	30	70	0,3

Las muestras fueron sometidas al método Bradford, mezclando 0,05 ml de muestra con 1,5 ml de reactivo Coomassie (Bradford). Una vez ocurrida la reacción fue posible apreciar que las muestras adquirieron un color marrón de una intensidad similar (Figura 20) que no se corresponde con la propuesta visual del método. De acuerdo con el método Bradford, la disolución pasa de color rojo a azul cuando el colorante se une a la proteína.

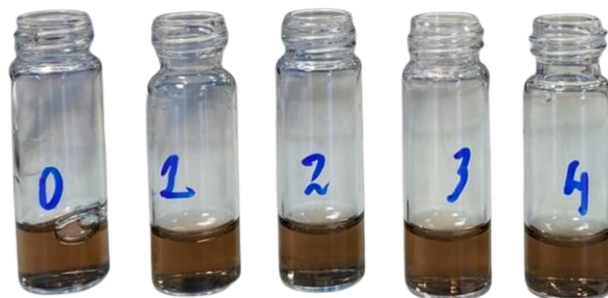


Figura 20. Muestras de harina de pescado con reactivo Bradford.

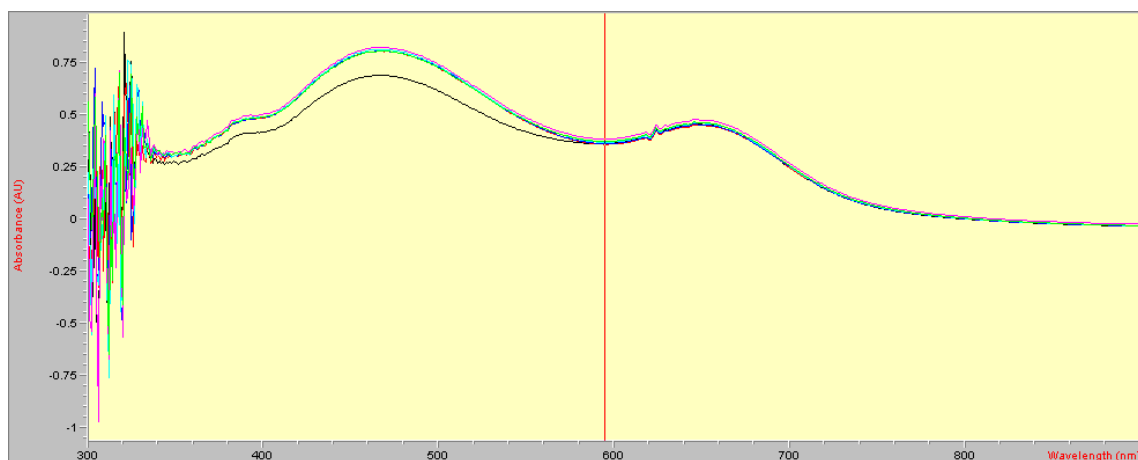


Figura 21. Curvas de absorbancia de muestras patrón para calibrado con método Bradford medidas a 595 nm.

La determinación de la absorbancia de las muestras tuvo como resultado las curvas de la Figura 21, donde es posible apreciar que el máximo de absorción no se encuentra a los 595 nm de longitud de onda que propone el método Bradford, sino que por el contrario existe un mínimo de absorbancia en esa longitud de onda. Los máximos se encuentran en el entorno de 470 y 650 nm, que se corresponden a las formas catiónica y neutra del colorante (sin reacción con la proteína). Esto indica que la reacción no ocurrió correctamente. El ensayo se

realizó por triplicado, con resultados similares en todos los casos. Con lo cual, se consideró como método inválido para cuantificar la proteína de la disolución de harina de pescado. Igualmente, se descartó la posibilidad de analizar su viabilidad en mezclas con polímero y sal, y por lo tanto su aplicación para la determinación de composiciones en los ATPS objeto de estudio.

4.1.3. Método BCA

Como tercer método, se procedió a estudiar la viabilidad del método BCA para cuantificar el reparto de proteína de la harina de pescado en sistemas de 2 fases acuosas.

En primer lugar, se procedió a realizar una curva de calibrado de la harina de pescado en disoluciones acuosas. Se preparó una serie de muestras patrón en base a una disolución acuosa de harina de pescado de 3350 ppm concentración y agua destilada, cuyos respectivos volúmenes agregados a cada muestra y la concentración final de proteína en la muestra se presentan en la Tabla 7. Las muestras fueron sometidas al método BCA, mezclando 0,1 ml de muestra con 2 ml del reactivo de trabajo. Los valores de absorbancia medidos a 562 nm de longitud de onda de cada muestra se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Muestras patrón de disolución acuosa de harina de pescado para calibrado con método BCA.

Muestra	Disolución de proteína (μl)	Agua destilada (μl)	Concentración de proteína (ppm)	Absorbancia
A	100	0	3350	0,7656
B	300	100	2512	0,6305
C	200	200	1674	0,4826
D	100	300	837	0,3399
E	100	700	419	0,3841
F	100	1500	209	0,3521
G	0	100	0	0,2825

Una vez aplicado el método fue posible apreciar que las muestras adquirieron un color púrpura de diferente intensidad (Figura 22) que se corresponde con la propuesta visual de este método. La determinación de la absorbancia de las muestras tuvo como resultado las

curvas de la Figura 23, donde fue posible apreciar que el máximo valor se encuentra a los 562 nm de longitud de onda que propone el método BCA.



Figura 22. Muestras de calibrado aplicado el método BCA.

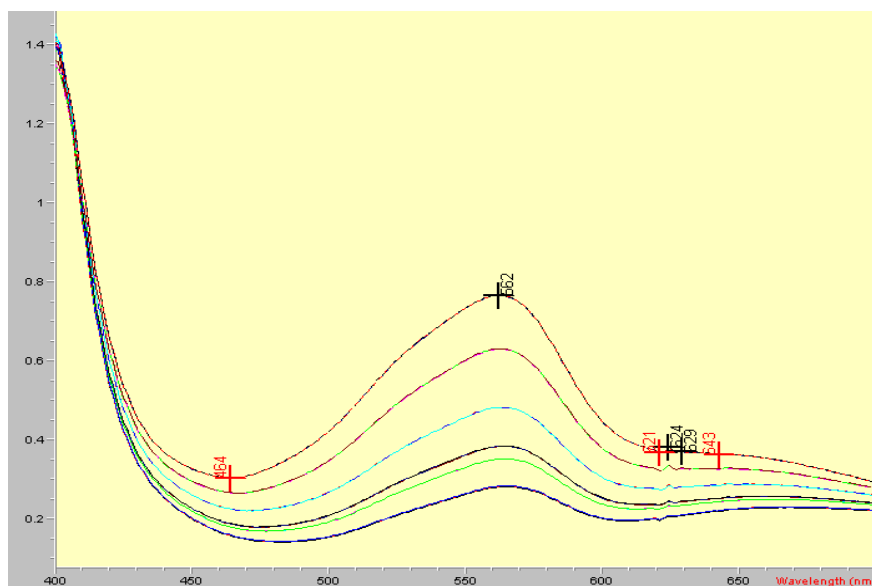


Figura 23. Espectro de las muestras de calibrado con método BCA.

Tanto por la existencia de un máximo a 562 nm, como por la aparición del color característico de la aplicación del método, este método de análisis se consideró en principio viable, por lo que se procedió a la determinación de la recta de calibrado mediante una regresión lineal de las medidas de absorbancia en función de la concentración de las muestras, y que se presenta en la Figura 24.

Con el objetivo de validar la curva de calibrado obtenida, se prepararon tres nuevas muestras por pesada (1,2,3) dentro del intervalo de composiciones del calibrado, y se

procedió a la medida de la absorbancia. La comparación entre la composición real (C1) y la determinada a partir del calibrado (C2) se muestra en la Tabla 8 donde también se presenta el error absoluto y relativo para cada muestra.

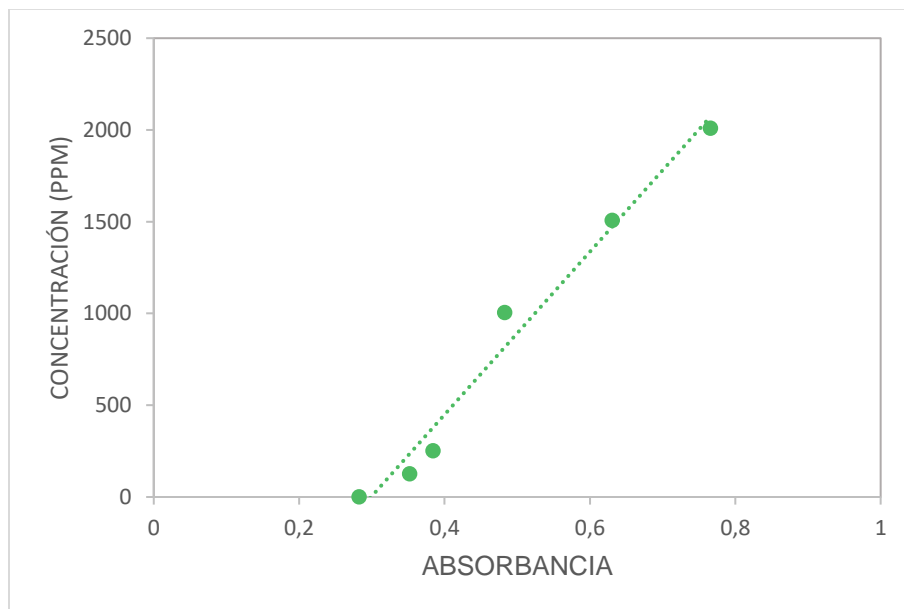


Figura 24. Recta de calibrado con método BCA con muestras patrón de concentración.

Tabla 8. Muestras de validación con las respectivas concentraciones conocidas y estimadas, y errores absolutos y relativos.

Muestra	C1 (ppm)	C2 (ppm)	Error absoluto (ppm)	Error relativo (%)
1	1256	1326	70	6%
2	754	714	39	5%
3	301	254	48	16%

En el caso de las muestras 1 y 2, correspondientes a las de mayor concentración, los errores relativos son menores al 10%, lo que permite estimar concentraciones aceptables. En el caso de la muestra 3, la menos concentrada, el error es mayor, sin embargo, al trabajar con una concentración muy pequeña, una mínima diferencia (menos de 50 ppm) supone un gran porcentaje de error.

De los resultados obtenidos se consideró el método BCA como método válido para cuantificar la proteína de la disolución de harina de pescado en el rango de concentración

estudiado. Con lo cual, se procedió a realizar la cuantificación de proteína total en sistemas de dos fases acuosas, para la determinación del coeficiente de reparto. Los resultados obtenidos se presentan a continuación

4.2. Estudios formulación ATPS

La selección de un ATPS que permita la mejor separación de un determinado soluto (como proteínas) es un proceso complejo, dado que depende tanto del soluto y sus propiedades fisicoquímicas como de las propiedades del sistema. Las variables del sistema de dos fases acuosas más relevantes son la naturaleza del polímero y la sal seleccionados, el peso molecular del polímero, la concentración de los componentes (o línea de reparto), y la temperatura. Por ende, en esta sección se presentan los resultados de los estudios realizados en la formulación de los ATPS.

4.2.1. Coeficientes de reparto

Para analizar el efecto del peso molecular de PEG y el tipo de sal en la distribución de las proteínas entre las fases de equilibrio, se prepararon muestras con concentraciones diferentes de harina de pescado (de 0 a 1500 ppm) en soluciones acuosas de polímero y sal con los componentes y composiciones indicados en la Tabla 3. Se evaluaron para cada sistema 2 composiciones de alimentación diferentes, correspondientes a 2 rectas de reparto, una diluida (TL1) y otra concentrada (TL2). Tal y como se describió en la sección 3.3.3 (Metodología), los coeficientes de reparto, K , de la harina de pescado se determinaron como la pendiente de la regresión lineal, al representar los datos de absorbancia de la fase superior frente a la absorbancia en la fase inferior, corregidas con el factor de dilución correspondiente (si lo hubiese), conforme a la definición dada en la Ecuación (2).

La determinación de la absorbancia de las fases en equilibrio correspondientes a los sistemas indicados en la Tabla 3 tuvo como resultados los valores presentados en las Tablas 6 a 9. En los sistemas en que la absorbancia presentó valores mayores a 1 se aplicó un factor de dilución para alcanzar valores de absorbancia menores o iguales a 1 en todas las muestras, y evitar saturación de la señal. El factor de dilución se obtuvo mediante pruebas de dilución para alcanzar valores de absorbancia menores o iguales a 1 en todas las muestras. Se obtuvieron preparando por pesada una mezcla de las respectivas fases y agua destilada, y se presentan en las tablas de los sistemas correspondientes en que se aplicó dilución. Las

regresiones lineales en función de las absorbancias determinadas para las fases de ambas líneas de reparto de cada sistema se pueden ver en las Figuras 9 a 12.

Tabla 9. Absorbancia de las fases en equilibrio para las 2 líneas de reparto del sistema PEG1500/Citrato de sodio.

PEG 1500 + Citrato de sodio + agua				
Muestra	TL1		TL2	
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
0	0,2908	0,1519	0,4508	0,1765
1	0,3598	0,1637	0,5002	0,1809
2	0,4368	0,1880	0,5847	0,1908
3	0,4851	0,2007	0,6457	0,2014

Tabla 10. Absorbancia de las fases en equilibrio para 2 líneas de reparto del sistema PEG4000/Citrato de sodio.

PEG 4000 + Citrato de sodio + agua				
Muestra	TL1		TL2	
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
0	0,1600	0,1216	0,2224	0,0859
1	0,2384	0,1853	0,2835	0,1039
2	0,2687	0,2102	0,4160	0,1811
3	0,2977	0,2382	0,4745	0,2030

Tabla 11. Absorbancia de las fases en equilibrio para 2 líneas de reparto del sistema PEG8000/Citrato de sodio.

PEG 8000 + Citrato de sodio + agua						
Muestra	TL1		TL2			
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Factor de dilución	Fase inferior	Factor de dilución
0	0,5694	0,2906	0,4421	3,990	0,1498	2,001
1	0,6456	0,3358	0,4626	3,897	0,1599	2,004
2	0,6903	0,3519	0,5370	3,992	0,1937	1,966
3	0,7187	0,3669	0,5926	3,965	0,2084	2,040

Tabla 12. Absorbancia de las fases en equilibrio para 2 líneas de reparto del sistema PEG1500/Tartrato de potasio.

PEG 1500 + Tartrato de potasio + agua				
Muestra	TL1		TL2	
	Fase superior	Fase inferior	Fase superior	Fase inferior
0	0,3564	0,2812	0,4102	0,1726
1	0,3766	0,3071	0,4510	0,1938
2	0,4255	0,3405	0,4997	0,2120
3	0,4478	0,3554	0,6031	0,2485
4	0,4558	0,3779	0,6307	0,2551

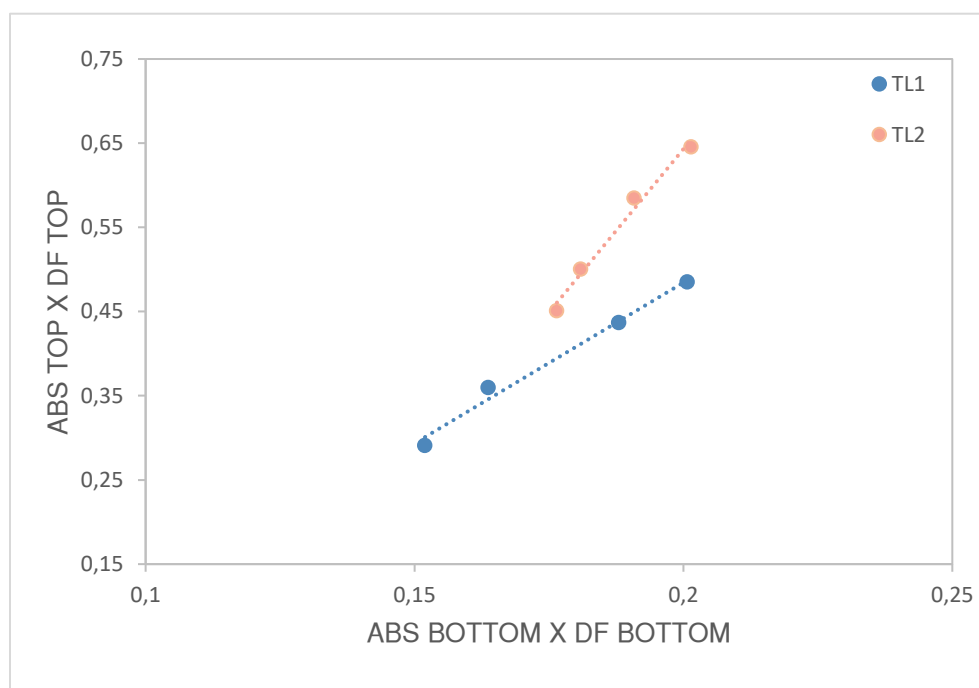


Figura 25. Absorbancia en la fase superior versus absorbancia en la fase inferior para las distintas líneas de reparto del sistema PEG1500/Citrato de sodio.

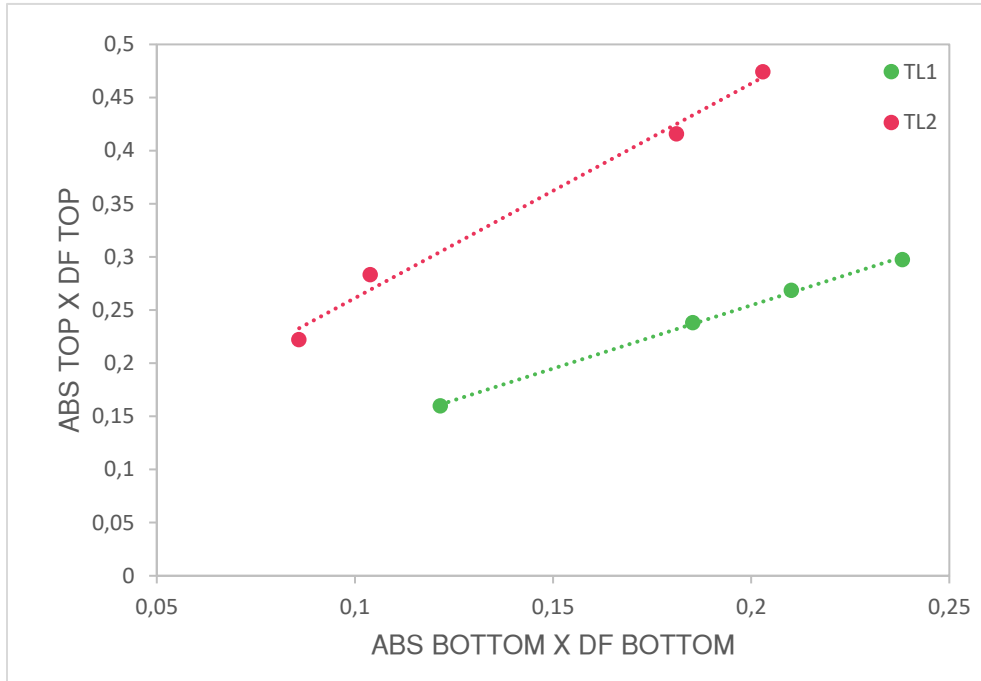


Figura 26. Absorbancia en la fase superior versus absorbancia en la fase inferior para las distintas líneas de reparto del sistema PEG4000/Citrato de sodio.

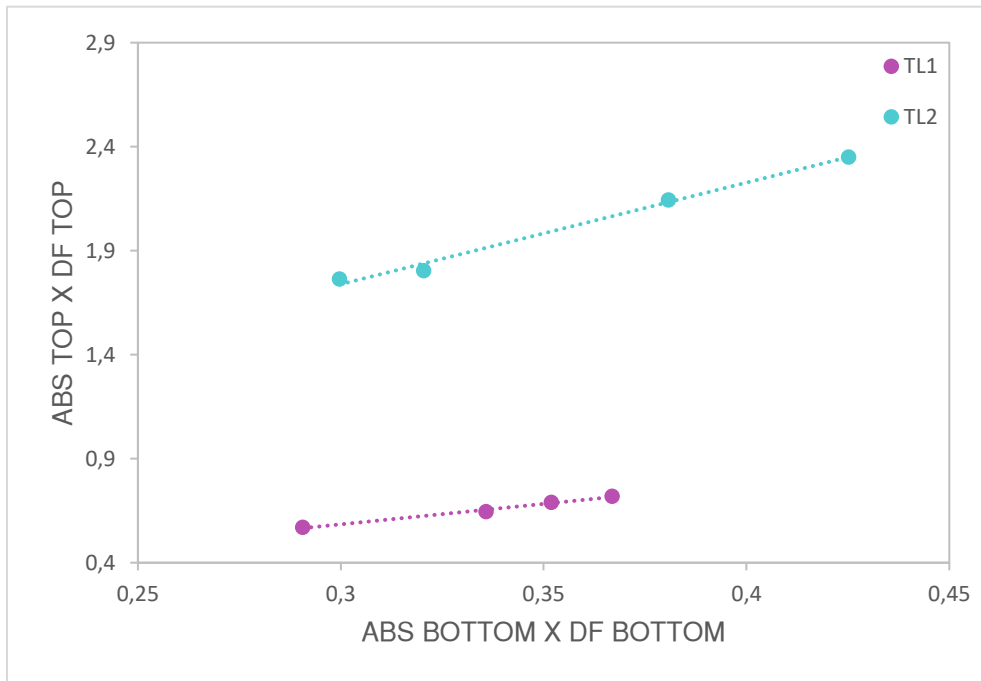


Figura 27. Absorbancia en la fase superior versus absorbancia en la fase inferior para las distintas líneas de reparto del sistema PEG8000/Citrato de sodio.

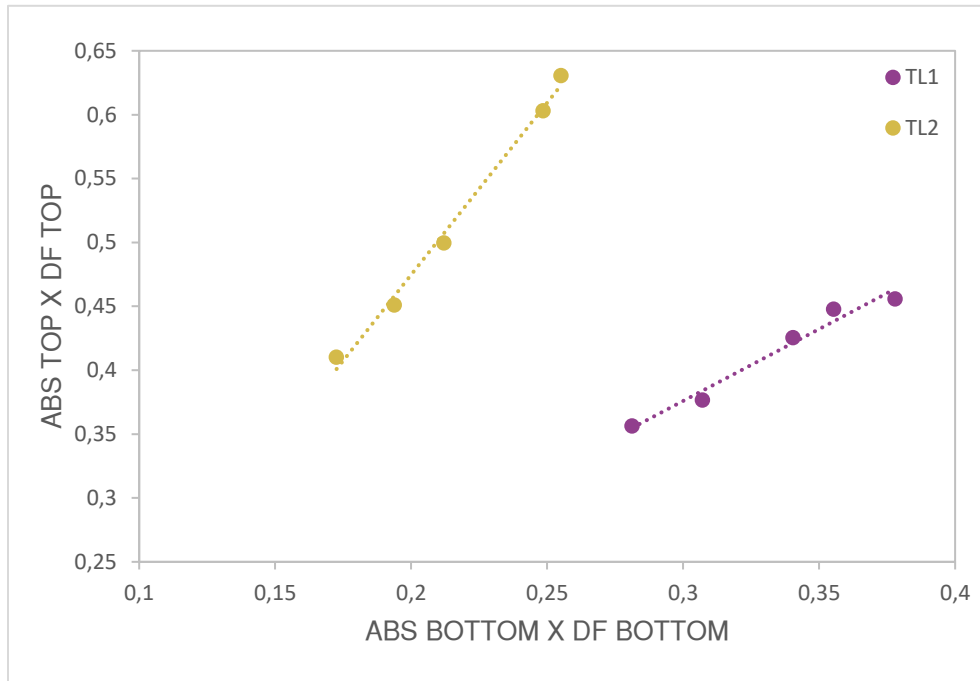


Figura 28. Absorbancia en la fase superior versus absorbancia en la fase inferior para las distintas líneas de reparto del sistema PEG1500/Tartrato de potasio.

En la Tabla 13 se presentan los coeficientes de reparto obtenidos por regresión lineal usando el programa SPSS Statistics 25, para cada sistema y recta de reparto estudiada. También se muestran los valores de error asociados al coeficiente (la pendiente en la regresión lineal) así como los coeficientes de determinación (r^2). Como se observa en la Tabla 13, se obtuvieron buenos ajustes, con valores de r^2 superiores a 0,97 en todos los casos, y una media de 0,99. Más importante, los errores en los coeficientes de reparto son consistentes, en el rango de 5 a 10%, nunca superiores al 10% y con una media de 7%.

Tabla 13. Composición de alimentación y coeficiente de reparto de la harina de pescado para distintos ATPS.

TL	Alimentación (wt)		K	R cuadrado	Error relativo
	Polímero	Sal			
PEG 1500 + Citrato de sodio + Agua					
1	0,1304	0,1549	$3,8 \pm 0,3$	0,986	8%
2	0,1521	0,1802	$7,8 \pm 0,7$	0,984	9%
PEG 4000 + Citrato de sodio + Agua					
1	0,1361	0,0942	$1,19 \pm 0,03$	0,999	2%
2	0,1831	0,1268	$2,0 \pm 0,2$	0,989	7%
PEG 8000 + Citrato de sodio + Agua					
1	0,1027	0,1091	$2,0 \pm 0,1$	0,991	7%
2	0,1382	0,1498	$4,9 \pm 0,3$	0,991	7%
PEG 1500 + Tartrato de potasio + Agua					
1	0,142	0,177	$1,1 \pm 0,1$	0,971	10%
2	0,129	0,287	$2,7 \pm 0,1$	0,993	5%

Los coeficientes obtenidos son todos mayores que 1, lo que significa que las proteínas de la harina de pescado presentan afinidad por la fase superior (rica en polímero). Los sistemas que presentaron un coeficiente de reparto más alto, esto es un reparto más favorable hacia la fase superior y, por ende, más efectivo, fueron los sistemas PEG1500/Citrato de sodio (TL2) y PEG8000/Citrato de sodio (TL2), con una K de $7,8 \pm 0,7$ y $4,9 \pm 0,3$ respectivamente. Sin embargo, los resultados obtenidos con PEG4000/Citrato de sodio (TL1) y PEG1500/Tartrato de potasio (TL1) fueron muy cercanos a la unidad, lo que apunta a que la proteína se repartió de manera semejante entre las fases, lo que resulta poco adecuado para la recuperación de proteínas, por lo que dichos sistemas serían los menos efectivos.

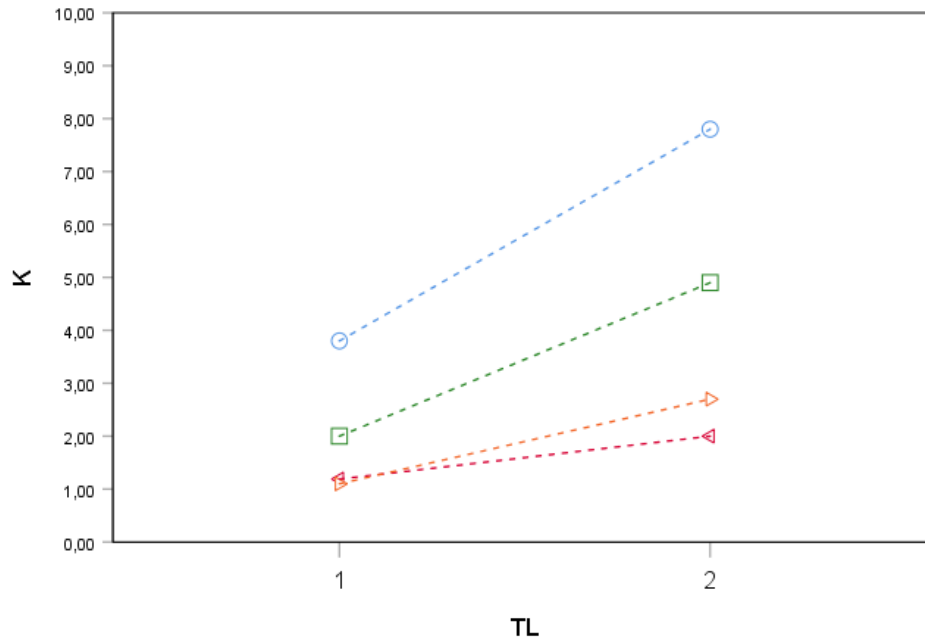


Figura 29. Coeficiente de reparto de la harina de pescado según la línea de reparto utilizada en cada ATPS. (○) PEG1500/Citrato de sodio, (◻) PEG4000/Citrato de sodio, (▷) PEG8000/Citrato de sodio, (◁) PEG1500/Tartrato de potasio. (Elaboración propia)

Para analizar el efecto de la concentración del sistema de dos fases acuosas (la recta de reparto del sistema seleccionado), en la Figura 29 se presenta el coeficiente de reparto de la harina de pescado en los diferentes ATPS en función de la línea de reparto utilizada. Esta figura muestra que, en todos los casos, la concentración de polímero y de sal en el sistema tiene un claro impacto en el coeficiente de reparto, donde a mayor concentración de los agentes formadores de fase, mayor coeficiente de reparto. Los mayores coeficientes de reparto significan un aumento en la recuperación de la harina de pescado en la fase superior. Al aumentar la concentración del polímero y la sal en los sistemas bifásicos (esto es, al usar rectas de reparto con mayor concentración) se incrementan las diferencias entre ambas fases en equilibrio. En este caso, se promueve un ambiente más hidrofóbico en la fase rica en polímero, y por su parte también, un ambiente más hidrófilo en la fase rica en sal. Lo que implica que proteínas como la harina de pescado, con mayor afinidad por la fase superior, aumentan su coeficiente de reparto. Por ende, en este caso una mayor longitud de la recta de reparto favorece la partición de las proteínas.

4.2.2. Influencia del peso molecular del polímero

Con el objetivo de estudiar la influencia del peso molecular del polímero, se compararon los resultados (Tabla 3) obtenidos con los ATPS compuestos por citrato de sodio como sal fija y 3 pesos moleculares de PEG (1500, 4000 y 8000 g/mol), considerando para cada sistema las 2 composiciones de alimentación especificadas. Se observa que los coeficientes de reparto de la proteína de harina de pescado tuvieron un máximo con PEG 1500 y un mínimo con PEG 4000, con resultados intermedios para PEG 8000. Esto se aprecia gráficamente en la Figura 30, que representa los coeficientes de reparto obtenidos en función del peso molecular del polímero estudiado y la línea de reparto correspondiente.

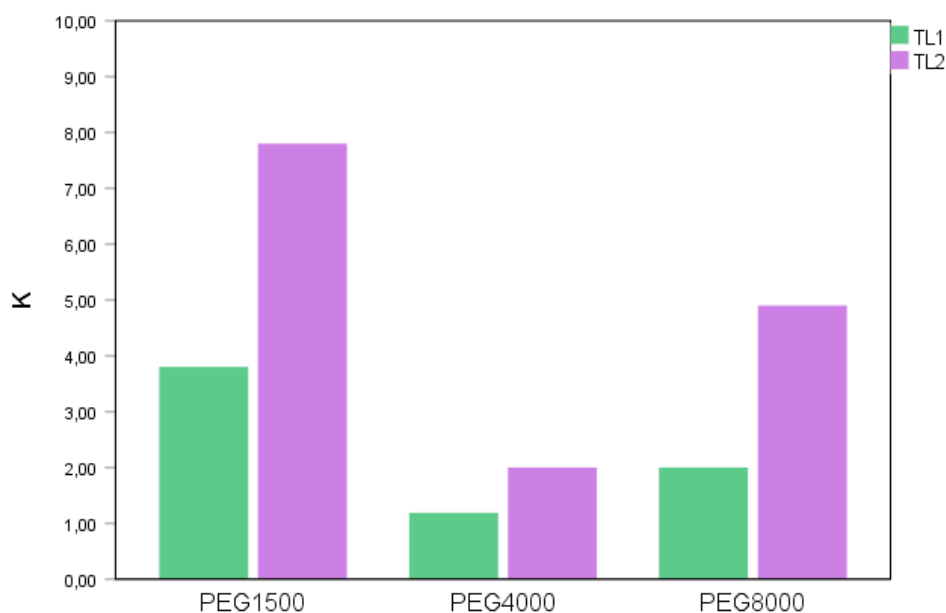


Figura 30. Coeficiente de reparto de la harina de pescado en función del peso molecular del polímero para 2 líneas de reparto. (Elaboración propia)

La Figura 30 muestra que tanto el peso molecular del polímero como el tamaño de la recta de reparto afectan significativamente al coeficiente de reparto. La recta de reparto de mayor tamaño proporciona, en todos los casos, mayores coeficientes de reparto. En cuanto a la influencia del peso molecular, e independientemente del tamaño de la recta de reparto, los pesos moleculares extremos favorecen mayores coeficientes de reparto. Frecuentemente, un aumento del peso molecular de PEG aumenta la hidrofobicidad y el volumen excluido de la fase superior rica en polímero, por lo que disminuiría el coeficiente. Sin embargo, una fuerte

interacción entre soluto y un polímero de mayor peso molecular, podría justificar el aumento, y por lo tanto el comportamiento no lineal con esta variable.

4.2.3. Influencia del tipo de sal

Con el objetivo de estudiar la influencia del tipo de sal, se compararon los resultados (Tabla 3) obtenidos con los ATPS compuestos por PEG1500 con citrato de sodio y tartrato de potasio, considerando para cada sistema las 2 composiciones de alimentación especificadas, y que se presentan en la Figura 31. Queda en evidencia que el coeficiente de reparto cambia con la naturaleza de las sales. Existe una diferencia significativa entre los coeficientes de reparto obtenidos con cada sal, siendo los resultados con citrato de sodio muy superiores a los del tartrato de potasio (aproximadamente el triple). La carga eléctrica de cada sal, determinada por los iones presentes en ellas, es uno de los factores que influye en la solubilidad de las proteínas, cumpliendo un rol importante en la separación relacionado al efecto de salinización que, dependiendo del tipo de sal, puede aumentar o disminuir las interacciones hidrofóbicas y con ello desplazar una mayor o menor cantidad de proteína a la fase superior (efecto de *salting out*).

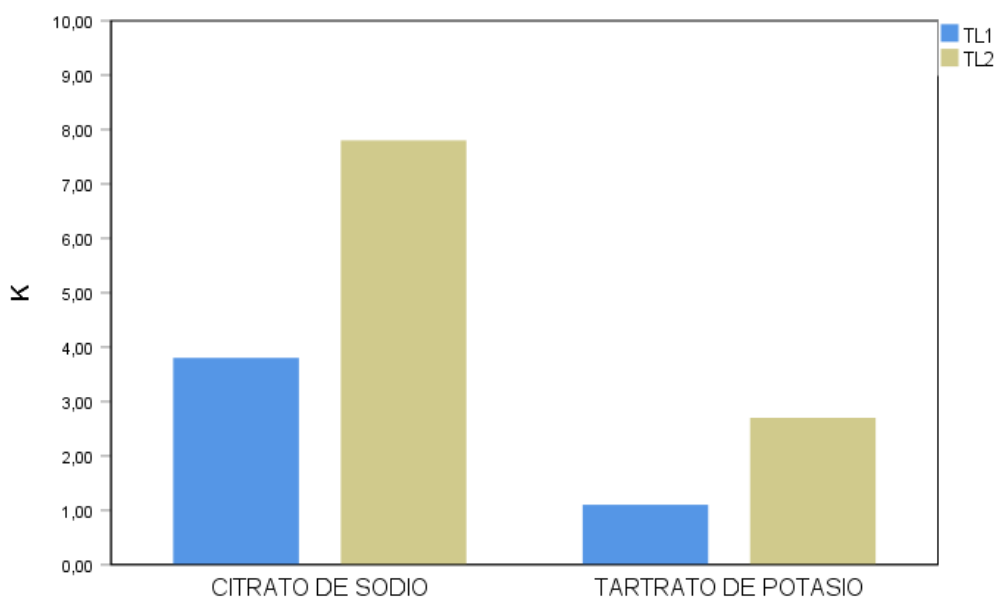


Figura 31. Coeficientes de reparto de la harina de pescado con los sistemas PEG1500/Citrato de sodio y PEG1500/Tartrato de potasio para 2 líneas de reparto. (Elaboración propia)

5. Conclusiones

Siguiendo la motivación de recuperar proteínas presentes en efluentes acuosos de la industria de pescado, este trabajo aprovecha las ventajas de los sistemas de dos fases acuosas para cuantificar los coeficientes de reparto de las proteínas presentes en la harina de pescado en dichos sistemas y medir así el potencial para su recuperación.

Tras llevar a cabo pruebas con los métodos de espectrofotometría ultravioleta y Bradford, se constató su incompatibilidad con el tipo y rango de concentración de las proteínas de harina de pescado y/o los componentes formadores de fases (polímero, sal), lo que llevó a descartar su uso en este estudio. Sin embargo, el método BCA demostró ser altamente efectivo para cuantificar las proteínas totales presentes en la harina de pescado en sistemas de dos fases acuosas, abarcando el rango de concentraciones de interés y mostrando errores dentro de límites aceptables.

Los resultados de este estudio revelan que las proteínas muestran mayor afinidad por la fase superior (rica en polímero), ya que los coeficientes de reparto obtenidos son en todos los casos mayores que 1. Entre los sistemas evaluados, aquellos que demostraron una mayor eficacia en la recuperación, y, por lo tanto, se consideran más efectivos, fueron los sistemas PEG1500/Citrato de sodio y PEG8000/Citrato de sodio, ambos en su formulación más concentrada, con coeficientes de $7,8 \pm 0,7$ y $4,9 \pm 0,3$, respectivamente. Por otro lado, los sistemas PEG4000/Citrato de sodio y PEG1500/Tartrato de potasio, ambos en su formulación más diluida, mostraron resultados cercanos a la unidad, indicando que la proteína se distribuyó de manera semejante entre ambas fases, lo que los convierte en los sistemas menos adecuados para la recuperación de proteínas de harina de pescado.

El estudio de la influencia de la línea de reparto empleada ha puesto de manifiesto la importancia crucial de la concentración del sistema de dos fases acuosas (la selección de la recta de reparto) en la separación de las proteínas. Se ha demostrado que, en todos los casos, el aumento de la concentración de polímero y sal en los sistemas de dos fases acuosas, esto es, el uso de una formulación o recta de reparto más concentrada promueve una mayor afinidad de las proteínas por la fase superior y, por tanto, una recuperación más efectiva en dicha fase.

Se ha evaluado el efecto del peso molecular del polímero en la partición de las proteínas, determinando el coeficiente de reparto en 3 sistemas PEG/Citrato de sodio formulados con PEG de peso molecular 1500, 4000 y 8000 g/mol. Los resultados obtenidos demuestran que el peso molecular del polímero ejerce una influencia significativa. El aumento en el peso molecular del polímero provoca al mismo tiempo una mayor hidrofobicidad de la fase superior (la hidrofobicidad del polímero aumenta con el tamaño de la macromolécula) y un aumento del volumen excluido en dicha fase. El primer factor aumenta la afinidad de las proteínas por la fase rica en polímero, ya que las proteínas son, mayoritariamente, compuestos con menor polaridad (comparadas por ejemplo con las sales). Sin embargo, el aumento del volumen excluido reduce dicha afinidad. Así, se observó que los mejores coeficientes de reparto se obtuvieron con el peso molecular más alto y bajo, mientras que el PEG 4000, intermedio, presentó los peores resultados.

Se ha evaluado el efecto del tipo de sal utilizada en la formulación, determinando el coeficiente de reparto en dos sistemas formulados con el mismo polímero, PEG 1500, y dos sales (de origen orgánico) diferentes: citrato de sodio y tartrato de potasio. La comprensión detallada de cómo diferentes sales influyen en el comportamiento de las proteínas en estos sistemas apunta al rol fundamental de la naturaleza de las sales y las posibles interacciones de las proteínas con los iones de dicha sal, lo que a su vez afecta el coeficiente de reparto. Se ha demostrado que el citrato de sodio es mucho más eficaz en la separación que el tartrato de potasio, al tener menor afinidad por las proteínas y favorecer su concentración en la fase polimérica. Sin embargo, no se ha podido determinar si este efecto se debe al anión, al catión, o a ambos. Sería necesario el estudio de la distribución de proteínas en sistemas formulados con diferentes sales con ion común para cuantificar y discriminar los efectos de diferentes aniones y cationes.

6. Referencias

- [1] World Economic Forum. (2023). The Global Risks Report. Consultado el 27/07/2023 en <https://www.weforum.org/reports/global-risks-report-2023/>
- [2] G. Durán-Romero. (2019). Progresando hacia un modelo de economía circular. *Economistas*, vol. 162-163, pp. 211-215.
- [3] Naciones Unidas. (2018). La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe. Consultado el 27/07/2023 en <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/40155.4>
- [4] J. Kirchherr, D. Reike, M. Hekkert. (2017). Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions, *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 127, pp. 221-232. DOI: 10.1016/j.resconrec.2017.09.005.
- [5] Ellen MacArthur Foundation. (2013). Towards the circular economy Vol 1: an economic and business rationale for an accelerated transition. Consultado el 27/07/2023 en <https://ellenmacarthurfoundation.org/towards-the-circular-economy-vol-1-an-economic-and-business-rationale-for-an>
- [6] Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO). (2020). ESPAÑA CIRCULAR 2030 Estrategia Española de Economía Circular. Consultado el 27/07/2023 en <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/economia-circular/estrategia.html>
- [7] ANFACO-CECOPESCA. (2020). Memoria de Actividades Científico-Tecnológicas. Consultado el 27/07/2023 en <https://anfaco.es/fotos/biblioteca/docs/transparencia/2021/MEMORIA%202020%20DEFINITIVA%20vf.pdf>
- [8] E. Martínez Montaña, J. A. Salazar Leyva, I. Osuna Ruiz. (2022). Proteínas y Péptidos de Residuos Líquidos Pesqueros: Obtención, Bioactividad y Uso en la Alimentación Acuícola. *Avances En Nutrición Acuicola*, vol. 1(1), pp.50–70. Consultado el 27/07/2023 en <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/355>

- [9] COWI Consulting Engineers and Planners AS, Denmark. (2000). Cleaner Production Assessment in Fish Processing, *United Nations Environment Programme Division of Technology, Industry and Economics and Danish Environmental Protection Agency*. Consultado el 27/07/2023 en <https://digitallibrary.un.org/record/441680>
- [10] S. Muñoz Lucas, R. Sanchez García. (2018). El agua en la industria alimentaria, *Boletín de la Sociedad Española de Hidrología Médica*, vol. 33(2), pp.157-171. DOI: 10.23853/bsehm.2018.0571.
- [11] V. H. Nagaraja, R. Iyyaswami. (2015). Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation», *J Food Sci Technol*, vol. 52, pp. 3539-3548. DOI: 10.1007/s13197-014-1425-4.
- [12] Chia-Ling JAO, Wen-Ching KO. (2002). Utilization of cooking juice of young tuna processed into canned tuna as condiments: Effect of enzymatic hydrolysis and membrane treatment», *Fisheries Science*, vol. 68, pp. 1344-1351. DOI: 10.1046/j.1444-2906.2002.00574.x
- [13] K. C. Hsu, G. H. Lu, C. L. Jao. (2009). Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*), *Food Research International*, vol. 42(5-6), pp. 647-652. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.02.014.
- [14] E. Sanmartín, J. C. Arboleya, F. J. Moreno. (2009). Recent Advances in the Recovery and Improvement of Functional Proteins from Fish Processing By-Products: Use of Protein Glycation as an Alternative Method, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 8(4), pp. 332-344. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00083.x
- [15] P. A. Albertsson. (1985). *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Wiley, 3ª edición.
- [16] M. González-Amado, E. Rodil, A. Arce, A. Soto, O. Rodríguez. (2016). The effect of temperature on polyethylene glycol (4000 or 8000)–(sodium or ammonium) sulfate Aqueous Two Phase Systems, *Fluid Phase Equilib*, vol. 428, pp. 95-101. DOI: 10.1016/j.fluid.2016.06.019.

- [17] S. Raja, V. R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, V. Ramesh. (2012). Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review, *Science and Technology*, vol. 1(1), pp. 7-16. DOI: 10.5923/j.scit.20110101.02.
- [18] T. Varadavenkatesan, S. Pai, R. Vinayagam, A. Pugazhendhi, R. Selvaraj. (2021). Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems – A review, *Science of the Total Environment*, vol. 778, 146293. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146293.
- [19] M. Rito-Palomares, J. Benavides. (2017). Aqueous Two-Phase Systems for Bioprocess Development for the Recovery of Biological Products. Springer. ISBN: 978-3-319-59309-8. DOI: 10.1007/978-3-319-59309-8.
- [20] R. Iyyaswami, P. D. Belur, B. Girish, V. H. Nagaraj. (2012). Development and Evaluation of PEG-Lithium Citrate Salt Based Aqueous Two-Phase System and Its Application in Partitioning of Proteins from Fish Industry Effluent, *Sep Sci Technol*, vol. 47(4), pp. 591-598. DOI: 10.1080/01496395.2011.626009.
- [21] D. Ramyadevi, A. Subathira, S. Saravanan. (2012). Central composite design application for optimization of aqueous two-phase extraction of protein from shrimp waste, *J Chem Pharm Res*, vol. 4(4), pp. 2087-2095.
- [22] S. C. Silvério, A. Wegrzyn, E. Lladosa, O. Rodríguez, E. A. MacEdo. (2012). Effect of aqueous two-phase system constituents in different poly(ethylene glycol)-salt phase diagrams, *J Chem Eng Data*, vol. 57(4), pp. 1203-1208. DOI: 10.1021/je2012549.
- [23] K. Wysoczanska, E. A. Macedo. (2016). Effect of molecular weight of polyethylene glycol on the partitioning of DNP-amino acids: PEG (4000, 6000) with sodium citrate at 298.15 K, *Fluid Phase Equilib*, vol. 428, pp. 84-91. DOI: 10.1016/j.fluid.2016.07.009.
- [24] M. González-Amado, E. Rodil, A. Arce, A. Soto, O. Rodríguez. (2018). Polyethylene glycol (1500 or 600) – potassium tartrate aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib*, vol. 470, pp. 120-125. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.11.009.
- [25] H. García Arellano, R. Vázquez Duhalt. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión, *BioTecnología*, vol. 3, pp. 77-88.