



Universidad de Cantabria
E. T. S. de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación
Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular

NUEVO PROCESO DE RECUPERACIÓN DE LACTOFERRINA: REPARTO EN TRES FASES BASADO EN LÍQUIDOS IÓNICOS

*Novel process for lactoferrin recovery:
Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP)*

Memoria de tesis doctoral presentada para optar al título de
Doctor por la Universidad de Cantabria

Enrique Álvarez Guerra

Director de tesis:
Prof. Dr. Ángel Irabien Gulías

Santander, 2014



Universidad de Cantabria

**Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales y de
Telecomunicación**

Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular

**“Nuevo proceso de recuperación de lactoferrina:
reparto en tres fases basado en líquidos iónicos”**

**“Novel process for lactoferrin recovery:
Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP)”**

Memoria de tesis doctoral presentada para optar al título de
Doctor por la Universidad de Cantabria

Programa Oficial de Doctorado en Ingeniería Química y de Procesos
(BOE núm. 36, de 10 de febrero de 2010. RUCT: 5311209)
con Mención hacia la Excelencia
(BOE núm. 253, de 20 de Octubre de 2011. Referencia: MEE2011-0031)

Enrique Álvarez Guerra

Director de tesis:

Prof. Dr. Ángel Irabien Gulías

Santander, junio 2014

La tesis doctoral se presenta como un resumen de trabajos previamente publicados o aceptados para su publicación en revistas científicas incluidas en el *Journal of Citation Reports-Science Edition (JCR)*, cumpliendo con la normativa existente en la Universidad de Cantabria y en el Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular referente a la elaboración de tesis doctorales por compendio de artículos. Durante la realización de la tesis doctoral se ha llevado a cabo una estancia predoctoral de tres meses de duración (10 junio-11 septiembre 2013) en el *Departamento de Química* de la *Universidade de Aveiro* (Portugal), bajo la supervisión del Prof. Dr. João A.P. Coutinho.

A continuación se listan las publicaciones que forman parte de la presente tesis:

Compendio de artículos publicados/aceptados:

1. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Separation and Purification Technology*, **2012**, 98, 432-440.
2. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Separation Science and Technology*, **2014**, 49, 957-965.
3. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **aceptado (en prensa)**, DOI: 10.1002/jctb.4401.
4. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilibria*, **2014**, 371, 67-74.
5. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho, J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE Journal*, **aceptado (en prensa)**, DOI: 10.1002/aic.14530.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España a través de los proyectos CTM2006-00317 *Sostenibilidad de la Producción: Intensificación e integración de procesos en la industria química y transformadora* y EUI2008-03857 *Proyecto MIL: Nuevas Membranas estímulo-respuesta para procesos de separación innovadores*.

La lactoferrina empleada en los experimentos llevados a cabo en la presente tesis doctoral ha sido proporcionada de forma desinteresada por *The Tatua Co-operative Dairy Company Limited* (Nueva Zelanda).

Durante la ejecución del presente trabajo, su autor, Enrique Álvarez Guerra, ha disfrutado de una beca F.P.U. (Formación de Profesorado Universitario) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España concedida por resolución de 30 de noviembre de 2011 (BOE de 20 de diciembre de 2011), con referencia AP2010-4942, y de una plaza de ayudante LOU de la Universidad de Cantabria. Asimismo, Enrique Álvarez Guerra ha disfrutado de una ayuda económica del Vicerrectorado de Profesorado de la Universidad de Cantabria para la realización de una estancia breve de investigación de tres meses de duración en la *Universidade de Aveiro* (Aveiro, Portugal).

Por todo ello, el agradecimiento más sincero hacia dichas instituciones y entidades.

Agradecimientos

Como bien escribió Jorge Manrique, nuestras vidas son como los ríos y la realización de la tesis doctoral constituye un importante tramo en aquellos ríos que llegan a la mar como doctores. En todos los ríos, únicamente una pequeña fracción del agua vertida al mar procede de la cabecera del río, perteneciendo la gran mayoría de la corriente en la desembocadura al agua que los afluentes han ido con generosidad aportando al río. Por ello, es de justicia reconocer y agradecer a todas aquellas personas que, como afluentes a los ríos, me han posibilitado crecer tanto en lo profesional como en lo personal.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincera gratitud a mi director de tesis, Prof. Dr. Ángel Irabien. Sin su confianza, su ayuda y sus ánimos esta tesis no hubiese sido posible. Asimismo, me gustaría agradecer todas las oportunidades que el Prof. Dr. Ángel Irabien me ha brindado, puesto que profesionalmente lo es todo para mí: no sólo mi director de tesis, sino investigador responsable del grupo de investigación SOSPROCAN-DePRO y responsable del grupo docente a los que, con enorme orgullo, pertenezco. Su capacidad y su dedicación es un ejemplo a seguir para todos los que trabajamos bajo su dirección.

I am also very grateful to Prof. Dr. João A.P. Coutinho and all the members of PATH research group from Universidade de Aveiro, Portugal, for giving me the opportunity to complete a short research stay with them. I would like to stand out the professionalism, advice, friendliness and support of Prof. Dr. João A.P. Coutinho. I also thank all the generosity and help provided by Dr. Sónia P.M. Ventura, who always has assisted me even before she knew I was going to carry out a research with them. My gratitude is also for all the PATH-family for their kindness and for making me feel one more in the research group since the first hour I was there.

Asimismo, me gustaría destacar la contribución de todos mis profesores del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular, por todas las enseñanzas recibidas, por toda la ayuda prestada, así como por haber acrecentado y afianzado mi interés por la Ingeniería Química. En este punto, he de resaltar la labor de apoyo y afecto que siempre he recibido desde la dirección del Departamento y de la Escuela por parte de la Prof.^a Dr.^a Inmaculada Ortiz, Prof.^a Dr.^a Ane Urriaga, Prof.^a Dr.^a Raquel Ibáñez y Prof.^a Dr.^a María José Rivero.

También deseo agradecer a los técnicos de laboratorio y al Personal de Administración y Servicios del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular la amabilidad y el buen trato siempre recibidos, facilitándome las labores técnicas y de gestión del día a día.

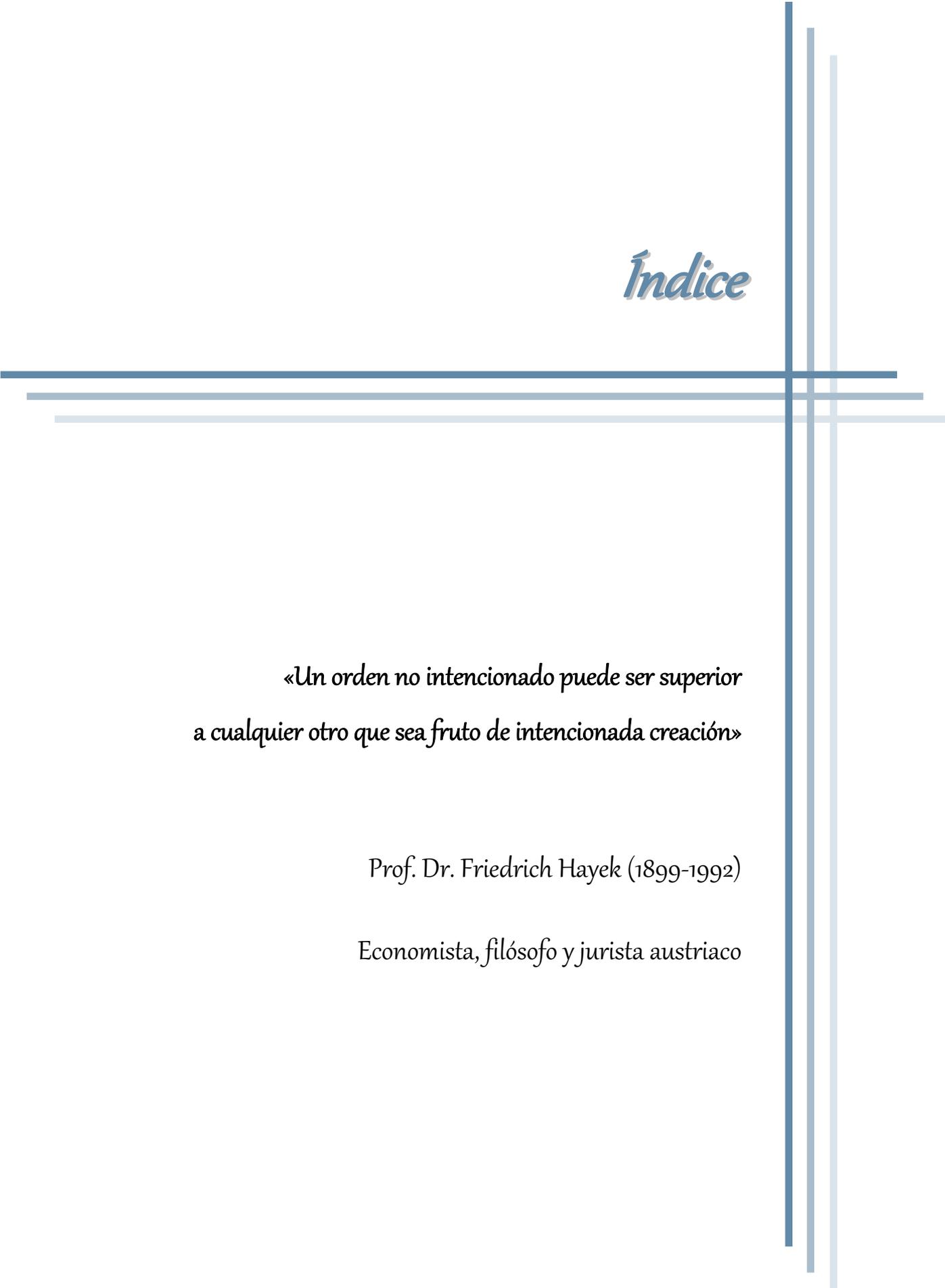
Por supuesto, quiero expresar mi agradecimiento a todos mis compañeros del Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular, por el cariño y la ayuda que siempre me han prestado, haciéndome más agradable el día a día y sintiéndome miembro de una gran familia. Es un honor tenerles de compañeros. Especialmente querría resaltar la disponibilidad a colaborar y el apoyo que Gabriel Zarca y, en la última etapa, Andrés del Castillo, siempre me han brindado, acompañándome y estando a mi lado en aventuras independientemente de lo difícil o laboriosas que estas fueran.

No puedo dejar de mencionar a los extraordinarios compañeros de despacho que he tenido, especialmente al Dr. Antonio Dominguez-Ramos, Dr. Jonathan Albo, Dr.^a Esther Santos y Dr. Jorge Cristóbal. El ambiente de trabajo creado gracias a ellos es inmejorable, combinando de forma óptima la tranquilidad necesaria para avanzar en el quehacer diario con la alegría y distensión que se requieren para trabajar a gusto y sentirme como en casa. Puesto que el ambiente de trabajo es óptimo, puedo afirmar que he tenido a los mejores compañeros de despacho. A su vez, querría agradecer muy especialmente la ayuda y el apoyo que el Dr. Antonio Dominguez-Ramos siempre me ha prestado, compartiendo inquietudes profesionales, tanto científicas como de representación, y personales.

Desde luego, dedico un agradecimiento muy especial a todos mis amigos, porque siempre he sentido su cariño y afecto, viendo cómo celebraban y se alegraban tanto o más que yo en los buenos momentos y cómo han estado a mi lado cuando los he necesitado. Mil gracias. Espero que queden muchas partidas de fútbol por jugar, muchas tertulias políticas, muchas celebraciones por Santander, Madrid o el lugar que sea... Always on my mind.

Finalmente, debo agradecer a mi familia, y muy especialmente, a mis padres y a mi hermano, todo el amor que he recibido de ellos sin el cual jamás habría podido conseguir nada. El valor y la importancia para mí de su comprensión, paciencia y apoyo incondicional es incalculable. Mi amor por ellos es infinito porque les debo todo.

Por todo ello, quiero agradecer a todos mis afluentes toda el agua que me han aportado y que conforman la mayoría del caudal que ahora es mi vida. Muchas gracias, por tanto, porque la mayor parte de esta tesis es vuestra.



Índice

*«Un orden no intencionado puede ser superior
a cualquier otro que sea fruto de intencionada creación»*

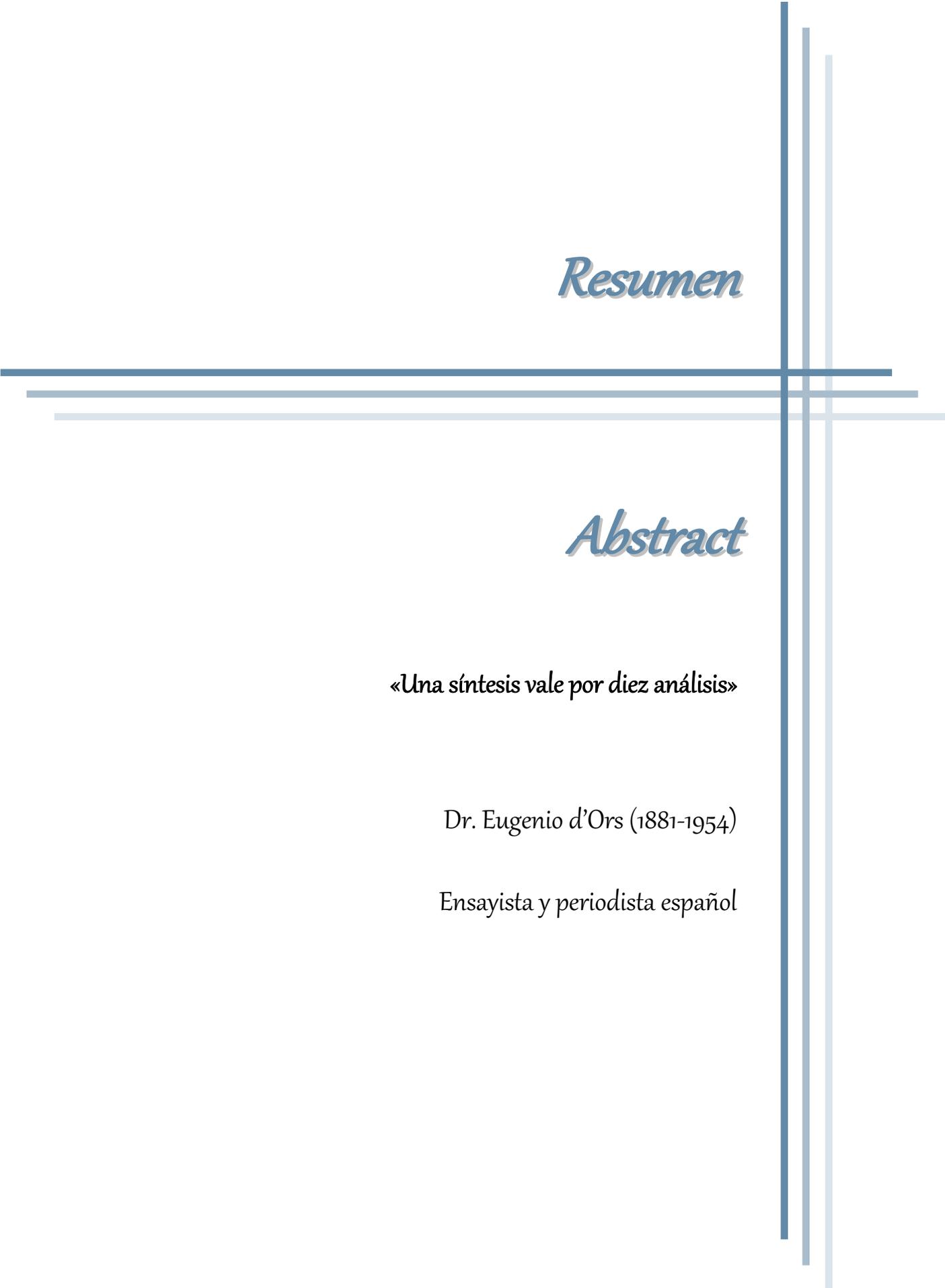
Prof. Dr. Friedrich Hayek (1899-1992)

Economista, filósofo y jurista austriaco

ÍNDICE

RESUMEN / <i>ABSTRACT</i>	1
CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO	7
1.1. Justificación y antecedentes	9
1.2. Técnicas predecesoras del reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP)	11
1.2.1. Sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS)	11
1.2.2. Reparto en tres fases (TPP)	16
1.3. El lactosuero bovino como fuente de proteínas	19
1.4. Objetivos y estructura de la tesis	22
1.5. Referencias del Capítulo 1	23
CAPÍTULO 2. DESARROLLO	35
2.1. Experimentos previos de extracción de lactoferrina con líquidos iónicos hidrofóbicos	37
2.2. Viabilidad de la separación de lactoferrina mediante reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP)	47
2.3. Propiedades y equilibrio termodinámico del sistema BmimTfO/NaH ₂ PO ₄ /H ₂ O para la separación/concentración de lactoferrina	67
2.4. Estrategias para la recuperación del líquido iónico en el proceso ILTPP	77
2.5. Nomenclatura del Capítulo 2	94
2.6. Referencias del Capítulo 2	97

CAPÍTULO 3. CONCLUSIONES / CHAPTER 3. CONCLUSIONS	103
3.1. Conclusiones	105
3.2. Progreso de la investigación	107
<i>3.1. Conclusions</i>	109
<i>3.2. On-going research</i>	111
CAPÍTULO 4. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS / CHAPTER 4. SCIENTIFIC ARTICLES	113
4.1. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, <i>Sep. Purif. Technol.</i> , 2012, 98, 432-440.	115
4.2. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, <i>Sep. Sci. Technol.</i> , 2014, 49, 957-965.	127
4.3. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, <i>J. Chem. Technol. Biotechnol.</i> , aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/jctb.4401.	139
4.4. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, <i>Fluid Phase Equilibr.</i> , 2014, 371, 67-74.	149
4.5. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho, J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), <i>AIChE Journal</i> , aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/aic.14530.	159
ANEXO. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	171
A.1. Artículos científicos relativos a la presente tesis doctoral (2011-2014)	173
A.2. Capítulo de libro relativo a la presente tesis doctoral (2011-)	174
A.3. Comunicaciones a congresos relativas a la presente tesis doctoral (2011-2014)	175
A.4. Producción científica anterior al doctorado	179



Resumen

Abstract

«Una síntesis vale por diez análisis»

Dr. Eugenio d'Ors (1881-1954)

Ensayista y periodista español

RESUMEN

La separación de proteínas de medios complejos como el lactosuero bovino suele representar entre el 50 y el 80 % de los costes de producción, por lo que esta etapa constituye el cuello de botella para su valorización. La extracción líquido-líquido puede tener un gran potencial para reducir estos costes, debido a su mayor capacidad, selectividad e integración de las etapas de recuperación y purificación respecto a las técnicas convencionales. Además, la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales por líquidos iónicos permite superar los principales problemas ambientales y de seguridad asociados a la extracción.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo desarrollar una técnica innovadora para la recuperación de proteínas basada en líquidos iónicos. Para ello, el proceso a desarrollar debe permitir tanto la recuperación de la proteína como la reutilización del líquido iónico, dos cuestiones poco estudiadas en este campo y que son claves para su viabilidad técnica. Como proteína de interés, se ha escogido la lactoferrina, presente en el lactosuero bovino en bajas concentraciones y que destaca por sus propiedades nutracéuticas.

De este modo, tras comprobar la imposibilidad de reextraer la lactoferrina de líquidos iónicos hidrofóbicos de base imidazolio, se propone una nueva técnica que consiste en sistemas de tres fases basados en líquidos iónicos (ILTPP, *Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning*). Esta técnica ILTPP emplea los mismos sistemas líquido iónico/sal que los sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILTAPS, *Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems*) para obtener resultados que son característicos de la técnica de reparto en tres fases (TPP, *Three Phase Partitioning*), por cuanto la proteína de interés se acumula en la interfase líquido-líquido formando una capa blanquecina, evitando así la etapa de reextracción.

El sistema ILTPP más adecuado para el desarrollo de la técnica es el basado en BmimTfO y NaH_2PO_4 , con el que se consigue recuperar en la interfase entre el 83 y el 99 % de la lactoferrina introducida en el sistema. Además, la selectividad con respecto a la seroalbúmina bovina (BSA) varía entre 1 y 3 dependiendo de las condiciones experimentales. Por consiguiente, esta técnica puede emplearse para recuperar proteínas específicas como la lactoferrina o bien grupos de ellas, como las proteínas del lactosuero bovino.

En relación a la reutilización del líquido iónico, el estudio y caracterización de los sistemas ILTPP permite concluir que, en función de la concentración de la proteína en la alimentación, pueden reducirse las pérdidas de líquido iónico por debajo del 1 % sin necesidad de ninguna etapa de recuperación adicional. No obstante, la evaporación a vacío de parte del agua contenida en la fase rica en sal conduce a que se pueda reutilizar la práctica totalidad del líquido iónico y sal del sistema, con lo que la técnica ILTPP no precisaría de un consumo neto de reactivos.

ABSTRACT

The separation of proteins from complex mixtures such as bovine whey usually represents between 50 and 80 % of total production costs, so it constitutes the major bottleneck for their valorization. Liquid-liquid extraction seems to have a great potential to reduce these costs due to its higher capacity, selectivity and integration between recovery and purification with respect to conventional techniques. Moreover, the replacement of conventional organic solvents by ionic liquids allows overcoming the main environmental and safety problems associated with extraction.

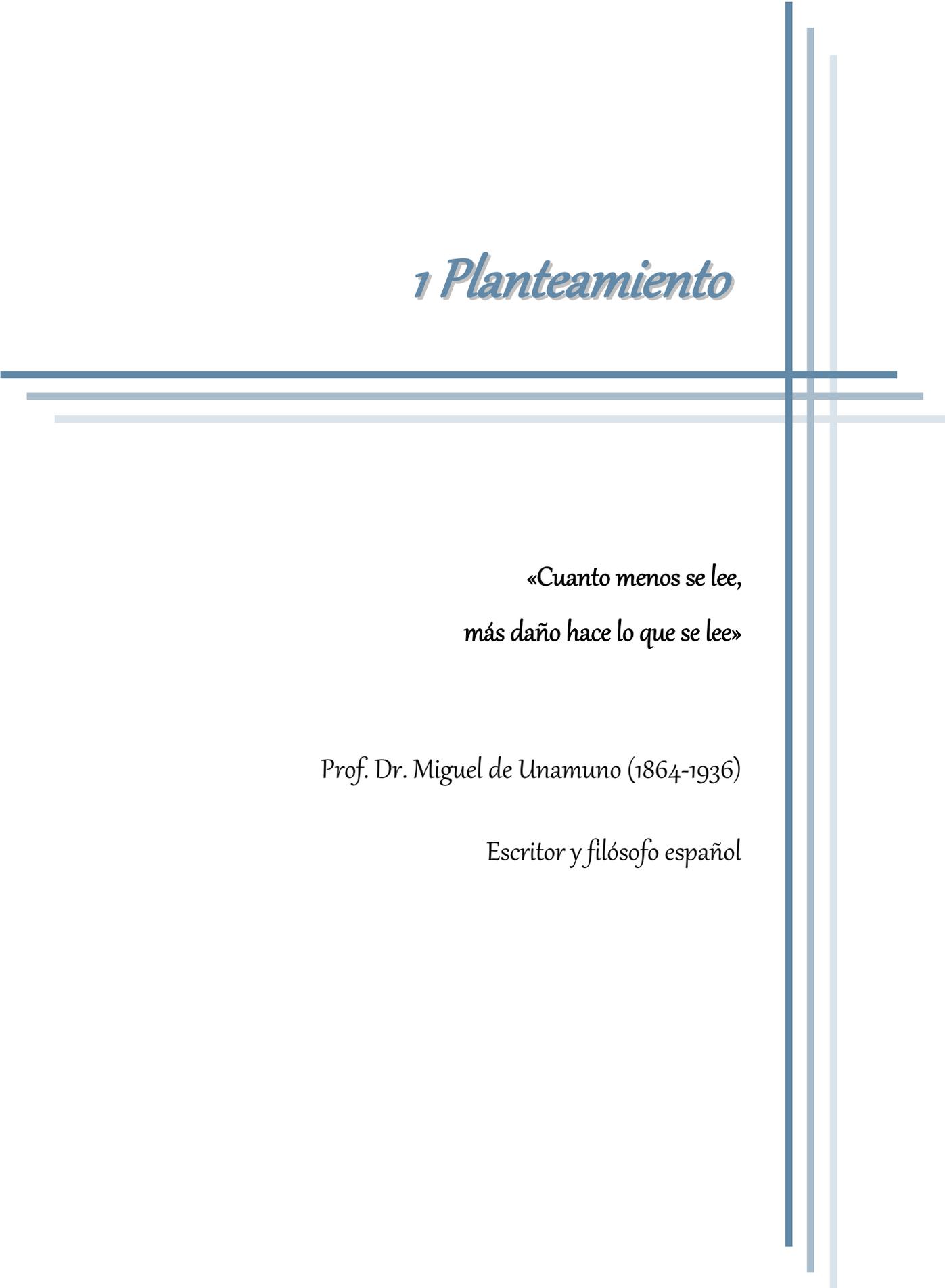
The aim of this PhD thesis is the development of an innovative technique for protein recovery based on ionic liquids. For this purpose, this technique should be able to recover the protein as well as to reuse the ionic liquid, two issues about which there are very few studies in this field but that are crucial for the technical viability of the process. Lactoferrin, which is present in the bovine whey at low concentrations, is selected as protein of interest due to its important nutraceutical properties.

In this way, considering the impossibility of the lactoferrin back-extraction from hydrophobic imidazolium-based ionic liquids, a new technique called Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) is proposed. The ILTPP technique uses the same ionic liquid/salt systems as the Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems (ILATPS) to obtain results that are characteristic of the Three Phase Partitioning (TPP) technique, since the protein of interest is accumulated at the liquid-liquid interface forming a white layer and avoiding the back-extraction step.

The most suitable ILTPP system for the performance of the technique is based on BmimTfO and NaH₂PO₄, because it can recover at the interface between 83 and 99 % of the lactoferrin present in the system. Regarding the selectivity with respect to bovine serum albumin (BSA), it varies between 1 and 3 depending on experimental conditions. Therefore, this technique can be used to recover specific proteins, such as lactoferrin, or groups of them, such as bovine whey proteins.

With respect to the ionic liquid recycling, the study and characterization of the ILTPP systems leads to the conclusion that, depending on the protein concentration in the feed stream, the ionic liquid losses can be lower than 1 % without any additional recovery step. However, vacuum evaporation of part of the water contained in the salt-rich phase allows, under almost all the operating conditions, the recyclability of all the ionic liquid and salt of the system, so the ILTPP technique does not require any net reagent consumption.

1 Planteamiento



«Cuanto menos se lee,
más daño hace lo que se lee»

Prof. Dr. Miguel de Unamuno (1864-1936)

Escritor y filósofo español

CAPÍTULO 1. PLANTEAMIENTO

1.1. Justificación y antecedentes

Las proteínas son componentes de los organismos vivos que juegan un papel fundamental en los mismos y resultan de gran utilidad en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, por lo que la obtención de proteínas purificadas de un modo eficiente resulta esencial. Las proteínas se encuentran de forma natural en los fluidos biológicos, o bien se producen en medios que suelen ser mezclas complejas de otras proteínas, material de paredes celulares y ácidos nucleicos (Pei et al., 2009). En consecuencia, la separación y purificación de proteínas es una tarea difícil, por lo que estos procesos aguas abajo (*downstream*) suelen representar entre el 50 y el 80 % del coste total de producción de proteínas (Alvarez-Guerra e Irabien, 2012). Por esta razón, puesto que el mayor coste de su procesado radica en las etapas aguas abajo, las ventajas competitivas en la producción de proteínas no dependerán únicamente de innovaciones en áreas de la Biología básica, sino también de la innovación y optimización de estos procesos de separación y purificación (Asenjo, 1990).

Los métodos tradicionales de purificación de proteínas, como cromatografía o electroforesis, poseen elevados costes y tiempos de procesado (Ndiaye et al., 2010; Zeng et al., 2013). Por lo tanto, la demanda de procesos de separación y purificación de proteínas eficientes, de bajo coste y respetuosos con el medio ambiente ha estimulado el desarrollo de métodos de fabricación más limpios y técnicas de relevancia industrial que sean fácilmente escalables (Tonova, 2012).

En este sentido, la extracción líquido-líquido parece tener un gran potencial para aislar las proteínas de interés, dado que presenta mayor capacidad, mejor selectividad e integra las etapas de recuperación y purificación, con las consiguientes mejoras en rendimientos, purezas y costes (Dreyer et al., 2009; Martínez-Aragón et al., 2009; Tomé et al., 2010). La principal limitación de estas técnicas está asociada al empleo de compuestos orgánicos volátiles como el disolvente constituyente del extracto, que se caracterizan por ser en la mayoría de los casos inmiscibles en agua y presentar elevada toxicidad. Por ello, a pesar del relativo bajo coste de los disolventes orgánicos volátiles, una regulación cada vez más exigente ha limitado su aplicación por los problemas medioambientales y de seguridad y salud en el trabajo que su uso lleva asociados, que se añaden a posibles problemas de tipo operativo y de eficiencia (Soto et al., 2005; Ventura et al., 2009; Wang et al., 2010). En este sentido, los líquidos iónicos se consideran una alternativa de gran interés para reemplazar a estos disolventes orgánicos volátiles convencionales (Shimojo et al., 2006a; Tomé et al., 2009).

Los líquidos iónicos, conocidos antiguamente como sales fundidas, se definen como sales cuyo punto de fusión es aproximadamente de 100 °C o inferior, de modo que el líquido únicamente está formado por iones (Stark y Seddon, 2007; Alvarez-Guerra e Irabien, 2011). La mayor parte de los líquidos iónicos están constituidos por cationes orgánicos, si bien los aniones suelen ser tanto orgánicos como inorgánicos (Han y Armstrong, 2007). Los líquidos iónicos, además de las propiedades características propias de un buen disolvente (excelente capacidad de solvatación, rango variable de viscosidades, líquido en un amplio rango de temperaturas), presentan numerosas ventajas respecto a los disolventes convencionales, como una presión de vapor despreciable, altas estabilidades térmica y química, no inflamabilidad, elevada conductividad iónica y una amplia ventana electroquímica (Absalan et al., 2010; Bihari et al., 2010; Han y Row, 2010). Pero la ventaja fundamental de los líquidos iónicos reside en que la elección adecuada del par catión-anión permite ajustar sus propiedades para una aplicación específica, por lo que se les considera como "disolventes de diseño" (Stark y Seddon, 2007; Patel et al., 2014). Por todo lo expuesto, se concluye que de entre las múltiples aplicaciones que poseen los líquidos iónicos (electroquímica, aplicaciones analíticas, catálisis...), su empleo en procesos de separación y extracción es una de las más significativas (Zhang et al., 2007; Han y Row, 2010).

Existen diversas aproximaciones para separar y purificar proteínas mediante extracción líquido-líquido basada en líquidos iónicos. De entre todas ellas, los sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS, en su acrónimo inglés: *Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems*) concentra el mayor número de estudios en este campo (Domínguez-Pérez et al., 2010). Dado que esta técnica se considera una de las predecesoras de la técnica desarrollada en la presente tesis doctoral, se expondrá con mayor detalle en el apartado 1.2.1.

Otra alternativa con un gran potencial es la extracción directa con líquidos iónicos hidrofóbicos, puesto que es la más sencilla, por cuanto no se precisa de agentes químicos adicionales y el líquido iónico puede reutilizarse con facilidad (Alvarez-Guerra et al., 2012). De esta forma, pueden encontrarse recomendaciones acerca de la selección del líquido iónico que debería emplearse para extraer diversas proteínas (Martínez-Aragón et al., 2009). En este sentido, destacan los trabajos de Cheng et al. (2008a, 2008b) en los que se extrae hemoglobina y citocromo-c mediante un líquido iónico no comercial (BtmsimPF₆). La extracción de estas proteínas se consigue mediante el enlace covalente coordinado que se establece entre los átomos de hierro de las mismas y el catión imidazolio del líquido iónico.

Por su parte, también se han empleado líquidos iónicos que junto con agua conducen a sistemas con una temperatura inferior de disolución crítica para extraer proteínas como el citocromo-c (Kohno et al., 2011, 2012; Kohno y Ohno 2012). La singularidad de estos sistemas radica en que pueden escindirse en dos fases con pequeños cambios de temperatura (p.ej. de 20 a 25 °C), lo que permite cambios de fase con pequeños requerimientos energéticos. Así, la

alimentación con la proteína de interés se mezcla íntimamente con el líquido iónico a la temperatura en la que el sistema es homogéneo, para posteriormente conseguir su extracción por reparto favorable hacia el líquido iónico cuando el sistema pasa a ser bifásico mediante el pequeño incremento de temperatura mencionado.

No obstante, el número de trabajos que emplean líquidos iónicos para recuperar proteínas mediante extracción directa es limitado, puesto que las proteínas suelen ser insolubles o muy poco solubles en la mayoría de líquidos iónicos. En consecuencia, la extracción directa de proteínas con líquidos iónicos, en general, se considera que tiene una eficacia muy limitada (Du et al., 2007; Dreyer et al., 2009), si bien su uso para la recuperación de biomoléculas de menor tamaño, como aminoácidos (Fortunato et al., 2005; Wang et al., 2005; Absalan et al., 2010; Tomé et al., 2010) o antibióticos (Cull et al., 2000; Soto et al., 2005), parece tener mayor potencial. Por todo ello, se ha recurrido a la adición de extractantes u otros aditivos (p. ej. éteres corona) para mejorar la solubilidad en los líquidos iónicos de biomacromoléculas como las proteínas (Shimojo et al., 2006a, 2006b). También se ha descrito la funcionalización del líquido iónico mediante estos mismos éteres corona (Kubota et al., 2007) o pigmentos con elevada afinidad (Tzeng et al., 2008) para mejorar la eficiencia de extracción de las proteínas.

En el siguiente apartado, se describirán con mayor detalle las dos técnicas que se consideran predecesoras de la técnica ILTPP (reparto en tres fases basado en líquidos iónicos) que se propone y desarrolla en la presente tesis. De este modo, en el apartado 1.2 se describen los sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS) y el reparto en tres fases (TPP). Una descripción más detallada de estas técnicas predecesoras de ILTPP puede hallarse en la revisión de Alvarez-Guerra e Irabien (2015).

1.2. Técnicas predecesoras del reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP)

1.2.1. Sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS)

Los sistemas acuosos bifásicos (ATPS, en su acrónimo inglés: *Aqueous Two Phase Systems*) constan de dos fases líquidas, ambas con una cantidad relativamente alta de agua, que se forman por la combinación con el agua de dos componentes hidrofílicos pero mutuamente incompatibles entre sí, tradicionalmente polímero/polímero y polímero/sal, para posibilitar que se produzca la separación de fases (Müller y Górak, 2012). Los ATPS fueron propuestos como un método económico y eficiente para la separación, preconcentración y purificación de iones metálicos, nanopartículas o biomoléculas (Li et al., 2013a). Esta técnica ha sido ampliamente aplicada a esta última clase de compuestos, como proteínas o aminoácidos, debido a las ventajas que introduce sobre otros métodos convencionales: elevado contenido en

agua, biocompatibilidad, baja tensión superficial, alta capacidad y rendimiento, y facilidad de escalado (Wu et al., 2011). Sin embargo, la mayoría de ATPS basados en el uso de polímeros presentan elevada viscosidad, forman disoluciones opacas y presentan un rango limitado de diferencia de polaridad entre las dos fases líquidas que limitan su aplicabilidad (Haghtalab et al., 2013; Pereira et al., 2013).

En 2003, Rogers y colaboradores propusieron por primera vez la utilización de líquidos iónicos de base imidazolio y sales inorgánicas (K_3PO_4) para formar ATPS (Gutowski et al., 2003). Estos ATPS alternativos, denominados sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS, en su acrónimo inglés: *Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems*), combinan las ventajas asociadas tanto a los líquidos iónicos como a los ATPS. De este modo, los ILATPS, con respecto a los ATPS convencionales, presentan menor viscosidad, cortos tiempos de separación y, especialmente, una gran habilidad para controlar la polaridad de las fases, dada la gran variedad de líquidos iónicos que pueden obtenerse por combinación de diferentes cationes y aniones (Pereira et al., 2013; Zeng et al., 2013). Es por ello por lo que los ILATPS se consideran la alternativa más común para extraer biomoléculas con líquidos iónicos habiéndose aplicado para separar, concentrar y purificar proteínas, aminoácidos, antibióticos antioxidantes o alcaloides (Domínguez-Pérez et al., 2010; Alvarez-Guerra e Irabien, 2012; Ventura et al., 2013). Así, el número de publicaciones en las que se exponen nuevos ILATPS ha ido creciendo en los últimos años, por lo que se dispone de un elevado número de líquidos iónicos y sales que están disponibles para formar ILATPS (Ventura et al., 2012a). Además, también se ha descrito el empleo de carbohidratos, polímeros, aminoácidos o surfactantes aniónicos para, junto con líquidos iónicos, formar los mencionados sistemas bifásicos (Ventura et al., 2011a).

La mayoría de estudios relativos a ILATPS formados por líquido iónico y sal se centran en líquidos iónicos con aniones Cl^- , Br^- , TfO^- o BF_4^- y catión de base imidazolio, y en sales de base fosfato (Freire et al., 2012a). Así, se ha evaluado la capacidad para formar sistemas bifásicos de múltiples combinaciones líquido iónico/sal. En relación al catión, se ha analizado especialmente la influencia de la longitud de sus cadenas laterales alquílicas, concluyendo que una mayor longitud de la cadena confiere mayor hidrofobicidad y, por tanto, se incrementa la capacidad para formar sistemas bifásicos, lo que origina curvas binodales más próximas a los ejes del diagrama ternario y mayores regiones bifásicas en el mismo (Neves et al., 2009; Deive et al., 2011a). No obstante, esta tendencia sólo es válida para cadenas de hasta 6 átomos de carbono, ya que para mayores longitudes de cadena se invierte el efecto dada la complejidad del fenómeno, jugando un papel importante la habilidad de auto-agregación del líquido iónico (Freire et al., 2012b). Respecto del efecto del núcleo del catión, los basados en amonio o fosfonio cuaternarios tienen una capacidad para inducir la separación de fases considerablemente mayor que los cationes de núcleo piridinio o imidazolio (Bridges et al., 2007; Li et al., 2010).

La influencia del anión del líquido iónico en la formación de ILATPS viene marcada por su capacidad de formar complejos de hidratación, puesto que cuanto menor sea esta, mayor será su habilidad para formar sistemas acuosos bifásicos (Ventura et al., 2012a). Por consiguiente, el anión triflato, TfO^- , es el que presenta la mayor capacidad para formar ILATPS (Freire et al., 2012a). No obstante, también se han estudiado nuevos ILATPS con criterios distintos al de su capacidad para formar sistemas bifásicos, como por ejemplo empleando líquidos iónicos de menor toxicidad o mayor biodegradabilidad. En este sentido, se ha descrito la formación de ILATPS con líquidos iónicos basados en colina (Shahriari et al., 2013) o en aminoácidos (Wu et al., 2013).

Con respecto del efecto de los iones constituyentes de la sal sobre la formación de ILATPS, estos siguen la serie de Hofmeister, que es una serie propuesta para describir la habilidad de los iones para precipitar proteínas pero que también permite describir otros muchos fenómenos (Shahriari et al., 2012). Por ello, el anión PO_4^{3-} es el que presenta una mayor capacidad para lograr la separación de fases mientras que el anión Cl^- es el de menor capacidad; de manera similar, la capacidad formadora de fases de los cationes divalentes es mayor que la de los monovalentes (Freire et al., 2012a). El uso de sales orgánicas, como citratos o tartratos, también se ha descrito para sustituir a las sales inorgánicas, debido a la biodegradabilidad y baja toxicidad de las primeras (Han et al., 2010, 2011; Li et al., 2013b), si bien se han estudiado en mucha menor medida que las sales inorgánicas.

Las sales inorgánicas también pueden ser reemplazadas por carbohidratos como glucosa o sacarosa, que se caracterizan por ser especies no cargadas, biodegradables, no tóxicas y de origen renovable (Chen et al., 2010; Freire et al., 2011). Unas ventajas similares presentan los ILATPS formados por líquidos iónicos y aminoácidos, al proporcionar sistemas medioambientalmente más benignos y menos agresivos para la extracción de biomoléculas (Zhang et al., 2007; Domínguez-Pérez et al., 2010). Sin embargo, el número de líquidos iónicos que forman sistemas acuosos bifásicos en combinación con carbohidratos o aminoácidos es reducido, debido a su menor capacidad para lograr la escisión de fases con respecto a las sales inorgánicas (Freire et al., 2012a).

a. Aplicaciones a la separación de proteínas

Una de las propiedades más interesantes de los ILATPS es el ambiente suave que proporciona a biomoléculas como las proteínas por la presencia de agua en ambas fases líquidas, lo que convierte a esta técnica en la aproximación más estudiada para separar proteínas que involucre el empleo de líquidos iónicos (Li et al., 2010; Alvarez-Guerra e Irabien, 2012). La tabla 1.2.1 muestra los ILATPS que se han utilizado para extraer proteínas en los diferentes estudios publicados al respecto. Como puede apreciarse, la mayoría de los estudios

emplean sistemas que utilizan sales de base fosfato, si bien se han evaluado líquidos iónicos de diferentes cationes y aniones.

Tabla 1.2.1. Proteínas cuyo reparto se ha estudiado en cada uno de los ILATPS (Alvarez-Guerra e Irabien, 2015).*

Líquido iónico	Sal/carbohidrato					
	K_2HPO_4	K_2HPO_4/KH_2PO_4	$(NH_4)_2SO_4$	K_2CO_3	$K_3C_6H_5O_7$	D-fructosa
$C_{7mim}Cl$	BSA ^{1,2} Citocromo-c ³ Hemoglobina ³ Mioglobina ³ Ovoalbúmina ³ Papaína ⁴ Peroxidasa de rábano picante ⁵	Lipasa B ⁶ Lipasa de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 ⁷				
BzmimCl		Lipasa B ⁶				
BmpyrCl		Lipasa B ⁶				
BmpyCl		Lipasa B ⁶ Lipasa de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 ⁷				
BmpipCl		Lipasa B ⁶				
$C_{7mim}Br$	BSA ^{2,8,9} Citocromo-c ⁸ Hemoglobina ^{2,9} Lisozima ^{2,9} Tripsina ^{8,9} γ -globulina ⁸				Citocromo-c ¹⁰	
BmimTfO		Lipasa B ⁶				
Bmimdca	BSA ¹¹	Lipasa B ⁶ Lipasa de <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 ⁷				
Opydca		Lipasa B ⁶				
BmimMeSO ₃		Lipasa B ⁶				
EmimC ₂ SO ₄					Lipasa TL ¹²	
EmimC ₄ SO ₄			Lipasa A ¹³			
BmimBF ₄						BSA ¹⁴
$N_{nmim}Gly$	Citocromo-c ¹⁵					
$P_{4444}Gly$	Citocromo-c ¹⁵					
ILs basados en TMG**	BSA ^{16,17} Hemoglobina ¹⁶ Lisozima ¹⁷ Ovoalbúmina ^{16,17} Tripsina ¹⁷					
Amoeng TM 110		Alcohol deshidrogenasas ¹⁸ BSA ¹⁹ Lisozima ¹⁹ Mioglobina ¹⁹ Tripsina ¹⁹				

*Notación de las referencias: ¹Du et al. (2007), ²Pei et al. (2012), ³Ruiz-Angel et al. (2007), ⁴Bai et al. (2013), ⁵Cao et al. (2008), ⁶Ventura et al. (2011b), ⁷Ventura et al. (2012b), ⁸Pei et al. (2009), ⁹Lin et al. (2013), ¹⁰Lu et al. (2011), ¹¹Pei et al. (2010), ¹²Deive et al. (2011b), ¹³Deive et al. (2012), ¹⁴Novak et al. (2012), ¹⁵Wu et al. (2013), ¹⁶Zeng et al. (2013), ¹⁷Ding et al. (2014), ¹⁸Dreyer y Kragl (2008), ¹⁹Dreyer et al. (2009).

**ILs basados en TMG: líquidos iónicos basados en el catión 1,1,3,3-tetrametilguanidina y diferentes tipos de aniones (acrilato, metilacrilato, acetato, lactato, maleato, itaconato, sorbato, cinamato).

En muchos de los trabajos anteriores, se obtienen elevadas eficiencias de extracción de la proteína, en algunos casos alcanzando la extracción prácticamente cuantitativa. Sin embargo, debido a la complejidad del proceso de separación de proteínas mediante ILATPS, no existe un consenso acerca de las fuerzas impulsoras predominantes en este tipo de separación. Así, en función del líquido iónico, la sal, la proteína objeto de la separación y las condiciones experimentales, se han identificado diferentes fuerzas impulsoras: interacciones electrostáticas (Dreyer et al., 2009; Du et al., 2007), interacciones hidrofóbicas (Pei et al., 2009, 2012; Lu et al., 2011; Wu et al., 2013) e, incluso, se ha propuesto la formación de agregados de líquido iónico y de complejos entre estos agregados y las proteínas como responsables de su separación (Pei et al., 2010; Zeng et al., 2013).

Cuando las proteínas que se separan son enzimas, debe destacarse que los ILATPS no sólo proporcionan elevadas eficiencias en su extracción, sino que también pueden conducir a incrementos muy notables de su actividad específica, como lo demuestran los aumentos obtenidos en su factor de purificación (Dreyer y Kragl, 2008; Ventura et al., 2011b, 2012b). De este modo, los ILATPS permiten combinar las etapas de extracción y de reacciones catalizadas enzimáticamente. Por otro lado, también se han estudiado distintas configuraciones en las que desarrollar los ILATPS, como los microcanales (Novak et al., 2012) o las columnas cromatográficas en contracorriente (Ruiz-Angel et al., 2007).

Por consiguiente, los ILATPS se perfilan como una técnica con un gran potencial para separar y purificar proteínas de medios complejos de una forma más eficiente que las técnicas convencionales empleadas en la actualidad. La mayoría de las proteínas recuperadas mediante ILATPS (ver tabla 1.2.1) destacan por sus aplicaciones terapéuticas o nutraceuticas (Pei et al., 2009). Asimismo, se ha estudiado la aplicación de ILTAPS para preconcentrar proteínas con fines analíticos y de diagnóstico, de forma que gracias a esta preconcentración se puedan cuantificar bajos contenidos de la proteína de interés que permitan detectar en sus primeros estadios cambios fisiológicos asociados a patologías (Du et al., 2007). En relación a las enzimas, los ILTAPS no sólo se postulan como un medio para su purificación, sino también para llevar a cabo reacciones bioquímicas catalizadas por estas biomoléculas con productos de interés industrial, debido a los incrementos de actividad específica que estas enzimas experimentan en la fase rica en líquido iónico (Ventura et al., 2011b).

b. Limitaciones de la técnica

De acuerdo a lo expuesto en el apartado anterior, diversos trabajos han descrito el empleo de ILATPS para separar proteínas con resultados prometedores. Sin embargo, la investigación se ha centrado en la influencia de la sal y el líquido iónico sobre la formación de fases y el

coeficiente de reparto de los compuestos de interés (Müller y Górak, 2012). En consecuencia, hay algunas cuestiones relativas a los ILATPS que apenas se han estudiado y de cuya resolución depende el desarrollo de esta técnica. Así, si bien se ha realizado algún estudio para la recuperación de biomoléculas de pequeño tamaño en comparación con las proteínas como el ácido gálico (Cláudio et al., 2014), en la mayoría de los trabajos relativos a extracción con líquidos iónicos la reextracción de las biomoléculas no suele considerarse (Oliveira et al., 2012), si bien este constituye el principal obstáculo para la viabilidad de estos procesos (Alvarez-Guerra e Irabien, 2012). Otra cuestión que debe evaluarse cuando se recurre a ILATPS es la solubilidad mutua de componentes entre las fases, que puede dificultar la reutilización del líquido iónico (Jiang et al., 2007; Domínguez-Perez et al., 2010). Finalmente, puesto que efluentes residuales que contengan altas concentraciones de sales inorgánicas como las empleadas en los ILATPS pueden ocasionar problemas medioambientales (Han et al., 2011), la recuperación de dichas sales para su reutilización también sería aconsejable.

1.2.2. Reparto en tres fases (TPP)

El reparto en tres fases (TPP en su acrónimo inglés: *Three Phase Partitioning*) es una técnica emergente para la separación de proteínas que consiste en la acumulación de material precipitado en la interfase que separa una fase orgánica, generalmente constituida por t-butanol, y una solución acuosa salina, en la que normalmente se emplea sulfato de amonio como sal (Przybycien et al., 2004; Dhananjay y Mulimani, 2009). En este sentido, esta técnica es capaz de precipitar y recuperar proteínas mediante una capa de las mismas formada entre la fase acuosa y la orgánica (Szamos et al., 1998a). De este modo, la fase líquida superior contiene mayoritariamente alcohol y algo de agua con sulfato de amonio en trazas, mientras que la fase inferior está formada por una disolución acuosa del electrolito con bajo contenido en t-butanol (Borbás et al., 2001a; Sen et al., 2011). En la fase superior se concentran pigmentos, lípidos y enzimas inhibitoras, mientras que la fase acuosa inferior queda enriquecida en componentes polares como sacáridos, permaneciendo ambas fases separadas por la capa de proteína acumulada en la interfase líquido-líquido (Kiss et al., 1998). Los sistemas TPP podrían formarse con otros alcoholes (p. ej., n-butanol) y sales (p. ej., CaCl_2), pero se ha concluido que el t-butanol y el sulfato de amonio son los que proporcionan los mejores resultados (Rather y Gupta, 2013).

La técnica TPP fue propuesta por primera vez por Tan y Lovrien (1972), describiéndose en mayor detalle por Lovrien et al. (1987) y habiéndose aplicado para la concentración de varias proteínas y enzimas (Kumar et al., 2011a; Gautam et al., 2012a). A pesar del incremento en el número de trabajos basados en TPP observado durante los últimos años, esta técnica todavía no posee la madurez de otras técnicas convencionales como las cromatográficas (Przybycien et al., 2004; Gautam et al., 2012a). Este creciente interés debe atribuirse a las ventajas asociadas

a esta técnica, puesto que la TPP se define como simple, más eficiente y un método económico para separar y purificar las proteínas de interés, con relación a las técnicas convencionales (Akardere et al., 2010). De esta forma, mientras que la mayoría de las tecnologías convencionales involucran un elevado número de etapas que consumen tiempo y recursos, precisan de un pretratamiento y su escalado es complicado (Sen et al., 2011), la TPP destaca por su simplicidad, bajos costes, ser fácilmente escalable, poder tratar suspensiones sin pretratamientos previos, operar a temperatura ambiente y la facilidad para reutilizar los reactivos usados en el proceso (Harde y Singhal, 2012). Por estas razones, la técnica TPP se considera atractiva como método de prepurificación o separación (Kiss et al., 1998).

a. Aplicaciones

Si bien TPP se desarrolló como una técnica aguas arriba (*upstream*), se ha usado para procesos de purificación de proteína tanto aguas arriba como aguas abajo (*downstream*), utilizándose como un método de purificación de una etapa (Wati et al., 2009; Akardere et al., 2010). Adicionalmente, la TPP consigue la concentración de las proteínas de interés, así como la práctica eliminación de la viscosidad y turbidez (Ward y Swiatek, 2009). De este modo, la técnica TPP suele purificar las proteínas en más de 2 órdenes de magnitud, obteniendo purezas finales en el rango del 70-85 % y reducciones en volumen de al menos 50 veces (Ward, 2009). No obstante, la eficiencia del proceso depende tanto de las propiedades de la proteína (punto isoeléctrico, masa molecular, hidrofobicidad, solubilidad) como de las condiciones de operación (pH, temperatura, saturación en sulfato de amonio, ratio extracto crudo:t-butanol) de la técnica (Wati et al., 2009; Kumar et al., 2011a). Estos resultados tan prometedores han permitido aplicar con éxito la técnica TPP a gran escala (Kumar et al., 2011b).

Se ha estudiado, obteniéndose resultados satisfactorios, la purificación mediante TPP de muchas proteínas, tales como BSA (Kiss et al., 1998; Kiss y Borbás, 2003); ovoalbúmina (Kiss et al., 1998; Kiss y Borbás, 2003); lisozima (Kiss et al., 1998; Kiss y Borbás, 2003); gelatina (Kiss et al., 1998); β -lactoglobulina (Kiss y Borbás, 2003); peroxidasa de rábano picante (Kiss y Borbás, 2003); peroxidasa *Ipomoea palmata* (Narayan et al., 2008); α -galactosidasa (Dhananjay y Mulimani, 2008, 2009; Çalci et al., 2009; Sen et al., 2011); β -galactosidasa (Choonia y Lele, 2013), lacasa (Kumar et al., 2011a; Rajeeva y Lele, 2011); proteasas de las vísceras de siluros gigantes (Rawdkuen et al., 2012), de piel de papaya (Chaiwut et al., 2010) y de látex *Calotropis procera* (Rawdkuen et al., 2010); invertasa (Dhananjay y Mulimani, 2008; Akardere et al., 2010; Özer et al., 2010); inhibidores de tripsina y amilasa (Saxena et al., 2007); fosfolipasa D (Sharma y Gupta, 2001); catalasa (Duman y Kaya, 2013); o xilanasa (Roy et al., 2004). Asimismo, TPP también se ha utilizado para recuperar polisacáridos en la interfase (Sharma y Gupta, 2002; Coimbra et al., 2010) y para extraer aceites y grasas en la fase rica en t-butanol (Sharma et al., 2002).

A pesar del elevado número de estudios acerca del reparto de proteínas mediante TPP, los principios físico-químicos que están tras esta técnica son complejos y no están del todo comprendidos (Roy et al., 2004; Gautam et al., 2012b), si bien se ha publicado algún trabajo en el que se persigue explicar el mecanismo que rige la separación basada en TPP (Dennison y Lovrien, 1997; Kiss et al., 1998; Kiss y Borbás, 2003). Por otro lado, el análisis del comportamiento reológico de la fase intermedia formada en la interfase y en la que se acumula la proteína de interés permite concluir que se trata de un gel (Borbás et al., 2001b). En relación a la posibilidad de que la proteína sufra cambios estructurales en la interfase, Rather y Gupta (2013) concluyen que en todo caso estos serían sutiles (no drásticos) por lo que la técnica TPP puede emplearse con seguridad para la purificación de proteínas. Además, esta técnica no sólo no provoca cambios estructurales profundos en la proteína, sino que puede utilizarse como un método de renaturalización de proteínas que proporciona rendimientos superiores a los de otros convencionales, con lo que la técnica TPP permite combinar simultáneamente las etapas de purificación y renaturalización de proteínas (Gautam et al., 2012a).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, la mayoría de las proteínas cuya purificación mediante TPP se ha estudiado son enzimas. Así, TPP permite incrementar la actividad de diversos enzimas, con aumentos de rendimientos de hasta 1000% (Rajeeva y Lele, 2011), probablemente debido a los sutiles cambios estructurales que pueden producirse (Rather y Gupta, 2013). De esta forma, la mejora de la actividad enzimática constituye una aplicación alternativa de la TPP, además de las ya mencionadas de purificación y renaturalización de proteínas. También se han descrito otras aplicaciones de la técnica TPP relativas a la construcción de biosensores (Adányi et al., 1999), la extracción y purificación de ADN (Szamos et al., 1998b; Ujhelyi et al., 2011) o el ajuste de la permeabilización de células microbianas (Raghava y Gupta, 2009).

Finalmente, debe mencionarse que la técnica TPP constituye la base de otra técnica denominada reparto en tres fases facilitado por ligandos con macroafinidad (MLFTPP en su acrónimo inglés: *Macroaffinity Ligand-Facilitated Three Phase Partitioning*). De este modo, MLFTPP emplea, además de t-butanol y sulfato de amonio, un polímero inteligente que actúa como macroligando de afinidad inteligente, con lo que la interfase líquido-líquido contendría tanto al propio polímero como al complejo de afinidad formado entre la proteína y el polímero (Mondal et al., 2003a, 2003b). La principal ventaja de MLFTPP es que proporciona mayor selectividad que la TPP convencional para las mismas o similares condiciones de operación (Sharma et al., 2003).

b. Limitaciones de la técnica

Aunque el t-butanol tiene un mayor punto de ebullición y es considerablemente menos inflamable que otros disolventes orgánicos convencionales empleados en procesos de

extracción (p. ej., hexano, metanol o etanol) (Harde y Singhal, 2012), el mayor obstáculo para la utilización de la técnica TPP a gran escala es la necesidad de emplear cantidades industriales de este compuesto (Przybycien et al., 2004). En este sentido, el Registro de Clasificación y Etiquetado de la Agencia Europea de sustancias y preparados Químicos (ECHA en su acrónimo inglés: *European Chemicals Agency*) no sólo clasifica al t-butanol como inflamable, sino que también presenta las siguientes clases de peligro: toxicidad aguda, irritación ocular y toxicidad específica en determinados órganos por exposición única (ECHA, 2014). Por consiguiente, la técnica TPP presenta las desventajas y limitaciones asociadas al uso de disolventes orgánicos volátiles.

1.3. **El lactosuero bovino como fuente de proteínas**

El lactosuero bovino es el subproducto de la fabricación del queso que se genera tras la coagulación selectiva de la caseína. El lactosuero contiene todos los constituyentes solubles de la leche en una composición variable dependiendo del proceso de fabricación del queso (Eugster et al., 2012). En la tabla 1.3.1 se muestra la composición típica del lactosuero y de la leche bovinos.

Tabla 1.3.1. Composición típica del lactosuero y leche bovinos (Fox et al., 2000).

<i>Componentes</i>	<i>Lactosuero bovino (g L⁻¹)</i>	<i>Leche bovina (g L⁻¹)</i>
Sólidos totales	63,0-67,0	122,5
Proteína total	6,1-6,6	33,0
Lactosa	44,0-52,0	47,0
Grasa	0,2-3,0	35,0
Minerales	5,0-7,9	7,5

Debido a su elevada demanda biológica de oxígeno (DBO), el lactosuero bovino es uno de los mayores contaminantes de las aguas residuales de la industria láctea (Chen et al., 2007). Tradicionalmente, la gestión del lactosuero se ha centrado en los métodos más económicos de vertido, como su descarga a corrientes residuales (Santos et al., 2011), lo que exige su tratamiento mediante métodos biológicos (sin o con valorización) o físico-químicos (Prazeres et al., 2012). Sin embargo, esta gestión del lactosuero como residuo supone un coste adicional. Por ello, también se ha empleado el lactosuero como suplemento de la alimentación animal (especialmente de ganado porcino) o como fertilizante de suelos (Eugster et al., 2012; Prazeres et al., 2012), si bien estas son aplicaciones de bajo valor dado que la composición del lactosuero no es muy equilibrada, al contener básicamente agua (93,5 %) y lactosa (4,5-5,0 %) (Zydney, 1998), en consonancia con lo expuesto en la tabla 1.3.1.

Por todo ello, el lactosuero se ha considerado como un subproducto, que en ocasiones se gestiona como residuo, con nulo o muy pequeño valor. Sin embargo, debido al creciente número de aplicaciones técnicas y nutricionales de sus componentes, en la actualidad el lactosuero es visto como un co-producto de la fabricación del queso (Walzem et al., 2002). Así, las proteínas del lactosuero constituyen el componente nutricional más importante (Eugster et al., 2012), debido a sus importantes funciones biológicas: previenen el cáncer, poseen actividad antimicrobiana e incrementan los niveles de antioxidantes como el glutatión (Madureira et al., 2007). De este modo, estas proteínas se comercializan como concentrado o aislados de proteínas del lactosuero (WPC y WPI en sus acrónimos ingleses: *Whey Protein Concentrate* y *Whey Protein Isolate*, respectivamente). Estos se diferencian entre sí en su contenido proteico, ya que mientras que los WPC poseen una composición en proteínas del 34 al 85 %, los WPI precisan que el contenido en estos componentes supere el 90 % (Huffman y Harper, 1999). Tanto los WPC como los WPI se obtienen por ultrafiltración del suero hasta que las proteínas alcanzan una concentración del 10-20 %, seguido de las etapas de diafiltración y secado hasta alcanzar el contenido proteico deseado. En las primeras etapas del proceso de WPI, pueden emplearse técnicas de intercambio iónico en lugar de recurrir a la tecnología de membranas (Fox et al., 2000; Eugster et al., 2012). Los WPC se utilizan como aditivos alimentarios funcionales, destinados por ejemplo a la preparación de geles, espumas y emulsiones. Por su parte, los WPI presentan una funcionalidad mayor, por lo que además de las aplicaciones ya mencionadas para los WPC, también se usan en la preparación de bebidas deportivas y productos especiales de nutrición (Huffman y Harper, 1999; Fox et al., 2000).

Tabla 1.3.2. Principales proteínas del lactosuero bovino junto con su concentración, masa molar y punto isoeléctrico (Zydney, 1998; Nyström et al., 1998).

<i>Proteína</i>	<i>Concentración (g L⁻¹)</i>	<i>Masa molar (10³ g mol⁻¹)</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>
β-Lactoglobulina	2,7	18	5,2
α-Lactoalbúmina	1,2	14	4,5-4,8
Inmunoglobulinas	0,65	150-1000	5,5-8,3
Seroalbúmina bovina	0,4	69	4,7-4,9
Lactoferrina	0,1	78	8-9
Lactoperoxidasa	0,02	89	9,5

En la tabla 1.3.2 se muestran las principales proteínas del lactosuero bovino, junto con algunas de sus características. A su vez, cada una de ellas de forma individual presenta importantes efectos beneficiosos sobre la salud humana asociados a sus características biológicas, funcionales y nutricionales únicas (Almécija et al., 2007; Madureira et al., 2007; Santos et al., 2011). De esta forma, el interés comercial en la producción individual de las proteínas del lactosuero bovino se ha ido acrecentando a medida que se han ido describiendo

sus propiedades beneficiosas, ya que estas pueden no ser perceptibles cuando se encuentran en los WPC o WPI, debido a posibles interacciones entre las mismas (Zydney, 1998).

De entre las proteínas del lactosuero, la lactoferrina (LF) destaca por sus importantes propiedades biológicas, tales como antimicrobiana, antiinflamatoria, anticarcinogénica o inmunomoduladora (Brisson et al., 2007; Bokkhim et al., 2013). Por ello, esta proteína se emplea como suplemento alimentario de propiedades nutraceuticas en preparados para niños, yogures, leche desnatada..., así como aditivo en productos de higiene bucal y en cosméticos (Wakabayashi et al., 2006).

La LF es una glicoproteína de 78 kDa que puede contener hasta 2 átomos de hierro por molécula, aunque su saturación en hierro no suele exceder del 10 % en total (Adlerova et al., 2008). En la actualidad, se obtiene con elevada pureza a escala industrial mediante cromatografía de intercambio catiónico, si bien esta tecnología ve limitada las opciones de valorización de la LF de corrientes residuales o con bajo valor por sus elevados costes y relativamente bajos rendimientos (Ndiaye et al., 2010). Otras técnicas como la cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, la adsorción en membranas o anticuerpos monoclonales inmovilizados presentan resultados de separación prometedores, pero también adolecen de elevados costes y, con frecuencia, requieren de una preclarificación de la alimentación (Lu et al., 2007; Du et al., 2013).

Los procesos basados en membranas se postulan como una alternativa interesante a las técnicas cromatográficas para la recuperación de LF, pero sus principales desventajas son su pobre selectividad y los problemas relacionados con el ensuciamiento de las membranas. En este sentido, se ha investigado la mejora del proceso mediante la aplicación de un campo eléctrico, pero la migración de otras proteínas del lactosuero imposibilita alcanzar elevadas puridades de LF (Brisson et al., 2007; Ndiaye et al., 2010). Por otro lado, el empleo de membranas de ultrafiltración cargadas permite separar a la LF completamente de la seroalbúmina bovina (BSA), proteínas de similar masa molecular y que, por tanto, su separación mediante membranas es especialmente dificultosa (Valiño et al., 2014). Sin embargo, esta última aproximación presenta aún bajos rendimientos, así como el problema de ensuciamiento común a todos los procesos con membranas. De este modo, se precisa de una tecnología de separación innovadora que supere las limitaciones de las técnicas anteriores para la obtención de LF del lactosuero bovino.

Por todo lo expuesto, la recuperación de la LF constituye el caso de estudio sobre el que se aplicará la técnica innovadora basada en líquidos iónicos cuyo desarrollo constituye el objeto de la presente tesis doctoral.

1.4. Objetivos y estructura de la tesis

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el desarrollo de una técnica innovadora para la recuperación de proteínas en sistemas de tres fases basados en líquidos iónicos. Esta tesis es una contribución innovadora por abordar dos cuestiones poco estudiadas en este campo y que son claves para su viabilidad técnica: la recuperación de la proteína de interés y la reutilización del líquido iónico. Además, la presente tesis doctoral incluye el primer trabajo publicado relativo al empleo de la extracción para la recuperación de la lactoferrina, que es la proteína sobre la que se ha centrado el interés.

Para alcanzar este objetivo general, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de la viabilidad de recuperar lactoferrina mediante su extracción con líquidos iónicos hidrofóbicos.
- Identificación y propuesta de una nueva técnica denominada reparto en tres fases basada en líquidos iónicos (ILTPP, *Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning*) para la recuperación de proteínas.
- Selección del sistema líquido iónico/sal más adecuado para la recuperación de la lactoferrina mediante ILTPP.
- Caracterización de los sistemas ILTPP para la evaluación de las pérdidas de líquido iónico en el proceso.
- Evaluación de etapas adicionales de recuperación del líquido iónico para minimizar el consumo neto de reactivos.

En la figura 1.4.1 se muestran esquemáticamente las diferentes etapas de trabajo llevadas a cabo en la presente tesis doctoral para lograr la consecución de los objetivos anteriores. De igual forma, en dicha figura se indica la etapa de trabajo a la que se asocia cada una de las publicaciones que conforman esta tesis doctoral.

De acuerdo con estos objetivos específicos, y considerando la normativa de tesis basada en compendio de artículos, el trabajo se desarrolla en cuatro capítulos: el Capítulo 1 incluye el planteamiento de la tesis. El Capítulo 2 incluye una descripción detallada de los procedimientos y materiales empleados para la realización de la tesis, así como un desarrollo de los resultados y la discusión de los mismos. El Capítulo 3 resume las conclusiones generales obtenidas y el progreso de la investigación. Y finalmente el Capítulo 4 es el núcleo central de la tesis, incluyendo copia de los artículos científicos que la sustentan.

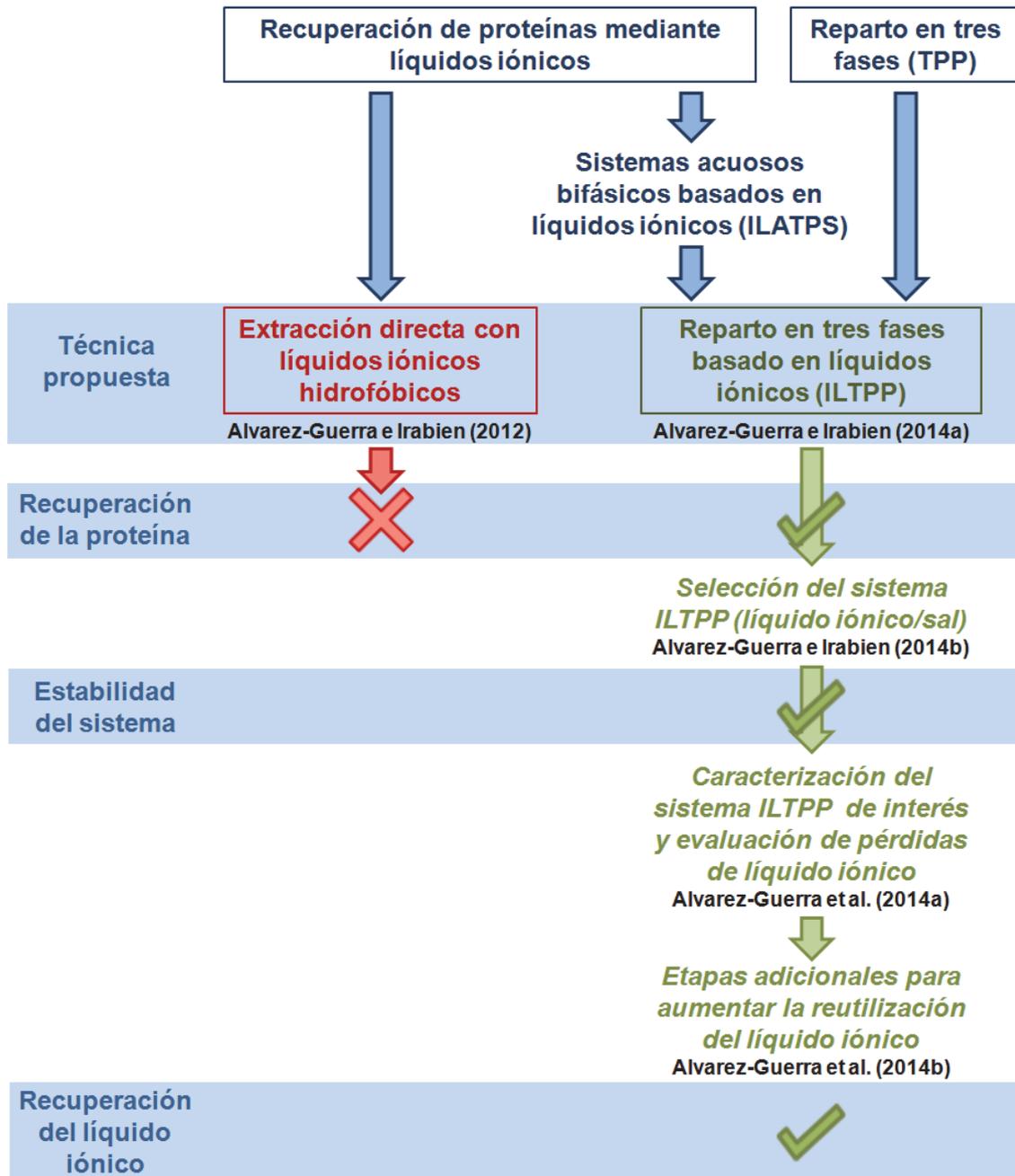


Figura 1.4.1. Esquema de las etapas de trabajo y publicaciones asociadas llevadas a cabo en la presente tesis doctoral.

1.5. Referencias del Capítulo 1

Absalan G., Akhond M., Sheikhian L., Partitioning of acidic, basic and neutral amino acids into imidazolium-based ionic liquids, *Amino Acids* **2010**, 39, 167-174.

Adányi N., Szamos J., Szabó E.E., Váradi M., Interfacial enzyme partitioning as a tool for constructing biosensors, *Acta Aliment.* **1999**, 28, 329-338.

- Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M., Lactoferrin: a review, *Vet. Med.* **2008**, 53, 457–468.
- Akardere E., Özer B., Çelem E.B., Önal S., Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 72, 335-339.
- Almécija M.C., Ibáñez R., Guadix A., Guadix E.M., Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane, *J. Membr. Sci.* **2007**, 288, 28-35.
- Alvarez-Guerra M., Irabien A., Design of ionic liquids: An ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach, *Green Chem.* **2011**, 13, 1507-1516.
- Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 98, 432-440.
- Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Sep. Sci. Technol.* **2014a**, 49, 957-965.
- Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014b**, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/jctb.4401.
- Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilib.* **2014a**, 371, 67-74.
- Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE J.* **2014b**, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/aic.14530.
- Alvarez-Guerra E., Irabien A., Separation of Proteins by Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning, en: Perez de los Rios A., Hernandez-Fernandez F.J. (eds.), *Ionic Liquids in Separation Technology*, Elsevier Inc., **2015**, en prensa, DOI: 10.1016/B978-0-444-63257-9.
- Asenjo J.A., Selection of Operations in Separation Processes, en: Asenjo J.A. (ed.), *Separation Processes in Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU., **1990**, 3-16.
- Bai Z., Chao Y., Zhang M., Han C., Zhu W., Chang Y., Li H., Sun Y., Partitioning Behavior of Papain in Ionic Liquids-Based Aqueous Two-Phase Systems, *J. Chem.* **2013**, ID art. 938154.
- Bihari M., Russell T.P., Hoagland D.A., Dissolution and dissolved state of cytochrome c in a neat, hydrophilic ionic liquid, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 2944-2948.
- Bokkhim H., Bansal N., Grøndahl L., Bhandari B., Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin, *Food Chem.* **2013**, 141, 3007-3013.
- Borbás R., Turza S., Szamos J., Kiss É., Analysis of protein gels formed by interfacial partitioning, *Colloid Polym. Sci.* **2001a**, 279, 705-713.

- Borbás R., Kiss É., Nagy M., Elastic properties of protein gels obtained by three-phase partitioning, *Prog. Colloid Polym. Sci.* **2001b**, 117, 189-194.
- Bridges N.J., Gutowski K.E., Rogers R.D., Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS), *Green Chem.* **2007**, 9, 177-183.
- Brisson G., Britten M., Pouliot Y., Electrically-enhanced crossflow microfiltration for separation of lactoferrin from whey protein mixtures, *J. Membr. Sci.* **2007**, 297, 206–216.
- Çalci E., Demir T., Çelem E.B., Önal S., Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization, *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 70, 123-127.
- Cao Q., Quan L., He C., Li N., Li K., Liu F., Partition of horseradish peroxidase with maintained activity in aqueous biphasic system based on ionic liquid, *Talanta* **2008**, 77, 160-165.
- Chaiwut P., Pintathong P., Rawdkuen S., Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels, *Process Biochem.* **2010**, 45, 1172-1175.
- Chen L., Guo C., Guan Y., Liu H., Isolation of lactoferrin from acid whey by magnetic affinity separation, *Separ. Purif. Technol.* **2007**, 56, 168–174.
- Chen Y., Meng Y., Zhang S., Zhang Y., Liu X., Yang J., Liquid-liquid equilibria of aqueous biphasic systems composed of 1-butyl-3-methyl imidazolium tetrafluoroborate + sucrose/maltose + water, *J. Chem. Eng. Data* **2010**, 55, 3612-3616.
- Cheng D.H., Chen X.W., Shu Y., Wang J.H., Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF₆), *Talanta* **2008a**, 75, 1270-1278.
- Cheng D.H., Chen X.W., Shu Y., Wang J.H., Selective extraction of cytochrome C by ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate, *China J. Anal. Chem.*, **2008b**, 36, 1187-1190.
- Choonia H.S., Lele S.S., Three phase partitioning of β -galactosidase produced by an indigenous *Lactobacillus acidophilus* isolate, *Sep. Purif. Technol.* **2013**, 110, 44-50.
- Cláudio A.F.M., Marques C.F.C., Boal-Palheiros I., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems, *Green Chem.* **2014**, 16, 259-268.
- Coimbra C.G.d.O., Lopes C.E., Calazans G.M.T., Three-phase partitioning of hydrolyzed Levan, *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 4725-4728.

Cull S.G., Holbrey J.D., Vargas-Mora V., Seddon K.R., Lye G.J., Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69, 227–233.

Deive F.J., Rivas M.A., Rodríguez A., Sodium carbonate as phase promoter in aqueous solutions of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *J. Chem. Thermodyn.* **2011a**, 43, 1153-1158.

Deive F.J., Rodríguez A., Pereiro A.B., Araújo J.M.M., Longo M.A., Coelho M.A.Z., Lopes J.N.C., Esperana J.M.S.S., Rebelo L.P.N., Marrucho I.M., Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction, *Green Chem.* **2011b**, 13, 390-396.

Deive F.J., Rodríguez A., Rebelo L.P.N., Marrucho I.M., Extraction of *Candida antarctica* lipase A from aqueous solutions using imidazolium-based ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 205-210.

Dennison C., Lovrien R., Three phase partitioning: Concentration and purification of proteins, *Protein Expr. Purif.* **1997**, 11, 149-161.

Dhananjay S.K., Mulimani V.H., Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*, *Biotechnol. Lett.* **2008**, 30, 1565-1569.

Dhananjay S.K., Mulimani V.H., Three-phase partitioning of α -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 36, 123-128.

Ding X., Wang Y., Zeng Q., Chen J., Huang Y., Xu K., Design of functional guanidinium ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient purification of protein, *Anal. Chim. Acta* **2014**, 815, 22-32.

Domínguez-Pérez M., Tomé L.I.N., Freire M.G., Marrucho I.M., Cabeza O., Coutinho J.A.P., (Extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 72, 85-91.

Dreyer S., Kragl U., Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 41, 1416-1424.

Dreyer S., Salim P., Kragl U., Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system, *Biochem. Eng. J.* **2009**, 46, 176-185.

Du Z., Yu Y.L., Wang J.H., Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system, *Chem. – Eur. J.* **2007**, 13, 2130-2137.

Du Q.Y., Lin D.Q., Xiong Z.S., Yao S.J., One-Step Purification of Lactoferrin from Crude Sweet Whey Using Cation-Exchange Expanded Bed Adsorption, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, 52, 2693-2699).

Duman Y.A., Kaya E., Three-phase partitioning as a rapid and easy method for the purification and recovery of catalase from sweet potato tubers (*Solanum tuberosum*), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, 170, 1119-1126.

ECHA (*European Chemicals Agency*), tert-butyl alcohol, **2014** (acceso: mayo 2014), <http://clp-inventory.echa.europa.eu/SummaryOfClassAndLabelling.aspx?SubstanceID=97250&HarmOnly=no?fc=true&lang=en>.

Eugster E., Jakob E., Wechsler D., Cheese, processed cheese, and whey, en: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, *John Wiley & Sons, Inc.*, Weinheim, Alemania, **2012**.

Fortunato R., González-Muñoz M.J., Kubasiewicz M., Luque S., Alvarez J.R., Afonso C.A.M., Coelho I.M., Crespo J.G., Liquid membranes using ionic liquids: the influence of water on solute transport, *J. Membr. Sci.* **2005**, 249, 153-162.

Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H., Whey and Whey Products, en: Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. (eds.), *Fundamentals of Cheese Science*, *Aspen Publishers, Inc.*, Gaithersburg, EE.UU., **2000**, 514-522.

Freire M.G., Louros C.L.S., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A.P., Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications, *Green Chem.* **2011**, 13, 1536-1545.

Freire M.G., Cláudio A.F.M., Araújo J.M.M., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.* **2012a**, 41, 4966-4995.

Freire M.G., Neves C.M.S.S., Lopes J.N.C., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Rebelo L.P.N., Impact of self-aggregation on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B* **2012b**, 116, 7660-7668.

Gautam S., Mukherjee J., Roy I., Gupta M.N., Emerging trends in designing short and efficient protein purification protocols, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2012a**, 8, 230-254.

Gautam S., Dubey P., Rather G.M., Gupta M.N., Non-chromatographic strategies for protein refolding, *Recent Pat. Biotechnol.* **2012b**, 6, 57-68.

Gutowski K.E., Broker G.A., Willauer H.D., Huddleston J.G., Swatloski R.P., Holbrey J.D., Rogers R.D., Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations, *J. Am. Chem Soc.* **2003**, 125, 6632-6633.

Haghtalab A., Paraj A., Mokhtarani B., [1-Ethyl-3-Methyl-Imidazolium][Ethylsulfate]-based aqueous two phase systems: New experimental data and new modelling, *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, 65, 83-90.

- Han X., Armstrong D.W., Ionic Liquids in Separations, *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 1079-1086.
- Han D., Row K.H., Recent applications of ionic liquids in separation technology, *Molecules* **2010**, 15, 2405-2426.
- Han J., Yu C., Wang Y., Xie X., Yan Y., Yin G., Guan W., Liquid-liquid equilibria of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and sodium citrate/tartrate/acetate aqueous two-phase systems at 298.15 K: Experiment and correlation, *Fluid Phase Equilib.* **2010**, 295, 98-103.
- Han J., Wang Y., Yu C.-L., Yan Y.-S., Xie X.-Q., Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1295-1304.
- Harde S.M., Singhal R.S., Extraction of forskolin from *Coleus forskohlii* roots using three phase partitioning, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 96, 20-25.
- Huffman L.M., Harper W.J., Symposium: marketing dairy value through technology. Maximizing the value of milk through separation technologies, *J. Dairy Sci.* **1999**, 82, 2238-2244.
- Jiang Y., Xia H., Guo C., Mahmood I., Liu H., Phenomena and mechanism for separation and recovery of penicillin in ionic liquids aqueous solution, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, 46, 6303-6312
- Kiss E., Szamos J., Tamás B., Borbás R., Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **1998**, 142, 295-302.
- Kiss E., Borbás R., Protein adsorption at liquid/liquid interface with low interfacial tension, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2003**, 31, 169-176.
- Kohno Y., Saita S., Murata K., Nakamura N., Ohno H., Extraction of proteins with temperature sensitive and reversible phase change of ionic liquid/water mixture, *Polym. Chem.* **2011**, 2, 862-867.
- Kohno Y., Nakamura N., Ohno H., Selective Transport of Water-Soluble Proteins from Aqueous to Ionic Liquid Phase via a Temperature-Sensitive Phase Change of These Mixtures, *Aust. J. Chem.* **2012**, 65, 1548-1553.
- Kohno Y., Ohno H., Ionic liquid/water mixtures: from hostility to conciliation, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 7119-7130.
- Kubota F., Koyanagi Y., Nakashima K., Shimojo K., Kamiya N., Goto M., Extraction of cytochrome c by a functionalized ionic liquid containing a crown ether, *Solvent Extr. Res. Dev. Jpn.* **2007**, 14, 115-120.

- Kumar V.V., Sathyaselvabala V., Kirupha S.D., Murugesan A., Vidyadevi T., Sivanesan S., Application of response surface methodology to optimize three phase partitioning for purification of laccase from *Pleurotus ostreatus*, *Sep. Sci. Technol.* **2011a**, 46, 1922-1930.
- Kumar V.V., Premkumar M.P., Sathyaselvabala V.K., Dineshkirupha S., Nandagopal J., Sivanesan S., *Aspergillus niger* exo-inulinase purification by three phase partitioning, *Eng. Life Sci.* **2011b**, 11, 607-614.
- Li Z., Pei Y., Wang H., Fan J., Wang J., Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes, *Trac-Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 1336-1346.
- Li Y., Liu Q., Zhang M., Su H., Liquid-liquid equilibrium of the [4-MBP][BF₄]-NaCl-H₂O systems at $T=293.15, 303.15, 313.15,$ and 323.15 K: Experimentation and correlation, *Thermochim. Acta* **2013a**, 565, 234-240.
- Li Y., Zhang M., Liu Q., Su H., Phase behaviour for aqueous two-phase systems containing the ionic liquid 1-butylpyridinium tetrafluoroborate/1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate and organic salts (sodium tartrate/ammonium citrate/trisodium citrate) at different temperatures, *J. Chem. Thermodyn.* **2013b**, 66, 80-87.
- Lin X., Wang Y., Zeng Q., Ding X., Chen J., Extraction and separation of proteins by ionic liquid aqueous two-phase systems, *Analyst* **2013**, 138, 6445-6453.
- Lovrein R.E., Goldensoph C., Anderson P., Odegard B., Three Phase Partitioning (TPP) Via T-Butanol: Enzyme Separation from Crudes, en: R. Burgess (ed.), Protein Purification, Micro to Macro, *Marcel Dekker Inc.*, Nueva York, EE.UU., **1987**, 131-148.
- Lu R.R., Xu S.Y., Wang Z., Yang R.J., Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale, *J. Membr. Sci.* **2007**, 297, 152-161.
- Lu Y., Lu W., Wang W., Guo Q., Yang Y., Thermodynamic studies of partitioning behavior of cytochrome c in ionic liquid-based aqueous two-phase system, *Talanta* **2011**, 85, 1621-1626.
- Madureira A.R., Pereira C.I., Gomes A.M.P., Pintado M.E., Malcata F.X., Bovine whey proteins – Overview on their biological properties, *Food Res. Int.* **2007**, 40, 1197-1211.
- Martínez-Aragón M., Burghoff S., Goetheer E.L.V., de Haan A.B., Guidelines for solvent selection for carrier mediated extraction of proteins, *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 65, 65-72.
- Mondal K., Sharma A., Lata, Gupta M.N., Macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning (MLFTPP) of α -amylases using a modified alginate, *Biotechnol. Prog.* **2003a**, 19, 493-494.
- Mondal K., Sharma A., Gupta M.N., Macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning for purification of glucoamylase and pullulanase using alginate, *Protein Expr. Purif.* **2003b**, 28, 190-195.

Müller A., Górak A., Extraction of 1,3-propanediol from aqueous solutions using different ionic liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 130-136.

Narayan A.V., Madhusudhan M.C., Raghavarao K.S.M.S., Extraction and purification of *ipomoea* peroxidase employing three-phase partitioning, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, 151, 263-272.

Ndiaye N., Pouliot Y., Saucier L., Beaulieu L., Bazinet L., Electroseparation of bovine lactoferrin from model and whey solutions, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 74, 93-99.

Neves C.M.S.S., Ventura S.P.M., Freire M.G., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Evaluation of cation influence on the formation and extraction capability of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 5194-5199.

Novak U., Pohar A., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction within a microchannel system, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 172-178.

Nyström M., Aimar P., Luque S., Kulovaara M., Metsämuuronen S., Fractionation of model proteins using their physicochemical properties, *Colloids Surf., A* **1998**, 138, 185-205.

Oliveira F.S., Araújo J.M.M., Ferreira R., Rebelo L.P.N., Marrucho I.M., Extraction of L-lactic, L-malic, and succinic acids using phosphonium-based ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 85, 137-146.

Özer B., Akardere E., Çelem E.B., Önal S., Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato, *Biochem. Eng. J.* **2010**, 50, 110-115.

Patel R., Kumari M., Khan A.B., Recent Advances in the Applications of Ionic Liquids in Protein Stability and Activity: A Review, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 172, 3701-3720.

Pei Y., Wang J., Wu K., Xuan X., Lu X., Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins, *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 64, 288-295.

Pei Y., Li Z., Liu L., Wang J., Wang H., Selective separation of protein and saccharides by ionic liquids aqueous two-phase systems, *Sci. China Chem.* **2010**, 53, 1554-1560.

Pei Y., Li L., Li Z., Wu C., Wang J., Partitioning Behavior of Wastewater Proteins in Some Ionic Liquids-Based Aqueous Two-Phase Systems, *Sep. Sci. Technol.* **2012**, 72, 85-91.

Pereira J.F.B., Ventura S.P.M., E Silva F.A., Shahriari S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and polymers: A platform for the purification of biomolecules, *Sep. Purif. Technol.* **2013**, 113, 83-89.

Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J., Cheese whey management: A review, *J. Environ. Manage.* **2012**, 110, 48-68.

Przybycien T.M., Pujar N.S., Steele L.M., Alternative bioseparation operations: Life beyond packed-bed chromatography, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 469-478.

Raghava S., Gupta M.N., Tuning permeabilization of microbial cells by three-phase partitioning, *Anal. Biochem.* **2009**, 385, 20-25.

Rajeeva S., Lele S.S., Three-phase partitioning for concentration and purification of laccase produced by submerged cultures of *Ganoderma* sp. WR-1, *Biochem. Eng. J.* **2011**, 54, 103-110.

Rather G.M., Gupta M.N., Three phase partitioning leads to subtle structural changes in proteins, *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 60, 134-140.

Rawdkuen S., Chaiwut P., Pintathong P., Benjakul S., Three-phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex, *Biochem. Eng. J.* **2010**, 50, 145-149.

Rawdkuen S., Vanabun A., Benjakul S., Recovery of proteases from the viscera of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) by three-phase partitioning, *Process Biochem.* **2012**, 47, 2566-2569.

Roy I., Sharma A., Gupta M.N., Three-phase partitioning for simultaneous renaturation and partial purification of *Aspergillus niger* xylanase, *BBA-Proteins Proteomics* **2004**, 1698, 107-110.

Ruiz-Angel M.J., Pino V., Carda-Broch S., Berthod A., Solvent systems for countercurrent chromatography: An aqueous two phase liquid system based on a room temperature ionic liquid, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1151, 65-73.

Santos M.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R., Fractionation and recovery of whey proteins by hydrophobic interaction chromatography, *J. Chromatogr. B* **2011**, 879, 475-479.

Saxena L., Iyer B.K., Ananthanarayan L., Three phase partitioning as a novel method for purification of ragi (*Eleusine coracana*) bifunctional amylase/protease inhibitor, *Process Biochem.* **2007**, 42, 491-495.

Sen A., Eryilmaz M., Bayraktar H., Önal S., Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning, *Sep. Purif. Technol.* **2011**, 83, 130-136.

Shahriari S., Neves C.M.S.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Role of the Hofmeister series in the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 7252-7258.

Shahriari S., Tomé L.C., Araújo J.M.M., Rebelo L.P.N., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M., Freire M.G., Aqueous biphasic systems: A benign route using cholinium-based ionic liquids, *RSC Adv.* **2013**, 3, 1835-1843.

Sharma S., Gupta M.N., Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization, *Protein Expr. Purif.* **2001**, 21, 310-316.

Sharma A., Gupta M.N., Three phase partitioning of carbohydrate polymers: Separation and purification of alginates, *Carbohydr. Polym.* **2002**, 48, 391-395.

Sharma A., Khare S.K., Gupta M.N., Three phase partitioning for extraction of oil from soybean, *Bioresour. Technol.* **2002**, 85, 327-329.

Sharma A., Mondal K., Gupta M.N., Separation of enzymes by sequential macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning, *J. Chromatogr. A* **2003**, 995, 127-134.

Shimojo K., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., Crown ether-mediated extraction and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids, *Biomacromolecules* **2006a**, 7, 2-5.

Shimojo K., Kamiya N., Tani F., Naganawa H., Naruta Y., Goto M., Extractive solubilization, structural change, and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids via crown ether complexation, *Anal. Chem.* **2006b**, 78, 7735-7742.

Soto A., Arce A., Khoshkbarchi M.K., Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid, *Sep. Purif. Technol.* **2005**, 44, 242-246.

Stark A., Seddon K.R., Ionic liquids, en: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, *John Wiley & Sons, Inc.* **2007**, Vol. 26, 836-920.

Szamos J., Jánosi A., Tamás B., Kiss É., A novel partitioning method as a possible tool for investigating meat. I, *Eur. Food Res. Technol.* **1998a**, 206, 208-212.

Szamos J., Aubrecht E., Gelencsér É., Detection of wheat by adapted polymerase chain reaction (PCR) methodology, *Acta Aliment.* **1998b**, 27, 87-95.

Tan K.H., Lovrien R., Enzymology in aqueous-organic cosolvent binary mixtures, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 3278-3285.

Tomé L.I.N., Domínguez-Pérez M., Cláudio A.F.M., Freire M.G., Marrucho I.M., Cabeza O., Coutinho J.A.P., On the interactions between amino acids and ionic liquids in aqueous media, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 13971-13979.

Tomé L.I.N., Catambas V.R., Teles A.R.R., Freire M.G., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Tryptophan extraction using hydrophobic ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 72, 167-173.

Tonova K., Separation of poly- and disaccharides by biphasic systems based on ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 89, 57-65.

Tzeng Y.-P., Shen C.-W., Yu T., Liquid-liquid extraction of lysozyme using a dye-modified ionic liquid, *J. Chromatogr. A* **2008**, 1193, 1-6.

Ujhelyi G., Gelencsér É., Szamos J., Rapid and economical DNA extraction method from meat matrices containing soybean flour, *Acta Aliment.* **2011**, 40, 426-435.

Valiño V., San Román M.F., Ibañez R., Ortiz I., Improved separation of bovine serum albumin and lactoferrin mixtures using charged ultrafiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* **2014**, 125, 163-169.

- Ventura S.P.M., Neves C.M.S.S., Freire M.G., Marrucho I.M., Oliveira J., Coutinho J.A.P., Evaluation of anion influence on the formation and extraction capacity of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 9304-9310.
- Ventura S.P.M., Sousa S.G., Serafim L.S., Lima A.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Ionic liquid based aqueous biphasic systems with controlled pH: The ionic liquid cation effect, *J. Chem. Eng. Data* **2011a**, 56, 4253-4260.
- Ventura S.P.M., Sousa S.G., Freire M.G., Serafim L.S., Lima Á.S., Coutinho J.A.P., Design of ionic liquids for lipase purification, *J. Chromatogr. B* **2011b**, 879, 2679-2687.
- Ventura S.P.M., Sousa S.G., Serafim L.S., Lima A.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems with controlled pH: The ionic liquid anion effect, *J. Chem. Eng. Data* **2012a**, 57, 507-512.
- Ventura S.P.M., De Barros R.L.F., De Pinho Barbosa J.M., Soares C.M.F., Lima A.S., Coutinho J.A.P., Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems, *Green Chem.* **2012b**, 14, 734-740.
- Ventura S.P.M., Santos-Ebinuma V.C., Pereira J.F.B., Teixeira M.F.S., Pessoa A., Coutinho J.A.P., Isolation of natural red colorants from fermented broth using ionic liquid-based aqueous two-phase systems, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 40, 507-516.
- Wakabayashi H., Yamauchi K., Takase M., Lactoferrin research, technology and applications, *Int. Dairy J.* **2006**, 16, 1241-1251.
- Walzem R.L., Dillard C.J., German J.B., Whey Components: Millennia of Evolution Create Functionalities for Mammalian Nutrition: What We Know and What We May Be Overlooking, *Crit. Rev. Food Sci.* **2002**, 42, 353-375.
- Wang J., Pei Y., Zhao Y., Hu Z., Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media, *Green Chem.* **2005**, 7, 196-202.
- Wang Y., Han J., Xie X., Li C., Extraction of trace acetylspiramycin in real aqueous environments using aqueous two-phase system of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and phosphate, *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, 8, 1185-1191.
- Ward W.W., Three-phase partitioning for protein purification, *Innovations Pharm. Technol.* **2009**, 28-34.
- Ward W.W., Swiatek G., Protein purification, *Curr. Anal. Chem.* **2009**, 5, 85-105.
- Wati R.K., Theppakorn T., Benjakul S., Rawdkuen S., Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds, *Process Biochem.* **2009**, 44, 1307-1314.

Wu C., Wang J., Wang H., Pei Y., Li Z., Effect of anionic structure on the phase formation and hydrophobicity of amino acid ionic liquids aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 8587-8593.

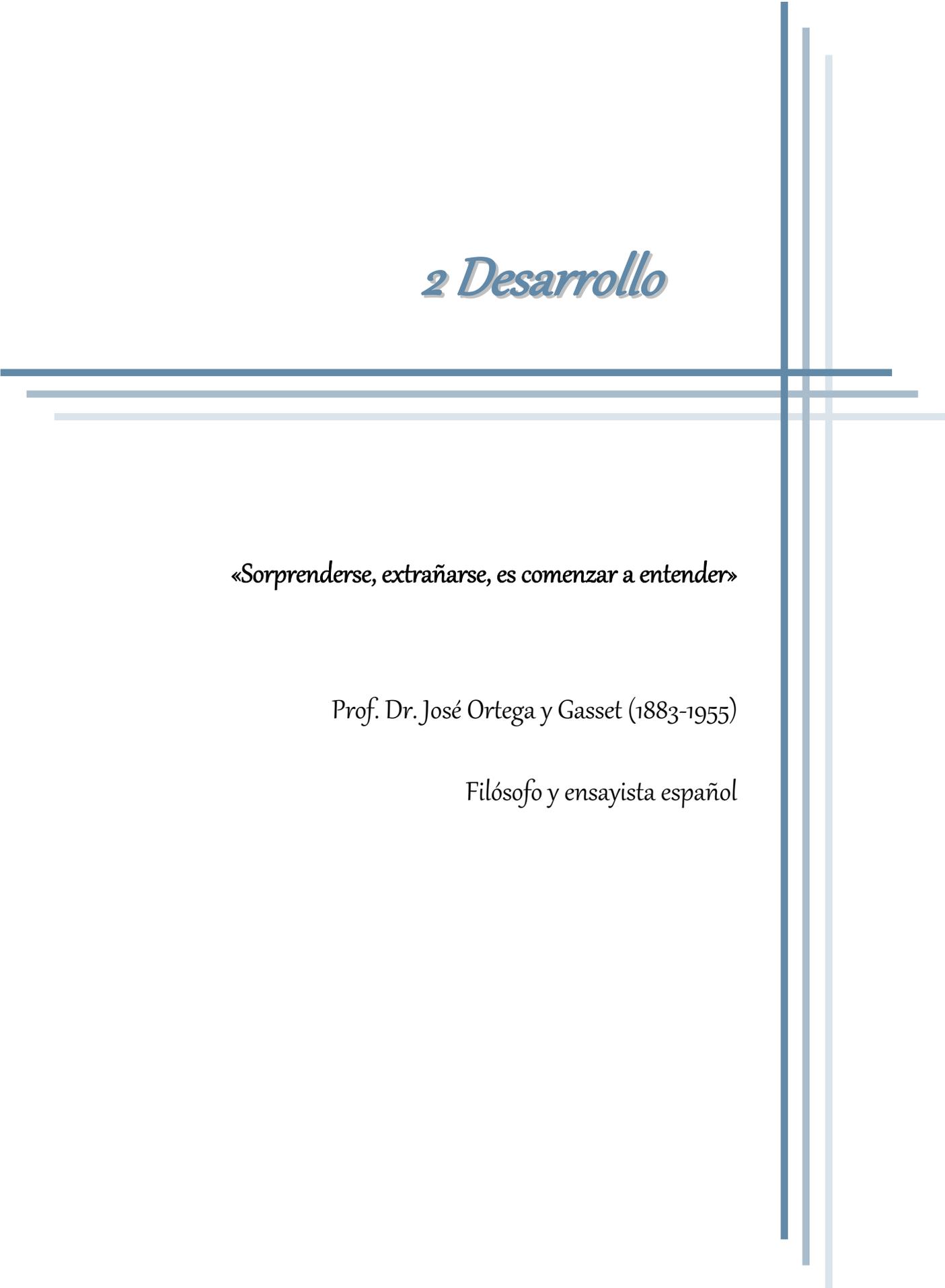
Wu C., Wang J., Li Z., Jing J., Wang H., Relative hydrophobicity between the phases and partition of cytochrome-c in glycine ionic liquids aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. A* **2013**, 1305, 1-6.

Zeng Q., Wang Y., Li N., Huang X., Ding X., Lin X., Huang S., Liu X., Extraction of proteins with ionic liquid aqueous two-phase system based on guanidine ionic liquid, *Talanta* **2013**, 116, 409-416.

Zhang J., Zhang Y., Chen Y., Zhang S., Mutual coexistence curve measurement of aqueous biphasic systems composed of [bmim][BF₄] and glycine, L-serine, and L-proline, respectively, *J. Chem. Eng. Data* **2007**, 52, 2488-2490.

Zydney A.L., Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation, *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 243-250.

2 Desarrollo



«Sorprenderse, extrañarse, es comenzar a entender»

Prof. Dr. José Ortega y Gasset (1883-1955)

Filósofo y ensayista español

CAPÍTULO 2. DESARROLLO

2.1. Experimentos previos de extracción de lactoferrina con líquidos iónicos hidrofóbicos

El estudio de la extracción de proteínas mediante líquidos iónicos hidrofóbicos se realizó en sistemas experimentales basados en el empleo de tubos en U, como se muestra en el esquema de la figura 2.1.1. En cada tubo en U, el líquido iónico se dispone en su parte inferior, mientras que las fases acuosas que forman las disoluciones de alimentación y de reextracción ocupan las dos ramas del tubo. De este modo, ambas disoluciones acuosas están separadas por el líquido iónico hidrofóbico, que actúa como membrana líquida tipo "bulk". El volumen de cada una de las fases es de 7,5 mL, manteniéndose agitada a 300 rpm la fase constituida por el líquido iónico para asegurar su homogeneidad. Este tipo de sistema experimental permite evaluar tanto la extracción como la reextracción del compuesto de interés considerando únicamente la influencia del líquido iónico y de las condiciones de operación, pero evitando la interacción con otras variables como pudieran ser los materiales soporte en membranas soportadas (Branco et al., 2002).

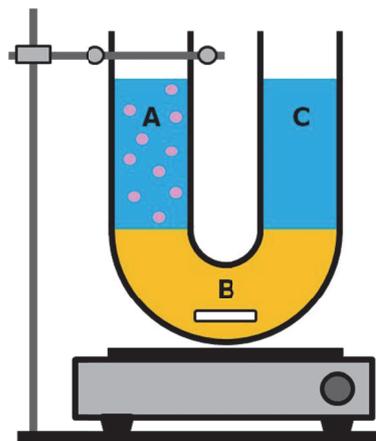


Figura 2.1.1. Esquema del sistema experimental para evaluar la extracción/reextracción de proteínas con líquidos iónicos hidrofóbicos. (A) Fase acuosa de alimentación, que contiene la proteína objeto de estudio; (B) líquido iónico; (C) fase acuosa de reextracción.

Durante el transcurso de los experimentos, la concentración de la proteína en las fases acuosas se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis a 280 nm (Adam et al., 2008; Pei et al., 2009), empleando para ello un espectrofotómetro modelo Hach Lange DR 5000 UV-Vis. En cada medición, se tomaron 2,5 mL de cada fase acuosa, los cuales se devolvían al tubo en U inmediatamente después de la medición (Fortunato et al., 2005). La concentración de la proteína en el líquido iónico se calculó por diferencia a través del balance de materia a la

proteína, asumiendo que el volumen de las distintas fases permanece constante, dada la elevada hidrofobicidad de los líquidos iónicos empleados que minimiza el mezclado de las fases. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y contaron con un tubo en U que actuaba de blanco (con idéntica composición al resto de los tubos del experimento, pero sin la presencia de proteína) para asegurar que el líquido iónico no interfería en la medición.

La lactoferrina (LF) empleada en el estudio fue proporcionada gratuitamente por *The Tatua Co-operative Dairy Company Limited* (Nueva Zelanda) con una pureza del 98,6 % y un porcentaje de saturación en hierro igual a 8 %. La seroalbúmina bovina (SAB o, en su acrónimo inglés, BSA, que será el empleado) fue suministrada por Sigma-Aldrich (Alemania) con una pureza superior al 98 %. En relación a los líquidos iónicos, la bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimNTf₂) fue adquirida a IoLiTec (Alemania) y el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimPF₆) fue proporcionado por Solchemar (Portugal). Una información más detallada de los reactivos empleados en este estudio puede encontrarse en el trabajo de Alvarez-Guerra e Irabien (2012).

El proceso de extracción se caracteriza mediante la eficiencia de extracción, E (Liu et al. 2006; Cheng et al., 2008a; Wang et al., 2010; Han et al., 2011), definida como la fracción del soluto que se ha extraído de la fase de alimentación, de acuerdo a la ecuación 2.1.1:

$$E(\%) = \frac{[X]_{F,0} - \min([X]_{F,t})}{[X]_{F,0}} 100 \quad (2.1.1)$$

donde $[X]_{F,0}$ representa la concentración inicial de la proteína X (donde X puede ser LF o BSA) en la fase de alimentación (denotada como A en la figura 2.1.1) y $[X]_{F,t}$ es la concentración de proteína en A medida en un tiempo t durante el experimento. Puesto que E depende de un único punto experimental, es muy sensible al error experimental. Por esta razón, la evolución temporal de la concentración de la proteína en A se ajustó a la ecuación 2.1.2:

$$[X]_{F,t}^* = r + (1 - r) \exp(-kt) \quad (2.1.2)$$

donde $[X]_{F,t}^*$ es la concentración adimensional de la proteína en A, k es la constante cinética y r se define según:

$$r = \frac{[X]_{F,\infty}}{[X]_{F,0}} \quad (2.1.3)$$

donde $[X]_{F,\infty}$ es la concentración de proteína en A cuando se alcanza el equilibrio. La ecuación 2.1.2 se corresponde con una cinética de pseudo-primer orden con respecto de la fuerza impulsora, que es la diferencia entre $[X]_{F,t}$ y $[X]_{F,\infty}$. El parámetro r representa la fracción de proteína que permanece en la fase de alimentación en el equilibrio, de modo que el significado

de $(1-r)$ expresado como porcentaje puede identificarse con el de la eficiencia de extracción, E , con la salvedad de que este último se calcula a partir de un único punto experimental y $(1-r)$ a partir de toda la evolución temporal de la concentración.

Como paso previo al estudio de las diferentes variables que pueden tener influencia en el proceso de extracción, se procedió a la selección del líquido iónico con el cual se realizaría dicho análisis. Para este objetivo, se evaluaron dos líquidos iónicos: BmimPF₆ y BmimNTf₂. El primero, BmimPF₆, es el líquido iónico comercial empleado por Cheng et al. (2008a) para extraer de forma prometedora proteínas como la hemoglobina que, al igual que la LF, también contienen átomos de hierro. Por su parte, BmimNTf₂ es seleccionado como ejemplo de otro líquido iónico altamente hidrofóbico que contiene el catión Bmim⁺ (que es el que interactúa con los átomos de hierro de la proteína).

Los resultados del proceso de extracción señalan que la eficiencia es significativamente mayor cuando se emplea BmimPF₆: 21 % frente a 12 %. Estos resultados son consistentes con la diferente hidrofobicidad de ambos líquidos iónicos, ya que en términos de solubilidad en agua, la de BmimPF₆ (2 %) es más del doble que la de BmimNTf₂ (0,7 %). Esta relación inversa entre eficiencia de extracción e hidrofobicidad ya ha sido reportada en trabajos previos relativos a la extracción de proteínas (Shimojo et al., 2006; Zhao et al., 2009) o aminoácidos (Wang et al., 2005; Absalan et al., 2010). Desde un punto de vista de proceso, es deseable que la solubilidad en agua del líquido iónico sea la menor posible, ya que así se reducirán sus pérdidas, facilitando su recuperación y reutilización. Además, Freire et al. (2010) han estudiado la estabilidad de diferentes líquidos iónicos, concluyendo que el BmimPF₆ puede experimentar hidrólisis en contacto con disoluciones acuosas. Si bien no se detectaron cambios en el pH que pusieran de relieve dicha hidrólisis, por su mayor estabilidad y su menor solubilidad en agua, se seleccionó al BmimNTf₂ como el líquido iónico con el que se realiza el resto del estudio.

En el estudio del proceso de extracción, se analiza la influencia del pH, fuerza iónica y concentración de la proteína en la extracción de LF mediante BmimNTf₂. En la tabla 2.1.1 se muestran las condiciones experimentales analizadas en dicho estudio. Asimismo, se evalúa la selectividad ideal del proceso hacia la LF con respecto de la BSA. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, reportándose como valores experimentales el promedio de las dos réplicas. En todos los casos, ambas réplicas presentaron resultados muy similares, como lo demuestra que la desviación absoluta media fuese de $\pm 0,4$ %.

Tabla 2.1.1. Condiciones experimentales del estudio de la extracción de LF con BmimNTf₂.

No exp.	Concentración de LF (g L ⁻¹)	Fase alimentación (A)		Fase reextracción (C)	
		pH	Fuerza iónica (M)	pH	Fuerza iónica (M)
1	0,10	3,2	0,03	3,2	0,03
2	0,10	6,4	0,03	3,2	0,03
3	0,10	8,2	0,03	3,2	0,03
4	0,10	8,2	0,30	3,2	0,03
5	0,35	8,2	0,03	3,2	0,03
6	1,0	8,2	0,03	3,2	0,03
7	2,0	8,2	0,03	3,2	0,03
8	0,10	6,4	0,01	4,6	0,06
9	0,10	6,4	0,01	(Agua desionizada)	
10*	0,10	8,2	0,03	3,2	0,03
11	0,10	4,6	0,06	6,4	0,01

*El líquido iónico, BmimNTf₂, estuvo en contacto con dodecilsulfato de sodio (SDS) durante una semana antes del experimento.

a. Influencia del pH

La influencia del pH en el proceso de extracción se llevó a cabo modificando el pH de la disolución de alimentación (A) de acuerdo a los valores 3,2 (exp. 1), 6,4 (exp. 2) y 8,2 (exp. 3). Estos pH, por un lado, permanecen dentro del rango de esta variable en el que la LF es estable a temperatura ambiente (Sreedhara et al., 2010a; Sreedhara et al., 2010b), y por otro lado, se pueden alcanzar con sistemas tampón fosfato, de modo que todos ellos puedan prepararse con los mismos reactivos (H₃PO₄ y KOH) evitando que la naturaleza de la sal pueda interferir en el estudio.

La tabla 2.1.2 recoge los resultados de los experimentos incluidos en el estudio de la influencia del pH. Como puede apreciarse, esta influencia del pH es moderada y conduce a una menor eficiencia de extracción a pH ácidos. Así, mientras se obtiene una eficiencia de extracción del 9 % (o, en términos de $1-r=0,08$) a pH de alimentación igual a 3,2, para valores de pH próximos a la neutralidad (6,4 y 8,2) se alcanzan eficiencias superiores a 12 % ($1-r=0,11$) siendo los resultados a estos pH cercanos a la neutralidad no significativamente distintos entre sí. En relación a la cinética de la extracción, el pH no presenta una influencia significativa sobre la misma.

Tabla 2.1.2. Eficiencia de extracción, E , y parámetros de ajuste (r y k) de los experimentos incluidos en el estudio de la influencia del pH de la fase de alimentación, pH_A .

N° exp.	pH_A	E (%)	Parámetros de ajuste		
			r	k (min^{-1})	R^2
1	3,2	9,1	$0,922 \pm 0,006$	$7,27 \pm 3,25 \cdot 10^{-3}$	0,899
2	6,4	12,6	$0,885 \pm 0,006$	$6,25 \pm 1,60 \cdot 10^{-3}$	0,946
3	8,2	12,4	$0,888 \pm 0,008$	$5,75 \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$	0,928

La influencia del pH en los procesos de extracción con proteínas se asocia a los cambios que dicha variable origina en la carga de estas biomoléculas y, por consiguiente, al impacto que ello tiene en la importancia de las interacciones electrostáticas (Dreyer et al., 2009; Pei et al., 2009). En el caso de la LF, la carga positiva que posee a $pH=3,2$ disminuye de forma monótona a medida que aumenta el pH hasta casi desaparecer a $pH=8,2$ (Peinado et al., 2010), dado que su punto isoeléctrico se sitúa en ese entorno de pH, 8-9 (Rabiller-Baudry et al., 2001). Por consiguiente, si la influencia del pH se debiese fundamentalmente a las variaciones de carga de la proteína, la tendencia observada entre los resultados a $pH=3,2$ y $6,4$ debería mantenerse en el caso de los resultados obtenidos a $pH=8,2$, obteniendo valores de eficiencia de la extracción superiores y no iguales a los de $pH=6,4$. Así, se concluye que las interacciones electrostáticas entre la LF y el líquido iónico no parecen ser la principal fuerza impulsora del proceso.

Por su parte, Cheng et al. (2008a) han estudiado la extracción de hemoglobina mediante el empleo de líquidos iónicos basados en cationes de núcleo imidazolio, explicando estos resultados mediante la formación de un enlace covalente coordinado entre el catión del líquido iónico y el átomo de hierro del grupo hemo de la proteína. En el caso de la LF, esta posee hasta 2 átomos de hierro por molécula, aunque lo más habitual es que únicamente esté parcialmente saturada de hierro (la LF empleada en estos experimentos tiene una saturación en hierro del 8%). No obstante, la cantidad de hierro presente en la LF varía de forma acusada con el pH, dado que esta es máxima a pH neutros y se reduce considerablemente a pH ácidos (Sreedhara et al., 2010b).

Por lo tanto, podría concluirse que de forma análoga a lo descrito para la hemoglobina, los átomos de hierro juegan un papel fundamental en la extracción de LF con líquidos iónicos de base imidazolio. Ello explicaría que los resultados obtenidos a $pH=6,4$ y $8,2$ no fuesen significativamente distintos, ya que la cantidad de hierro contenido en la proteína es la misma a ambos pH, de acuerdo a Sreedhara et al. (2010b). Por otro lado, un nivel de saturación en hierro de la LF del 8 % implica que hasta un máximo del 16 % de moléculas de proteína podrían contener un átomo de hierro, con lo que los valores de eficiencias de extracción obtenidos se podrían asociar a altas tasas de extracción de las moléculas de LF que contuviesen hierro.

b. Influencia de la fuerza iónica

La influencia de la fuerza iónica en el proceso de extracción se realiza incrementando un orden de magnitud esta variable, desde 0,03 hasta 0,30 M (ver exp. 3 y 4 en la tabla 2.1.1). Un valor de fuerza iónica igual a 0,30 M se considera elevado puesto que dobla el correspondiente a las concentraciones salinas isotónicas de muchos seres vivos (0,15 M), que marcan el límite de las fuerzas iónicas clasificadas como bajas (Franks, 1993). En la tabla 2.1.3 se muestran los resultados de los experimentos incluidos en el estudio de la influencia de la fuerza iónica.

Tabla 2.1.3. Eficiencia de extracción, E , y parámetros de ajuste (r y k) de los experimentos incluidos en el estudio de la influencia de la fuerza iónica de la fase de alimentación, I_A .

N° exp.	I_A (M)	E (%)	Parámetros de ajuste		
			r	k (min^{-1})	R^2
3	0,03	12,4	$0,888 \pm 0,008$	$5,75 \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$	0,928
4	0,30	4,0	$0,966 \pm 0,004$	$1,28 \pm 0,65 \cdot 10^{-3}$	0,835

Como puede apreciarse, el aumento en un orden de magnitud de la fuerza iónica de la disolución de alimentación provoca que la constante cinética del proceso sea casi 4 veces inferior y la eficiencia de extracción se reduzca a menos de un tercio. De igual forma que se apuntó para el pH, la influencia de la fuerza iónica no sólo debería asociarse a posibles cambios de conformación de la proteína, sino también a la capacidad que la LF tiene para enlazarse con los átomos de hierro. De hecho, Kawakami et al. (1992) han demostrado que incluso para fuerzas iónicas iguales a 0,10 M, la LF experimenta una notable disminución de su contenido en hierro.

c. Influencia de la concentración de proteína

La dependencia del proceso de extracción de la concentración de LF en la disolución de alimentación se estudia en el rango 0,10-2,0 g L⁻¹ (exp. 3 y 5-7), cuyos resultados se exponen en la tabla 2.1.4. La eficiencia de extracción disminuye drásticamente con la concentración, ya que se reduce desde un 12 % para concentraciones de LF de 0,10 g L⁻¹ hasta valores ligeramente superiores al 1 % cuando se trabaja a 2,0 g L⁻¹. De este modo, la eficiencia (medida tanto a través de E como de $1-r$) se reduce en un orden magnitud como resultado de que la cantidad de proteína extraída se incrementa en un factor de 2, mientras que la concentración de la disolución de alimentación se multiplica por 20. Esta misma reducción de la eficiencia de extracción con la concentración también ha sido descrita en otros trabajos en el campo de la extracción con líquidos iónicos (Yan-Ying et al., 2007; Cheng et al., 2008b).

Tabla 2.1.4. Eficiencia de extracción, E , y parámetros de ajuste (r y k) de los experimentos incluidos en el estudio de la influencia de la concentración de lactoferrina en la fase de alimentación, $[LF]_F$.

Nº exp.	$[LF]_F$ (g L ⁻¹)	E (%)	Parámetros de ajuste		
			r	k (min ⁻¹)	R^2
3	0,10	12,4	0,888±0,008	5,75±1,95·10 ⁻³	0,928
5	0,35	4,7	0,955±0,002	3,22±0,91·10 ⁻³	0,927
6	1,0	2,1	0,981±0,002	2,51±0,98·10 ⁻³	0,874
7	2,0	1,5	0,987±0,001	1,88±0,82·10 ⁻²	0,908

En el equilibrio, se debe cumplir la ecuación 2.1.4:

$$a = \bar{a} \quad (2.1.4)$$

donde a y \bar{a} son las actividades del soluto (LF) en las fases acuosa y orgánica, respectivamente. Considerando la definición de actividad para una concentración de soluto $[X]$:

$$a = \gamma \cdot [X] \quad (2.1.5)$$

donde γ es el coeficiente de actividad, se obtiene la siguiente definición de coeficiente de distribución, D , para presiones relativamente bajas (p. ej. atmosférica):

$$D = \frac{[X]_O}{[X]_A} = \frac{\gamma}{\gamma} \quad (2.1.6)$$

donde el subíndice O o las líneas sobre las variables hacen referencia a la fase orgánica y el subíndice A a la fase acuosa. Aplicando la ecuación 2.1.6 al caso de la separación de lactoferrina mediante líquidos iónicos, D se calcula como el cociente entre la concentración de lactoferrina en el líquido iónico (fase orgánica) en el equilibrio, $[LF]_{IL,\infty}$, y la concentración de esta proteína en la fase acuosa $[LF]_{A,\infty}$:

$$D = \frac{[LF]_{IL,\infty}}{[LF]_{A,\infty}} \equiv \frac{1-r}{r} \quad (2.1.7)$$

La figura 2.1.2 representa D frente a $[LF]_{A,\infty}$ y $[LF]_{IL,\infty}$, expresada en coordenadas logarítmicas. De acuerdo a lo expuesto en el presente apartado, D disminuye de forma notable con la concentración de la proteína. Esta reducción del coeficiente de reparto con la concentración permite concluir que la extracción está limitada por la solubilidad de la lactoferrina. Por lo tanto, puede deducirse que la influencia de variables como el pH o la fuerza iónica en el proceso de extracción puede atribuirse, además de a la variación que origina en el contenido en átomos de hierro de cada molécula de proteína, a cambios en los coeficientes de

actividad, de acuerdo a lo expresado por la ecuación 2.1.6. Puede apreciarse en la figura 2.1.2 cómo la influencia de la concentración de lactoferrina en la fase orgánica es muy superior a la influencia en la fase acuosa, como lo refleja el mayor valor absoluto de la pendiente de la recta de ajuste de $\log(D)$ en función de $\log([LF]_{IL,\infty})$. Ello implica que la concentración tiene mayor influencia sobre el coeficiente de actividad de la lactoferrina en la fase orgánica. Finalmente, cabe resaltar que el hecho de que la eficiencia de extracción se vea favorecida a bajas concentraciones de lactoferrina hace que este proceso sea especialmente adecuado para separar esta proteína en medios donde se encuentre en pequeñas cantidades, como sucede en el lactosuero bovino.

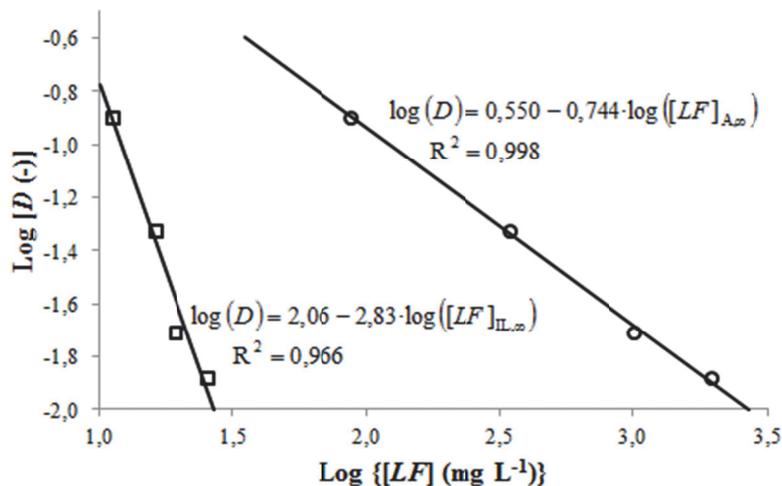


Figura 2.1.2. Coeficiente de reparto, D , respecto de las concentraciones de lactoferrina en el equilibrio en la fase acuosa, $[LF]_{A,\infty}$, y en el líquido iónico, $[LF]_{IL,\infty}$, en coordenadas logarítmicas. (○) D en función de $[LF]_{A,\infty}$; (□) D en función de $[LF]_{IL,\infty}$; (—) Recta de ajuste de cada función.

d. Selectividad con respecto a la BSA

La selectividad del proceso de extracción de LF se ha evaluado con respecto de la BSA. Esta última también se encuentra presente en el lactosuero bovino y se caracteriza por tener una masa molecular similar a la de la LF, lo que dificulta la separación entre ambas por otros métodos (Nyström et al., 1998). Además, debe tenerse presente que debido al bajo valor del lactosuero bovino y la facilidad para reutilizar el líquido iónico del proceso (por su despreciable volatilidad y alta hidrofobicidad que minimizan las pérdidas de este disolvente), así como debido al alto valor añadido de la LF, este proceso podría resultar económicamente competitivo incluso con las relativamente bajas eficiencias reportadas en apartados anteriores. Por todo ello, la variable clave para evaluar la viabilidad del proceso de separación es la selectividad hacia la LF respecto de otras proteínas cuya separación sea especialmente dificultosa, como la BSA. De este modo, se ha analizado la selectividad del proceso, mediante la comparación del proceso de

extracción de LF y BSA en las mismas condiciones que las descritas para el exp. 8 (ver tabla 2.1.1), exponiéndose los resultados en la tabla 2.1.5.

Tabla 2.1.5. Eficiencia de extracción, E , y parámetros de ajuste (r y k) de los experimentos incluidos en el estudio de la selectividad del proceso mediante la extracción de LF y BSA en las mismas condiciones que el experimento 8 (v. tabla 2.1.1).

<i>Proteína</i>	<i>E (%)</i>	<i>Parámetros de ajuste</i>		
		<i>r</i>	<i>k (min⁻¹)</i>	<i>R²</i>
LF	12,4	0,882±0,007	2,24±0,55·10 ⁻³	0,956
BSA	2,1	0,987±0,010	1,49±4,21·10 ⁻³	0,348

De acuerdo a los resultados de la tabla 2.1.5, la cantidad de BSA extraída es prácticamente despreciable, dado que el 98,7 % de esta proteína permanece en la fase acuosa de alimentación en el equilibrio (según el parámetro r). La baja calidad del ajuste de los datos para el experimento con BSA radica precisamente en esta muy baja eficiencia de extracción debida a la muy baja solubilidad de la proteína en el líquido iónico, ya que esta es del mismo orden que el error experimental. Puesto que en estas condiciones la eficiencia de extracción para la LF es del 12 %, la selectividad ideal del proceso hacia la LF con respecto a la BSA es igual a 9, calculada como el ratio de los valores de $(1-r)$ obtenidos para la LF y la BSA. Debe resaltarse que este valor relativamente alto de selectividad es competitivo con los descritos en otros trabajos basados en tecnologías alternativas a las cromatográficas para llevar a cabo esta misma separación, como por ejemplo la electrodiálisis con membranas de ultrafiltración (Ndiaye et al., 2010).

Los diferentes resultados obtenidos para la LF y la BSA pueden explicarse teniendo presente la importante diferencia estructural por la cual la LF presenta hasta dos átomos de hierro por molécula, mientras que la BSA no contiene ninguno en su molécula (Nyström et al., 1998). En consecuencia, se refuerza la idea del papel crucial que los átomos de hierro juegan en la extracción con líquidos iónicos de base imidazolio como el BmimNTf₂ y por lo tanto explicarían la alta selectividad del proceso, de manera análoga a los resultados de Cheng et al. (2008a) para hemoproteínas.

e. Reextracción de la proteína

Los apartados anteriores se han centrado en el proceso de extracción de la proteína. Sin embargo, para conseguir un proceso de recuperación para la LF, no debe estudiarse únicamente su extracción, sino también su reextracción del líquido iónico de forma que se pueda recuperar la proteína de esta fase orgánica. Puesto que en ninguno de los experimentos anteriores se detectó la presencia de la LF en la fase de reextracción, se llevaron a cabo

experimentos adicionales en los que se impusieron moderados cambios simultáneos de pH y fuerza iónica, así como se estudió la influencia de dodecilsulfato de sodio (SDS, en su acrónimo inglés). El empleo de SDS en el proceso viene motivado por el hecho de que fue el único agente reextractante que permitió la reextracción de la hemoglobina de otro líquido iónico de base imidazolio (Cheng et al., 2008a).

En la tabla 2.1.6 se muestra la influencia que todas estas modificaciones tienen sobre la etapa de extracción. Puede apreciarse cómo los ligeros cambios de pH y fuerza iónica introducidos en el exp. 8 y el contacto previo del líquido iónico con SDS durante una semana (exp. 10), no tienen una influencia significativa sobre la eficiencia de extracción al compararse con el exp. 3 de referencia. Además, otro experimento (no incluido en la tabla 2.1.6) en el que se empleó como disolución de reextracción la misma basada en SDS que utilizaron Cheng et al. (2008a) no sólo no consiguió la recuperación de la proteína del líquido iónico, sino que proporcionó menores eficiencias de extracción. Por su parte, el empleo del agua desionizada como fase de reextracción introduce ligeras mejoras en la eficiencia de extracción, lo que puede atribuirse a la menor fuerza iónica que presenta el agua desionizada, que ejerce su influencia en la etapa de extracción a través del coeficiente de actividad en la fase orgánica de la proteína. Finalmente, la reducción de E en más de un 50 % observada en el exp. 11 puede atribuirse a que en el mismo se imponen condiciones desfavorables tanto de pH como de fuerza iónica en la fase de alimentación: un pH ácido (4,6) y una fuerza iónica (0,06 M) que dobla a la empleada en la mayoría de experimentos.

Tabla 2.1.6. Eficiencia de extracción, E , y parámetros de ajuste (r y k) de los experimentos incluidos en el estudio de la reextracción de la lactoferrina.

No exp.	Fase alimentación (A)		Fase reextracción (C)		E (%)	Parámetros de ajuste		
	pH	Fuerza iónica (M)	pH	Fuerza iónica (M)		r	k (min^{-1})	R^2
3	8,2	0,03	3,2	0,03	12,4	$0,888 \pm 0,008$	$5,75 \pm 1,95 \cdot 10^{-3}$	0,928
8	6,4	0,01	4,6	0,06	12,4	$0,882 \pm 0,007$	$2,24 \pm 0,55 \cdot 10^{-3}$	0,956
9	6,4	0,01	(Agua desionizada)		15,8	$0,857 \pm 0,012$	$2,25 \pm 0,79 \cdot 10^{-3}$	0,924
10*	8,2	0,03	3,2	0,03	12,9	$0,886 \pm 0,012$	$2,30 \pm 0,94 \cdot 10^{-3}$	0,882
11	4,6	0,06	6,4	0,01	5,7	$0,954 \pm 0,008$	$1,40 \pm 0,85 \cdot 10^{-3}$	0,813

*El líquido iónico, BmimNTf₂, estuvo en contacto con dodecilsulfato de sodio (SDS) durante una semana antes del experimento.

No obstante, debe resaltarse que en ninguno de los experimentos recogidos en la tabla 2.1.6 se consigue la reextracción de la LF. Además, los resultados del exp. 1 sugieren que la proteína sufre cambios irreversibles en su estructura cuando se encuentra en el líquido iónico

ya que, considerando que en dicho experimento tanto la fase de alimentación como de reextracción son idénticas (ver tabla 2.1.1), de lo contrario debería haberse alcanzado en el equilibrio la misma concentración de proteína en ambas fases acuosas.

Por consiguiente, ante la imposibilidad de recuperar la proteína extraída del líquido iónico y dada su importancia para que el proceso de separación sea técnicamente viable, en el apartado siguiente se analizará la posibilidad de llevar a cabo esta separación mediante el empleo de sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS, en su acrónimo inglés). Si bien esta alternativa (ILATPS) presentará mayor complejidad que el empleo de líquidos iónicos hidrofóbicos en relación a la reutilización del líquido iónico, por estar presentes dos componentes (líquidos iónicos hidrofílicos y sal), constituye la más estudiada para extraer biomoléculas con líquidos iónicos (Domínguez-Pérez, 2010; Alvarez-Guerra e Irabien, 2012), con lo que se persigue así superar las dificultades para recuperar la proteína extraída.

2.2. Viabilidad de la separación de lactoferrina mediante reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP)

De acuerdo a lo expuesto en la sección 2.1, y ante la imposibilidad de conseguir recuperar la proteína extraída cuando se emplean líquidos iónicos hidrofóbicos, se concluyó que el siguiente paso consistiría en analizar la posibilidad de llevar a cabo la separación de la proteína mediante sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (ILATPS, en su acrónimo inglés: *Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems*). En este sentido, en la literatura pueden encontrarse algunos ejemplos en los que se describe la recuperación del soluto en ILATPS basados en el líquido iónico BmimBF₄ (Jiang et al., 2007a, 2007b; Tan et al., 2012a, 2012b). En algunos de estos trabajos, la recuperación del soluto se logra mediante extracción inversa, en la que el líquido iónico es transferido a la fase formada por el extractante empleado en esta segunda etapa. Este segundo disolvente empleado como extractante puede ser otro líquido iónico (p. ej., BmimPF₆) (Jiang et al., 2007a, 2007b) o un disolvente orgánico convencional (p. ej., diclorometano, CH₂Cl₂) (Tan et al., 2012a). Otra alternativa implica retirar la fase rica en sal, añadir agua y sal a la fase rica en líquido iónico y ajustar el pH (Tan et al., 2012b).

De este modo, se intentó sin éxito extraer y recuperar la lactoferrina (LF) con el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄ siguiendo la aproximación propuesta por Jiang et al. (2007b). Sin embargo, en la etapa de extracción se detectó que en los tubos que contenían LF se formaba una pequeña capa blanquecina en la interfase entre las dos fases líquidas. Esta capa blanquecina no se formaba en los blancos, confirmando mediante análisis con el método Bradford que la mayor parte de la proteína se encontraba en ese precipitado en la interfase. Por lo tanto, se obtienen

resultados análogos a los que conduce la técnica de reparto en tres fases (TPP en su acrónimo inglés, *Three Phase Partitioning*). En la figura 2.2.1 se muestran las imágenes de un sistema ILTPP en presencia y en ausencia de proteína, comprobando cómo únicamente en el tubo que contiene proteína se forma la mencionada capa blanquecina en la interfase líquido-líquido.

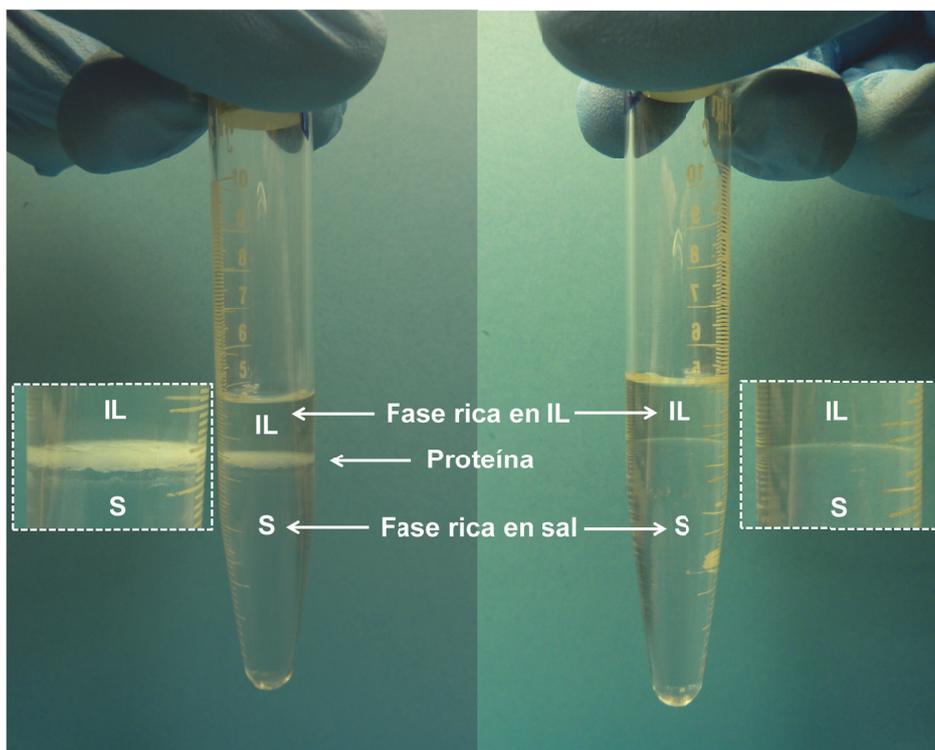


Figura 2.2.1. Fotografías de un sistema ILTPP en presencia (izda.) y ausencia (dcha.) de proteína, ampliando la interfase líquido-líquido entre la fase rica en líquido iónico (IL) y la fase rica en sal (S).

En consecuencia, se propone una nueva técnica para la recuperación de proteínas denominada ILTPP (*Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning*, o en español, reparto en tres fases basado en líquido iónico), que aúna las ventajas tanto de ILATPS como de TPP, tal y como se recoge en la tabla 2.2.1. Así, ILTPP permite recuperar la LF mediante el concurso de ILATPS, esto es, sin necesidad de recurrir a los disolventes convencionales como el t-butanol que emplea la técnica TPP. Cabe destacar que mientras que el enfoque convencional basado en ILATPS persigue extraer el soluto de interés en la fase rica en líquido iónico, con el proceso ILTPP el objetivo se centra en conseguir la acumulación de la proteína que se desea recuperar en la interfase entre las dos fases líquidas.

Tabla 2.2.1. Principales ventajas y desventajas de ILATPS y TPP, y las características de estas técnicas que presenta la ILTPP.

	<i>ILATPS</i>	<i>TPP</i>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la polaridad de las fases • Ambiente biocompatible • Baja formación de emulsiones • Baja viscosidad • Cortos tiempos de separación • Bajos requerimientos energéticos • Escalado fiable 	<ul style="list-style-type: none"> • Recuperación de las proteínas en la interfase • Sencillez • Fácil operación • Bajos costes • Cortos tiempos de separación • Bajos requerimientos energéticos • Escalado fiable
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para recuperar las biomoléculas 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de disolventes orgánicos volátiles

ILTPP

De esta forma, se ha estudiado la distribución de la LF y la seroalbúmina bovina (BSA, en su acrónimo inglés) entre las fases formadas en los sistemas ILTPP. Para ello, la LF utilizada fue suministrada de manera desinteresada por *The Tatura Co-operative Dairy Company Limited* (Nueva Zelanda) con una pureza del 98,6 %, mientras que la BSA fue adquirida a Sigma-Aldrich con una pureza superior al 98 %. Con respecto a los líquidos iónicos empleados, todos ellos fueron adquiridos a IoLiTec (Alemania): trifluorometanosulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimTfO), dicianamida de 1-butil-3-metilimidazolio (Bmimdca), acetato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimOAc) y tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimBF₄). Por su parte, Panreac Química (España) proporcionó los siguientes reactivos: dihidrogenofosfato de sodio, NaH₂PO₄ (122018); cloruro de sodio, NaCl (121659); ácido ortofosfórico, H₃PO₄ (131032); hidróxido de sodio, NaOH (131687); sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄ (131140); t-butanol (131903); y etanol (121085). Finalmente, el azul brillante de Coomassie, que es el reactivo principal del reactivo Bradford, fue suministrado por Merck (Alemania). Una información más detallada de los reactivos empleados en este apartado puede encontrarse en los trabajos de Alvarez-Guerra e Irabien (2014a, 2014b).

La metodología experimental llevada a cabo para el estudio de la distribución de estas proteínas (LF y BSA) en sistemas de reparto en tres fases basados en líquidos iónicos (ILTPP) se sintetiza en la figura 2.2.2. En primer lugar, cantidades predeterminadas de sal, agua y líquido iónico se añaden a los tubos de vidrio graduados de 10 mL. A continuación se añade la proteína mediante 1 mL de disolución de 1 g L⁻¹ de la misma, de forma que se obtenga una concentración de proteína igual a 0,016 % (m/m), excepto en aquellos experimentos en los que se analiza la influencia de esta variable. A continuación, los distintos componentes añadidos a los tubos se mezclan en un agitador rotatorio horizontal a 30 rpm durante 30 min. Una vez mezclados, la separación de fases se consigue por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, para posteriormente dejar los tubos reposando durante 90 min en un baño termostático a la

temperatura deseada. Salvo en los experimentos en los que se estudia la influencia de la temperatura, los tubos se dejarán reposar a 25 °C. Transcurrido ese tiempo, se anota el volumen de las dos fases líquidas y se procede a la determinación de la cantidad de proteína presente en cada fase.

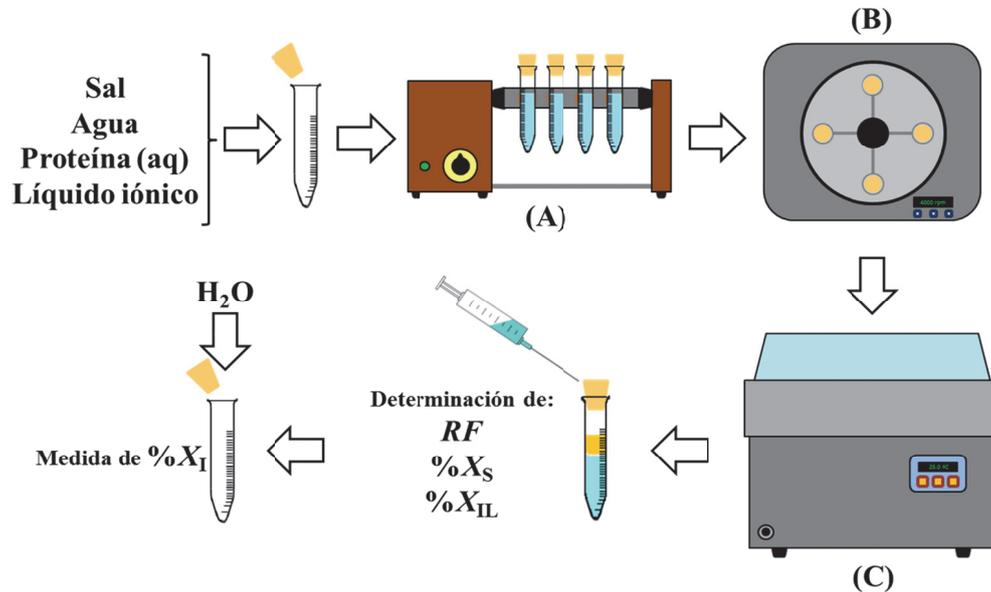


Figura 2.2.2. Metodología para el estudio de la distribución de proteínas en sistemas ILTPP (líquido iónico/sal/agua). (A) Agitador rotatorio horizontal; (B) Centrífuga; (C) Baño termostático. Variables: RF , ratio másico de las fases líquidas; $\%X_i$, porcentaje de proteína X contenida en la fase i, donde X puede ser LF (lactoferrina) o BSA (seroalbúmina bovina) e i puede ser S (fase rica en sal), IL (fase rica en líquido iónico) o I (precipitado en la interfase).

La concentración de proteína en las distintas fases se determinó por el método Bradford (Bradford, 1976), por combinar sencillez y precisión, habiéndose descrito en trabajos previos su uso para medir el contenido en proteínas en los mismos o similares ILATPS (Du et al., 2007; Pei et al., 2009; Lu et al., 2011; Tan et al., 2012a). En este método, se toman 0,1 mL de muestra y se mezclan con 5 mL de reactivo Bradford (solución acuosa compuesta por 0,01 % m/v de azul brillante de Coomassie, 4,7 % m/v de etanol y 8,5 % m/v de H_3PO_4) y, tras 5 min de espera, se mide su absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro Hach Lange DR 5000 UV-Vis.

En cada experimento, se ensayan al menos 3 réplicas acompañadas por un mínimo de 3 blancos con la misma composición de los tubos problema pero sin la proteína, para eliminar cualquier interferencia que el líquido iónico o la sal pudiera tener en la medida (Dreyer et al., 2009; Novak et al., 2012). Además, con el objeto de asegurar la calidad de las medidas, se mide la proteína acumulada en la interfase para cerrar el balance de materia de este componente, de forma que la suma de la cantidad de proteína en cada fase sea igual a la cantidad inicial de la misma presente en el sistema. Para ello, se retiran las dos fases líquidas con una jeringa dejando en los tubos la capa de proteína acumulada en la interfase;

posteriormente, se añade un volumen conocido de agua desionizada y se determina la concentración de proteína mediante el método Bradford.

Los resultados de estos experimentos se expresan en términos de la fracción de proteína presente en cada fase ($\%X_i$) y el ratio másico de las fases líquidas (RF):

$$\%X_i = \frac{M_i^X}{M^{X,0}} 100 \quad (2.2.1)$$

$$RF = \frac{M_S}{M_{IL}} \quad (2.2.2)$$

donde M_i^X es la masa de proteína X contenida en la fase i (i puede ser S para la fase rica en sal, IL para la fase rica en líquido iónico, o I para el precipitado en la interfase líquido-líquido); $M^{X,0}$ es la masa inicial de proteína añadida al sistema; M_S es la masa de la fase acuosa rica en sal; M_{IL} es la masa de la fase acuosa rica en líquido iónico; y X denota a la proteína, que puede ser LF o BSA dependiendo del experimento.

La variable RF se calcula mediante la determinación de M_S a partir de los valores del volumen y densidad de esta fase, mientras que M_{IL} se obtiene por diferencia entre la masa total del sistema (6,4 g) y M_S . A su vez, la densidad de la fase rica en sal se mide pesando la masa de 1 mL de la misma. Por todo ello, en los cálculos se asume lo siguiente:

- La cantidad de proteína presente en el sistema puede considerarse despreciable con respecto a su masa total (la fracción másica máxima a la que se trabaja es de $1,6 \cdot 10^{-4}$), por lo que la composición del sistema puede describirse a través de sus 3 componentes principales: líquido iónico, sal y agua.
- La masa del precipitado acumulado en la interfase líquido-líquido puede considerarse despreciable, por lo que la masa total del sistema se asume que es igual a la suma de la masa de las dos fases líquidas.

Los resultados que se muestran son la media de las diferentes réplicas de cada experimento, acompañados por su cuasi-desviación típica. Debe señalarse que los valores de $\%X_i$ se obtienen por diferencia de $\%X_S$ y $\%X_{IL}$, puesto que el considerablemente mayor número de etapas que se precisan para medir experimentalmente $\%X_i$ conduce a mayores errores experimentales de esta variable. En este sentido, debe resaltarse que en estudios previos es frecuente determinar el contenido en un soluto de una fase mediante balance de materia (Kiss et al., 1998; Dreyer y Kragl, 2008; Tan et al., 2012b). No obstante, la cantidad de proteína en la interfase se midió, de acuerdo a lo comentado anteriormente, para comprobar que el balance de materia a la proteína se cumplía. Y en efecto, se consigue cerrar dicho balance dado que la diferencia entre la cantidad inicial de proteína añadida al sistema y la suma de la cantidad de proteína medida en cada fase es del 10%.

De este modo, en primer lugar se estudia la distribución de la LF entre las fases para el sistema $BmimBF_4/NaH_2PO_4$ por ser con el que se desarrolla por primera vez la técnica ILTPP, analizando la influencia de la composición del sistema (concentración de líquido iónico y sal), el efecto de un electrolito adicional (NaCl) y la temperatura. Posteriormente, se lleva a cabo la selección del sistema líquido iónico/sal que mejores resultados ofrezca para desarrollar la técnica ILTPP y, con el sistema elegido, se estudia la influencia del pH y de la concentración de proteína. Si bien la proteína en la que se centra este estudio es la LF, por ser la proteína de interés en esta tesis doctoral, con el objeto de poder proporcionar la selectividad de la técnica ILTPP hacia esta proteína, también se analiza el reparto de la BSA entre las distintas fases.

a. Estudios preliminares con el sistema $BmimBF_4/NaH_2PO_4$

Este análisis se centra en identificar la influencia de la composición del sistema (esto es, la fracción másica de líquido iónico, $BmimBF_4$, y de sal, NaH_2PO_4), de un electrolito adicional como el NaCl y de la temperatura, sobre la recuperación de LF. El objetivo es maximizar esta recuperación de LF empleando para ello la menor cantidad de reactivos y, en especial, de líquido iónico. En este apartado, todos los experimentos se llevan a cabo a la misma concentración de proteína ($1,6 \cdot 10^{-4}$ m/m).

Para analizar la influencia de la composición del sistema, se recurre al diseño factorial de experimentos, muy utilizado en procesos complejos, difíciles de modelar, para describir su comportamiento y encontrar relaciones cuantitativas entre las variables dependientes e independientes (Kumar et al., 2011; Mota et al., 2012). En este caso, el diseño factorial de experimentos permite conocer la influencia de la concentración teniendo en cuenta la posible interacción mutua de las variables analizadas, denominadas factores: la fracción másica global (en el punto de mezcla) de $BmimBF_4$, $[IL]_M$, y la fracción másica global de NaH_2PO_4 , $[S]_M$, ambas expresadas como porcentaje. En la nomenclatura de los diseños factoriales, estos factores vendrán denotados por x_1 y x_2 , respectivamente. Los rangos en los que se estudia la influencia de x_1 y x_2 son 13,5-26,5 % y 13,5-30,5 %, por definir la región de composiciones en la que dos fases líquidas inmiscibles coexisten y la fracción de líquido iónico es relativamente baja (Li et al., 2010a), de manera análoga a trabajos previos con ILATPS basados en este sistema (Jiang et al., 2007a, 2007b; Tan et al., 2012b).

La tabla 2.2.2 muestra las características de los experimentos incluidos en el diseño de experimentos y sus principales resultados: el porcentaje de LF que se distribuye en cada fase con respecto de la cantidad inicial de proteína añadida al sistema ($\%LF_S$ en la fase rica en sal, $\%LF_L$ en la fase rica en líquido iónico y $\%LF_I$ en la interfase), y el ratio másico de las fases líquidas, RF . De acuerdo a la misma, la mayoría de la LF se acumula en la interfase líquido-

líquido formando la pequeña capa blanquecina, puesto que $\%LF_I$ varía entre 74 % y 99 %. Estos valores son similares a los reportados para otras proteínas recuperadas mediante TPP (Dennison y Lovrien, 1997; Kiss et al, 1998). Dado que la cantidad de LF presente en la fase rica en líquido iónico puede considerarse despreciable en todos los experimentos, basta con proporcionar $\%LF_I$ para conocer cómo se reparte esta proteína entre las fases, ya que puede considerarse que el resto permanece en la fase rica en sal. Por lo tanto, las variables respuesta son $\%LF_I$ y RF . El objetivo es maximizar $\%LF_I$ para recuperar la máxima cantidad de LF en la interfase, mientras que RF permite caracterizar a las fases líquidas del sistema y es muy dependiente de su composición global y de su posición relativa respecto de la curva binodal, variando desde 2,2 hasta 12.

Tabla 2.2.2. Características y resultados de los experimentos incluidos en el diseño factorial: fracción másica global de $BmimBF_4$ (x_1) y de NaH_2PO_4 (x_2) en el sistema; reparto de la cantidad de LF entre cada fase ($\%LF_S$ en la fase rica en sal, $\%LF_{IL}$ en la fase rica en líquido iónico y $\%LF_I$ en la interfase), y el ratio másico de las fases líquidas, RF .

Exp. (x_1^* , x_2^*)	x_1 (%)	x_2 (%)	Reparto de LF entre las 3 fases			RF (-)
			$\%LF_S$	$\%LF_I$	$\%LF_{IL}$	
(-1, -1)	13,5	13,5	25,8±2,5	74,2±2,5	0,0±0,0	12,0±0,9
(1, -1)	26,5	13,5	16,7±2,8	83,2±2,8	0,1±0,2	2,8±0,3
(-1, 1)	13,5	30,5	10,7±4,9	89,3±4,9	0,0±0,0	5,5±0,2
(1, 1)	26,5	30,5	0,8±1,4	99,2±1,4	0,0±0,0	2,2±0,3
(0, 0) _I	20,0	22,0	19,8±2,8	80,2±2,8	0,0±0,0	3,8±0,6
(0, 0) _{II}	20,0	22,0	19,2±1,2	80,8±1,2	0,0±0,0	3,8±0,1
(0, 0) _{III}	20,0	22,0	19,1±4,2	80,8±4,4	0,2±0,3	3,9±0,4
(-1, 0)	13,5	22,0	21,6±0,6	78,4±0,6	0,0±0,0	6,6±0,3
(0, -1)	20,0	13,5	23,9±1,5	76,1±1,5	0,0±0,0	5,9±0,6
(1, 0)	26,5	22,0	12,8±1,5	87,2±1,5	0,0±0,0	2,3±0,1
(0, 1)	20,0	30,5	6,1±0,5	93,9±0,5	0,0±0,0	3,1±0,2

El análisis estadístico del diseño de experimentos 2^2 se recoge en la tabla 2.2.3. Este diseño 2^2 comprende los 4 primeros experimentos de la tabla 2.2.2 y en él se consideran 2 niveles de los factores (-1 y 1) a los que se normalizan estas variables, x_1 y x_2 . Por su parte, las variables respuesta, $\%LF_I$ y RF , se expresan en valores sin normalizar para que los resultados puedan interpretarse fácilmente. Para realizar los análisis estadísticos se emplea MATLAB® 7.11 (MathWorks, Inc.) y Minitab® 15.1 (Minitab Inc.), obteniendo los efectos principales y el modelo de regresión para cada respuesta. El efecto principal de un factor es la medida del cambio en la respuesta ($\%LF_I$ o RF) producido por un cambio en el nivel del factor (x_1 o x_2) (Montgomery, 1997). El modelo de regresión permite determinar la composición del sistema que conduce a los valores deseados de $\%LF_I$ y de RF , destacándose que para un diseño 2^2 es una ecuación en la que la respuesta es una función lineal de sus factores.

Tabla 2.2.3. Efectos principales y modelo de regresión lineal obtenidos en el diseño factorial de experimentos 2^2 (nivel de confianza al 95 %; significativo si $P < 0,05$). Notación: x_1^* , fracción másica de BmimBF₄ normalizada; x_2^* , fracción másica de NaH₂PO₄ normalizada; β_0 , β_1 y β_2 , coeficientes del modelo de regresión.

Respuesta	x_1^*			x_2^*			Modelo de regresión: $respuesta = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1^* + \beta_2 \cdot x_2^*$			
	Efecto principal	Error estándar	Valor P	Efecto principal	Error estándar	Valor P	β_0	β_1	β_2	R^2
%LF ₁	9,45	0,22	0,029	15,56	0,22	0,018	86,50±2,75	4,73±2,76	7,78±2,76	0,999
RF	-6,22	1,47	0,281	-3,51	1,47	0,444	5,64±18,69	-3,11±12,47	-1,76±18,70	0,855

Los resultados ponen de manifiesto que ambos factores (x_1 y x_2) tienen un efecto significativo sobre %LF₁, puesto que en ambos casos el P valor es menor de 0,05 para un nivel de confianza al 95 %. Además, estos efectos son positivos, ya que cuanto mayor es el factor, mayor es %LF₁. El efecto de x_2 es un 64 % superior al de x_1 , lo que implica que la influencia de la concentración de NaH₂PO₄ en el sistema sobre la fracción de LF que se recupera en la interfase es mayor que la influencia de la concentración de BmimBF₄, aún cuando se tiene en cuenta la diferencia del rango en que se estudia cada factor. Esta mayor influencia se manifiesta también en que el coeficiente que multiplica a x_2 , β_2 , es mayor que β_1 (7,8 y 4,7, respectivamente). Los puntos de los 4 experimentos que conforman el diseño factorial 2^2 , (± 1 , ± 1), se ajustan al modelo de regresión lineal para %LF₁ con un error prácticamente despreciable ($R^2=0,999$).

El efecto de los factores sobre la otra respuesta, RF, es completamente distinto. Por un lado, tanto x_1 como x_2 tienen un efecto negativo sobre RF, por otro lado, en este caso es la concentración de líquido iónico la que tiene mayor influencia puesto que el efecto de x_1 es mayor (en valor absoluto). Por consiguiente, la tendencia con los factores de %LF₁ y de RF es opuesta. No obstante, debe destacarse que ninguno de los efectos principales de RF es significativo y que el valor de R^2 del ajuste de la regresión lineal es relativamente bajo (0,855), por lo que esta regresión lineal no puede ajustar adecuadamente los datos experimentales de RF de este análisis. Este pobre ajuste del modelo de regresión lineal para RF es coherente con el hecho de que esta variable sea función de la posición del punto de mezcla (composición global del sistema) con respecto de la curva binodal del sistema de acuerdo a las curvas de reparto, dada la clara no linealidad tanto de la curva binodal como de la longitud de las rectas de reparto del sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄/agua (Li et al., 2010a).

Con el objeto de evaluar la forma de la respuesta en la zona central de la región de composiciones analizada, se añade el punto central (0, 0) al estudio calculándose de nuevo los efectos principales y la curvatura de la respuesta en este punto central (tabla 2.2.4). La curvatura se define como la diferencia en la respuesta entre el valor experimental medio en el punto central y el valor predicho por el modelo de regresión, es decir, el coeficiente β_0 . La tabla

2.2.4 muestra que la curvatura de % LF_1 es significativa, lo que resulta esperable si se considera que puede producirse un efecto techo para esta respuesta, por presentar valores muy próximos a su límite superior (100 %). No obstante, la desviación que introduce la curvatura respecto de la regresión es relativamente pequeña comparada con el valor de la variable en ese punto (desviación del 7 %), por lo que el modelo de regresión lineal permite describir esta respuesta con la precisión suficiente. En relación a RF , aunque la curvatura es estadísticamente no significativa, como antes se ha comentado, el modelo de regresión lineal no puede ajustar satisfactoriamente los datos experimentales. Por lo tanto, debe hacerse un diseño factorial 3^2 para obtener una expresión estadísticamente significativa para esta variable, RF .

Tabla 2.2.4. Efectos principales y curvatura obtenidos en el diseño factorial de experimentos 2^2 + punto central (0,0) (nivel de confianza al 95 %; significativo si $P < 0,05$). Notación: x_1^* , fracción másica de $BmimBF_4$ normalizada; x_2^* , fracción másica de NaH_2PO_4 normalizada.

Respuesta	x_1^*			x_2^*			Curvatura	
	Efecto principal	Error estándar	Valor P	Efecto principal	Error estándar	Valor P	Punto central	Valor P
% LF_1	9,45	0,18	0,000	15,56	0,18	0,000	-5,88	0,000
RF	-6,22	0,85	0,035	-3,51	0,85	0,131	-1,81	0,257

El diseño factorial 3^2 conduce a un modelo de regresión de segundo orden, puesto que incluye el coeficiente de interacción mutua (β_3) y los cuadráticos (β_4 y β_5). Del análisis estadístico se obtienen dos modelos de regresión: el primer modelo contiene todos los coeficientes (β_0 - β_5), mientras que el segundo únicamente contiene los coeficientes estadísticamente significativos (ver tabla 2.2.5). Puede apreciarse cómo la inclusión de los términos de segundo orden mejora notablemente la calidad del ajuste de los datos de RF : el coeficiente R^2 se incrementa desde 0,855 a 0,979. Además, mientras que el modelo lineal no posee ningún coeficiente estadísticamente significativo, el modelo de segundo orden tiene únicamente un coeficiente que no es estadísticamente significativo (β_4). Por ello, se puede prescindir de este coeficiente sin que se produzca una disminución muy acusada de R^2 . En resumen, a pesar de la clara no linealidad de RF , este modelo permite evaluar y obtener una relación cuantitativa útil entre RF y la composición del sistema, en el rango de variables estudiado.

Tabla 2.2.5. Modelos de regresión para RF que se obtienen del diseño factorial de experimentos 3^2 (nivel de confianza al 95 %) y su comparativa con el modelo de regresión lineal. Notación: x_1^* , fracción másica de $BmimBF_4$ normalizada; x_2^* , fracción másica de NaH_2PO_4 normalizada; $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ y β_5 , coeficientes del modelo de regresión.

<i>Modelo de regresión: respuesta = $\beta_0 + \beta_1 \cdot x_1^* + \beta_2 \cdot x_2^* + \beta_3 \cdot x_1^* \cdot x_2^* + \beta_4 \cdot x_1^{*2} + \beta_5 \cdot x_2^{*2}$</i>							
<i>Términos</i>	β_0	β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	R^2
Lineales	5,64±18,69	-3,11±12,47	-1,76±18,70	-	-	-	0,855
Todos	3,72±0,75	-2,78±0,60	-1,64±0,60	1,47±0,74	0,87±0,92	0,97±0,92	0,979
Significativos	4,07±0,84	-2,78±0,77	-1,64±0,77	1,47±0,94	-	1,20±1,14	0,955

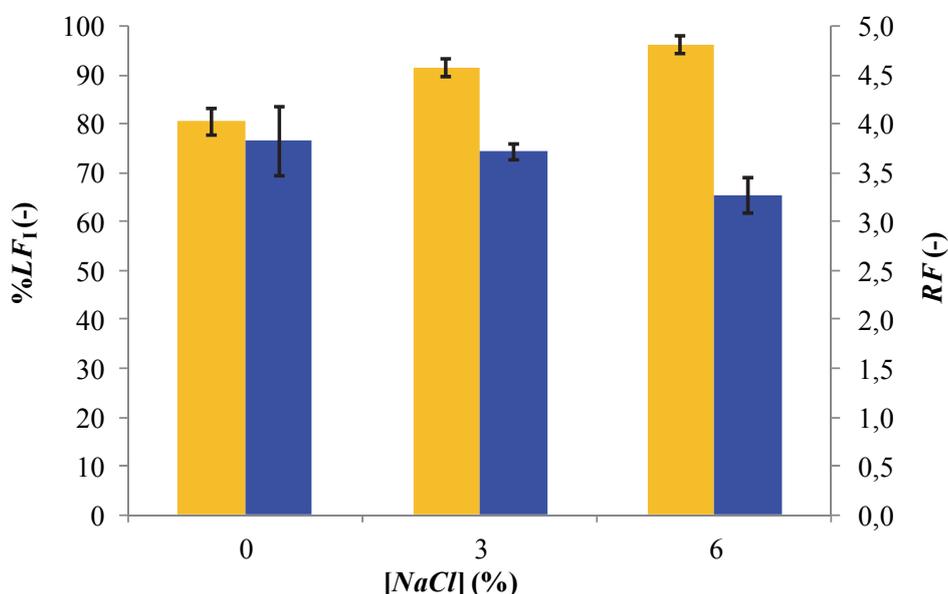


Figura 2.2.3. Influencia de la fracción másica de NaCl, $[NaCl]$ (%), en la fracción de lactoferrina que se acumula en la interfase, $\%LF_1$, y en el ratio másico de las fases líquidas, RF , para las condiciones experimentales del punto central (0, 0). Notación: $\%LF_1$ (barras amarillas), RF (barras azules).

En relación a la influencia de una segunda sal como NaCl, se estudia para un rango de fracciones másicas para este componente del 0 al 6 %, tal y como se representa en la figura 2.2.3. Este estudio se lleva a cabo en las mismas condiciones que las del punto central (0, 0). La fracción de LF que se acumula en la interfase crece del 81 al 96 % con el NaCl en el intervalo estudiado. Si se compara esta influencia con la producida por NaH_2PO_4 , la dependencia de $\%LF_1$ respecto de NaCl es mayor: mientras que el incremento de la fracción másica de NaH_2PO_4 en 8,5 puntos porcentuales –cuando se pasa del punto (0, 0) al (0, 1)– conduce a un aumento de 13 puntos porcentuales en $\%LF_1$, esta última variable se incrementa 15 puntos debido a la presencia de un 6 % de NaCl. Este efecto también ha sido descrito en

estudios previos para otras proteínas (Tan et al., 2012a) y permite alcanzar mayores tasas de recuperación de proteína en la interfase con un menor contenido en sal y, especialmente, sin necesidad de incrementar la cantidad de líquido iónico que se precisa. Sin embargo, el efecto de NaCl sobre el ratio másico de fases líquidas, RF , es análogo al observado para NaH_2PO_4 : un mayor contenido en sal disminuye el ratio de fases.

Respecto del efecto que tiene la temperatura sobre la recuperación de la LF en la interfase, se estudió el rango 25-40 °C empleando las mismas condiciones experimentales del punto central (0, 0). La figura 2.2.4 muestra cómo $\%LF_1$ aumenta en el rango de 25-35 °C desde el 81 hasta el 89 %. En cambio, para $T=40$ °C, $\%LF_1$ cambia su tendencia y disminuye hasta el 76 %, lo que implica que el porcentaje de LF que permanece en la fase rica en sal se incrementa de 10 a 24 %.

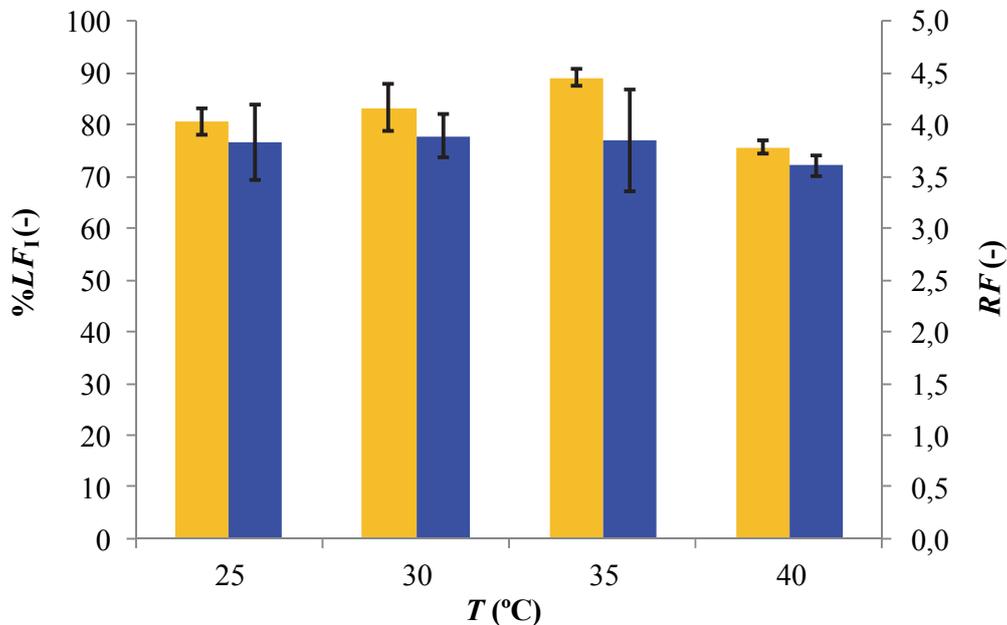


Figura 2.2.4. Influencia de la temperatura, T (°C), en la fracción de lactoferrina que se acumula en la interfase, $\%LF_1$, y en el ratio másico de las fases líquidas, RF , para las condiciones experimentales del punto central (0, 0). Notación: $\%LF_1$ (barras amarillas), RF (barras azules).

Los resultados obtenidos para $\%LF_1$ al variar la temperatura pueden compararse con la eficiencia de extracción obtenida en otros estudios basados en el enfoque convencional de ILATPS, esto es, con la fracción de soluto que se retira de la fase de alimentación (independientemente de si el soluto se acumula en la interfase o es extraído por la fase rica en líquido iónico), ya que el comportamiento con un máximo a temperaturas moderadas también es descrito en otros trabajos que emplean el mismo sistema $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Tan et al., 2012a) u otros ILATPS (Du et al., 2007). Esta tendencia puede atribuirse a los cambios de

conformación que la proteína experimenta con la temperatura y que pueden conducir a su desnaturalización. De este modo, Sreedhara et al. (2010b) han reportado que la temperatura de desnaturalización de la LF para condiciones moderadamente ácidas es de 40 °C, que es justo el valor para el cual % LF_1 muestra una notable disminución.

El área de la región bifásica en el diagrama de fases disminuye con la temperatura debido a que la solubilidad mutua de los componentes aumenta (Li et al., 2010a). Sin embargo, la influencia que tiene la temperatura sobre RF puede considerarse despreciable, tal y como puede apreciarse en la figura 2.2.4. Por consiguiente, a diferencia de lo que se obtiene con la dependencia de la composición del sistema, la temperatura puede incrementar % LF_1 en el rango 25-35 °C sin una disminución significativa de RF , de hecho, el efecto de T sobre RF es un orden de magnitud inferior a la influencia que sobre esta variable ejerce la composición del sistema.

b. Selección del sistema líquido iónico/sal

En el apartado anterior, se obtuvieron resultados experimentales muy prometedores en términos de recuperación de lactoferrina (LF) en la interfase empleando el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄. Sin embargo, debe considerarse el riesgo de hidrólisis que este líquido iónico, BmimBF₄, puede sufrir cuando está en contacto con agua. Así, Freire et al. (2010) describieron su hidrólisis bajo todas las condiciones experimentales que estudiaron, que incluían un amplio rango de pH. Por lo tanto, debe identificarse otro sistema líquido iónico/sal para llevar a cabo la recuperación de proteínas mediante ILTPP que proporcione resultados experimentales similares a los descritos en el apartado anterior, pero sin el mencionado riesgo de hidrólisis.

Los resultados en términos de acumulación de LF en la interfase obtenidos con el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄ conducen a una tasa de recuperación de esta proteína del 80 % cuando la composición global del sistema es de 20 % y 22 % (en masa) de líquido iónico y sal, respectivamente. Previamente a la selección de sistemas líquido iónico/sal alternativos, se evaluaron los resultados obtenidos con el sistema t-butanol/(NH₄)₂SO₄ de la técnica TPP convencional, para tener una referencia con la que poder comparar. En este sistema convencional se consigue una acumulación de LF en la interfase del 85 % cuando su composición es análoga a la empleada con el líquido iónico: 20 % de t-butanol y 22 % de (NH₄)₂SO₄. En consecuencia, los resultados obtenidos con BmimBF₄/NaH₂PO₄ son competitivos cuando se comparan con los que proporciona la técnica TPP convencional. De este modo, el sistema líquido iónico/sal que reemplace al BmimBF₄/ NaH₂PO₄ debe combinar la estabilidad del líquido iónico cuando está en contacto con agua y al menos la misma eficiencia que la anteriormente descrita para recuperar la proteína en la interfase.

Para este objetivo, se evalúan otros líquidos iónicos: Bmimdca, BmimTfO y BmimOAc, tal y como se resume en la tabla 2.2.6. En la literatura pueden encontrarse diversos trabajos que describen el empleo de sistemas acuosos bifásicos basados en los líquidos iónicos anteriores para extraer otras proteínas (Pei et al., 2010) y otros compuestos orgánicos, tales como aminoácidos (Li et al., 2010b) o alcoholes (Müller y Górak, 2012). Por consiguiente, se analiza la distribución de la LF en los sistemas ILTPP formados por los anteriores líquidos iónicos y NaH₂PO₄, con fracciones másicas iguales a 0,20 y 0,22, respectivamente.

Tabla 2.2.6. Principales características de los experimentos llevados a cabo con sistemas líquido iónico/sal para la recuperación de proteínas mediante ILTPP. Notación: $[IL]_M$, fracción másica de líquido iónico (IL), expresada en porcentaje; $[S]_M$, fracción másica de sal (S), expresada en porcentaje. Las celdas en verde indican que ese sistema IL/sal presenta la característica correspondiente; en caso contrario la celda posee color rojo.

Sistemas IL/sal	Composición del sistema		Principales características				
	$[IL]_M$ (% m/m)	$[S]_M$ (% m/m)	Disolución completa de la sal	Dos fases líquidas	Capa de proteína en la interfase L-L	Capa de proteína densa/consistente	Estabilidad de IL
BmimBF ₄ /NaH ₂ PO ₄	20,0	22,0	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo
Bmimdca/NaH ₂ PO ₄	20,0	22,0	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde
BmimTfO/NaH ₂ PO ₄	20,0	22,0	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde
	23,3	26,3	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
	26,5	30,5	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde
BmimOAc/NaH ₂ PO ₄	20,0	22,0	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	26,5	30,5	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Verde
BmimBF ₄ /(NH ₄) ₂ SO ₄	20,0	22,0	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Rojo
BmimTfO/(NH ₄) ₂ SO ₄	23,3	26,3	Verde	Verde	Verde	Rojo	Verde

El sistema basado en Bmimdca permite que la LF sea extraída de forma prácticamente cuantitativa en la fase rica en líquido iónico, dado que más del 97 % de esta proteína se encontraba en esta fase, no detectándose acumulación de proteína en la interfase. Si bien este resultado podría interpretarse como altamente satisfactorio desde un punto de vista de ILATPS, ello implicaría que se precisaría de una etapa adicional de reextracción para recuperar la LF de la fase rica en líquido iónico. Debe recordarse que la principal limitación técnica para recuperar LF con líquidos iónicos se halla precisamente en conseguir su reextracción (Alvarez-Guerra e Irabien, 2012). Por esta razón, ILTPP promueve la acumulación del compuesto de interés en la interfase líquido-líquido, evitando así el problema de la reextracción para su recuperación. Por lo tanto, Bmimdca no proporciona resultados de interés para la técnica ILTPP.

En relación al BmimTfO, se obtiene una capa de LF en la interfase que no es densa o consistente, si bien los resultados cualitativos podrían ser de interés para ILTPP. Por el contrario, el BmimOAc no consigue siquiera la formación del sistema bifásico para la concentración mencionada ($[L]_M=20\%$, $[S]_M=22\%$). Por lo tanto, se realizan otros experimentos basados en BmimTfO y BmimOAc a mayores concentraciones de líquido iónico y sal, ya que ello permitiría obtener precipitados más consistentes en la interfase y promover la formación de dos fases acuosas inmiscibles. Como se muestra en la tabla 2.2.6, la nueva composición del sistema es del 26,5 y 30,5 % de líquido iónico y sal, respectivamente, por ser esta la máxima concentración con la que se trabajó con el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄ (Alvarez-Guerra e Irabien, 2014a). Bajo estas condiciones experimentales, se obtienen muy diferentes comportamientos para los dos líquidos iónicos mencionados. Por un lado, el BmimTfO produce una capa de LF consistente que concentra la mayor parte de la proteína contenida en el sistema, pero una pequeña cantidad de sal no pudo disolverse tras la etapa de mezclado en el agitador rotatorio. Por otro lado, el sistema basado en BmimOAc consigue extraer más del 97 % de LF en la fase rica en líquido iónico sin que se forme precipitado en la interfase (de manera similar al resultado obtenido con Bmimdca) y además una cantidad significativa de sal quedó sin disolver tanto en los tubos de muestra como en los blancos. Estos resultados ponen de manifiesto que el BmimOAc no es útil si lo que se persigue es la acumulación de la proteína en la interfase líquido-líquido, mientras que los resultados de BmimTfO son muy prometedores si se consiguiera una completa disolución de la sal.

En consecuencia, el comportamiento del sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ se analiza para una composición intermedia de las dos previas: $[L]_M=23,3\%$, $[S]_M=26,3\%$. Con esta composición, se consigue la total disolución de la sal y que un 98 % de la LF pudiese recuperarse en la interfase. Además, dada la importancia de estos resultados, este experimento se realizó por triplicado (y, como todos los experimentos, a su vez cada uno de ellos consta de 3 réplicas), y en todos los casos se obtuvieron resultados muy similares, como lo demuestran los bajos valores de cuasi-desviación típica que se obtienen en estas condiciones (pH=4,0). Para esta composición, el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄ proporciona una tasa de acumulación de LF en la interfase del 89 %, que es significativamente menor que la fracción recuperada con BmimTfO.

Finalmente, se estudia la posibilidad de reemplazar la sal empleada en las pruebas anteriores, NaH₂PO₄, por (NH₄)₂SO₄, que es la utilizada en la técnica TPP convencional. Sin embargo, esta modificación en combinación tanto con BmimBF₄ como con BmimTfO no proporciona precipitados de LF consistentes, porque o bien no llegan a formarse o bien quedan mezclados con la fase rica en líquido iónico.

En conclusión, se selecciona el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ para realizar la técnica ILTPP, ya que ofrece resultados competitivos con los obtenidos con BmimBF₄/NaH₂PO₄ pero sin el riesgo de hidrólisis asociado a este último sistema cuando está en contacto con agua. Además,

debe tenerse presente que la toxicidad del BmimTfO es menor a la del BmimBF₄ y a la de diversos disolventes convencionales empleados como referencia (Alvarez-Guerra e Irabien, 2011). De este modo, todos los estudios posteriores en relación a ILTPP se llevarán a cabo con este sistema, si bien no se analiza la influencia de la composición del sistema tal y como se hizo con el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄ puesto que únicamente un muy estrecho rango de composiciones conduce a resultados de interés para el ILTPP, como se ha comentado anteriormente.

c. Influencia del pH

El control del pH de las fases acuosas es crucial para la separación/extracción de biomoléculas como las proteínas, cuya estructura depende de forma muy acusada de esta variable por la influencia que el pH tiene sobre la carga de las proteínas (Pei et al., 2009; Ventura et al., 2012). Por ello, esta variable suele evaluarse cuando se estudia la recuperación de proteínas mediante ILATPS (Dreyer et al., 2009; Pei et al., 2012; Tan et al., 2012a) o TPP convencional (Dennison y Lovrien, 1997; Çalci et al., 2009). En el presente estudio, se analiza el reparto de la LF en el sistema empleando disoluciones acuosas a 3 pH diferentes: 3,1; 4,0; y 5,5. El caso de pH=4,0 se corresponde con el pH de la disolución acuosa de NaH₂PO₄ concentrada que se mezcla con BmimTfO para dar el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ descrito en el punto anterior ([IL]_M=23,3 %, [S]_M=26,3 %). Para el experimento a pH=3,1, se adiciona H₃PO₄ a la disolución salina concentrada hasta que se alcanza dicho pH, mientras que el pH=5,5 se consigue mediante la adición de NaOH. La concentración de sal en estos dos últimos casos es aquella que proporciona la misma fuerza iónica debida a la sal que para pH=4,0 (2,8 M), con el fin de eliminar la posible influencia de esta variable. Además, la fracción másica de líquido iónico varía entre los 3 casos para que el ratio líquido iónico/agua sea el mismo en todos ellos.

Tabla 2.2.7. Influencia del pH sobre el reparto de la proteína entre las 3 fases que se forman en los sistemas ILTPP basados en BmimTfO ([IL]_M) y dihidrogenofosfato ([S]_M): %X_S, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en sal; %X_{IL}, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en líquido iónico; %X_I, porcentaje de proteína X presente en la interfase. Condiciones experimentales: [X]_M=0,016 (% m/m); T=25 °C.

Proteína X	pH	[IL] _M (% m/m)	[S] _M (% m/m)	Reparto de la proteína X entre las 3 fases		
				%X _S	%X _I	%X _{IL}
LF	3,1	22,7	27,9	0,5 ± 0,8	98,1 ± 1,1	1,4 ± 0,8
	4,0	23,3	26,3	1,0 ± 1,1	98,3 ± 1,7	0,7 ± 0,7
	5,5	24,6	22,0	16,7 ± 2,3	82,9 ± 2,5	0,4 ± 0,8
BSA	3,1	22,7	27,9	1,7 ± 1,1	32,3 ± 4,5	66,0 ± 4,4
	4,0	23,3	26,3	0,7 ± 1,2	56,6 ± 7,0	42,7 ± 6,1
	5,5	24,6	22,0	45,0 ± 4,4	54,8 ± 4,4	0,2 ± 0,4

La tabla 2.2.7 muestra la composición global del sistema en los experimentos llevados a cabo a distintos valores de pH así como el reparto de LF o BSA entre las diferentes fases del

sistema: la fase rica en sal ($\%LF_S$ o $\%BSA_S$), la fase rica en líquido iónico ($\%LF_{LI}$ o $\%BSA_{LI}$) y la interfase ($\%LF_I$ o $\%BSA_I$). Todos los experimentos se han realizado a la misma concentración de la proteína (ya sea LF o BSA): $1,6 \cdot 10^{-4}$ (m/m).

Como puede apreciarse, la mayoría de la LF se acumula en la interfase líquido-líquido puesto que más del 80 % del contenido en esta proteína se encuentra formando la capa blanquecina entre las dos fases líquidas. Además, para condiciones ácidas moderadas (pH=3,1 y 4,0), la recuperación de LF es prácticamente cuantitativa (98 %). A un pH más próximo a la neutralidad, $\%LF_I$ disminuye hasta el 83 % dado que el 17 % de la LF permanece en la fase rica en sal, si bien incluso estos resultados siguen siendo competitivos con los conseguidos con el sistema BmimBF₄/NaH₂PO₄. Por su parte, la fracción de LF contenida en la fase rica en líquido iónico puede considerarse despreciable en todos los casos.

El comportamiento de la BSA es muy diferente del observado para la LF. Así, $\%BSA_I$ es entre un 33 % y un 67 % inferior a los respectivos valores de $\%LF_I$ para cada experimento. De este modo, $\%BSA_I$ varía entre el 32 % a pH=3,1 y el 55-57 % a pH=4,0 y 5,5. Por otro lado, el reparto de la fracción de BSA que se encuentra en las fases líquidas cambia completamente entre los experimentos. A pH=5,5, la BSA contenida en la fase rica en líquido iónico es despreciable, es decir, la BSA que no se acumula en la interfase permanece en la fase rica en sal. Por el contrario, a pH=3,1 y 4,0 la BSA se encuentra principalmente en la fase rica en líquido iónico (66 y 43 %, respectivamente), mientras que únicamente una muy pequeña fracción de esta proteína se encontraría en la fase rica en sal.

Los resultados anteriores pueden explicarse teniendo presente la carga de ambas proteínas. La LF se encuentra cargada positivamente a todos los niveles de pH estudiados, ya que todos ellos se encuentran por debajo de su punto isoeléctrico, 8-9 (Rabiller-Baudry et al., 2001). En consecuencia, no se detecta ningún cambio drástico en los resultados experimentales en relación a esta proteína. En cambio, el signo de la carga de la BSA cambia de negativo a positivo cuando el pH disminuye desde 5,5 hasta 4,0 o 3,1, dado que su punto isoeléctrico se encuentra en el rango de 4,7-4,9 (Zydney, 1998). Este hecho explica los cambios tan significativos observados en el reparto de la BSA entre las fases líquidas descrito en el párrafo anterior. Cabe concluir entonces que la carga de las proteínas parece tener un papel muy importante en el reparto de estas biomoléculas entre las fases de ILTPP.

La selectividad ideal del proceso, $S_{LF/BSA}$, se mide comparando la fracción de las dos proteínas (LF y BSA) que se acumula en la interfase:

$$S_{LF/BSA} = \frac{\%LF_I}{\%BSA_I} \quad (2.2.3)$$

Esta variable, $S_{LF/BSA}$, representa el factor de enriquecimiento hacia la LF que proporciona la técnica ILTPP. La figura 2.2.5 expone el valor de $S_{LF/BSA}$ a diferentes pH, así como el ratio

másico de fases líquidas, RF . Los resultados revelan claramente que cuanto menor es el pH, mayor es su selectividad: $S_{LF/BSA}$ a pH=3,1 dobla su valor respecto del que presenta a pH=5,5. Este rango de $S_{LF/BSA}$, 1,5-3,0, es competitivo con las selectividades descritas por otras tecnologías para separar la LF, como las basadas en membranas (Nyström et al., 1998; Ndiaye et al., 2010), pero además la técnica ILTPP permite mejorar significativamente la cantidad de proteína recuperada. Con relación a RF , se detecta una tendencia similar: a menor pH, mayor RF , porque la composición global del sistema cambia para mantener constante la fuerza iónica debida a la sal. No obstante, la influencia del pH sobre RF es notablemente menor que su efecto sobre la selectividad del proceso. En todo caso, tanto desde un punto de vista de la selectividad como de la fracción de LF que se acumula en la interfase, los mejores resultados se obtienen a pH=3,1.

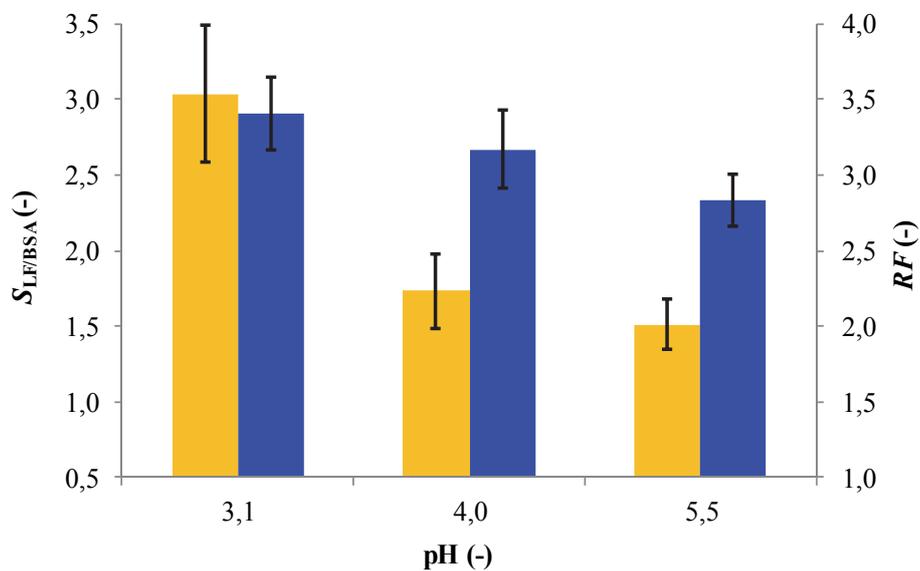


Figura 2.2.5. Influencia del pH en la selectividad LF/BSA de la técnica ILTPP, $S_{LF/BSA}$, y en el ratio másico de fases líquidas, RF , para los experimentos realizados con una concentración de proteína igual a $1,6 \cdot 10^{-4}$ (m/m) a 25 °C. Notación: $S_{LF/BSA}$ (barras amarillas), RF (barras azules).

Sin embargo, cuando se considera el proceso de redisolución de la proteína, en los experimentos a pH=4,0 y, especialmente, a pH=3,1, las proteínas no podían redisolverse completamente porque quedaban partículas suspendidas en el agua fresca empleada en esta etapa. Ello explica por qué el balance de materia a la LF no puede cerrarse (por esta razón, el experimento a pH=3,1 se repitió 6 veces, con las mismas conclusiones en todas las repeticiones). Por el contrario, no se detectaron partículas suspendidas a pH=5,5 por lo que ambas proteínas podrían redisolverse por completo. Ambas, LF y BSA, experimentan cambios estructurales a partir de condiciones moderadamente ácidas (pH=4,0 o menores), lo que puede conllevar la desnaturalización de la proteína (Giancola et al., 1997; Sreedhara et al., 2010a, 2010b). Por esta razón, a pesar de la menor recuperación de LF en la interfase y la menor

selectividad, las condiciones a pH=5,5 también se consideran ventajosas por cuanto posibilitan la redisolución de las proteínas acumuladas en la interfase, lo que constituye una condición necesaria para que no se hayan producido cambios conformacionales en las mismas. En consecuencia, los análisis posteriores se centran en las condiciones a pH=5,5 y, en menor medida, a pH=4,0, descartándose las condiciones a pH=3,1 por las transformaciones severas que se producen en estas biomoléculas y que conducen a que ni siquiera pueda cerrarse el balance de materia a estos compuestos.

d. Influencia de la concentración de proteína

Los experimentos de los apartados anteriores se realizaron todos ellos a una concentración de proteína constante e igual a $1,6 \cdot 10^{-4}$ (m/m). Este valor corresponde a una concentración de proteína en el agua presente en el sistema aproximadamente igual a 320 mg L^{-1} . Aunque la concentración media de la LF en el lactosuero bovino es igual a 100 mg L^{-1} (Zydney, 1998), puede alcanzar concentraciones de hasta 350 mg L^{-1} (Heebøll-Nielsen et al., 2004). De este modo, la influencia de la concentración de la proteína se analiza en el rango de concentraciones ($80\text{-}320 \text{ mg L}^{-1}$) que puede presentar el lactosuero bovino.

El estudio sobre la influencia de la concentración de proteína se lleva a cabo en primer lugar a pH=5,5 porque es la condición que conduce a los mejores resultados experimentales cuando se tiene presente la etapa de redisolución de la proteína. La tabla 2.2.8 expone el reparto de LF y BSA a pH=5,5 basado en el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ para fracciones másicas de proteína en el intervalo $(0,4\text{-}1,6) \cdot 10^{-4}$. Por su parte, en la tabla 2.2.9 se incluye el estudio de la influencia de la concentración de proteína a pH=4,0, puesto que a este pH se obtienen mejores resultados en términos de recuperación de LF (%LF_I) y selectividad ($S_{LF/BSA}$), así como también se puede cerrar el balance de materia para ambas (LF y BSA) a pesar de la incompleta redisolución de la proteína recuperada.

Tabla 2.2.8. Influencia de la fracción másica de la proteína X en su reparto entre las 3 fases que se forman en los sistemas ILTPP basados en BmimTfO ($[IL]_M$) y dihidrogenofosfato ($[S]_M$) a pH=5,5: %X_S, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en sal; %X_{IL}, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en líquido iónico; %X_I, porcentaje de proteína X presente en la interfase. Condiciones experimentales: $[IL]_M=24,6$ (% m/m); $[S]_M=22,0$ (% m/m); T=25 °C.

Proteína X	$10^2 \cdot [X]_M$ (%)	Reparto de la proteína X entre las 3 fases		
		%X _S	%X _I	%X _{IL}
LF	0,4	6,3 ± 4,6	93,5 ± 5,0	0,2 ± 0,3
	0,8	9,3 ± 3,6	90,7 ± 3,6	0,0 ± 0,0
	1,2	12,4 ± 3,0	87,6 ± 3,0	0,0 ± 0,0
	1,6	16,7 ± 2,3	82,9 ± 2,5	0,4 ± 0,8
BSA	0,4	11,7 ± 6,2	88,3 ± 6,2	0,0 ± 0,0
	0,8	16,6 ± 2,1	83,2 ± 2,1	0,2 ± 0,4
	1,2	23,6 ± 0,3	76,4 ± 0,3	0,0 ± 0,0
	1,6	45,0 ± 4,4	54,8 ± 4,4	0,2 ± 0,4

Tabla 2.2.9. Influencia de la fracción másica de la proteína X en su reparto entre las 3 fases que se forman en los sistemas ILTPP basados en BmimTfO ($[IL]_M$) y dihidrogenofosfato ($[S]_M$) a pH=4,0: $\%X_S$, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en sal; $\%X_{IL}$, porcentaje de proteína X presente en la fase rica en líquido iónico; $\%X_I$, porcentaje de proteína X presente en la interfase. Condiciones experimentales: $[IL]_M=23,3$ (% m/m); $[S]_M=26,3$ (% m/m); $T=25$ °C.

Proteína X	$10^2 \cdot [X]_M$ (%)	Reparto de la proteína X entre las 3 fases		
		$\%X_S$	$\%X_I$	$\%X_{IL}$
LF	0,4	0,0 ± 0,0	99,5 ± 0,6	0,5 ± 0,9
	0,8	0,0 ± 0,0	95,9 ± 0,8	4,1 ± 0,8
	1,6	1,0 ± 1,1	98,3 ± 1,7	0,7 ± 0,7
BSA	0,4	0,0 ± 0,0	57,7 ± 6,4	42,3 ± 6,4
	0,8	0,0 ± 0,0	50,2 ± 2,3	49,8 ± 2,3
	1,6	0,7 ± 1,2	56,6 ± 7,0	42,7 ± 6,1

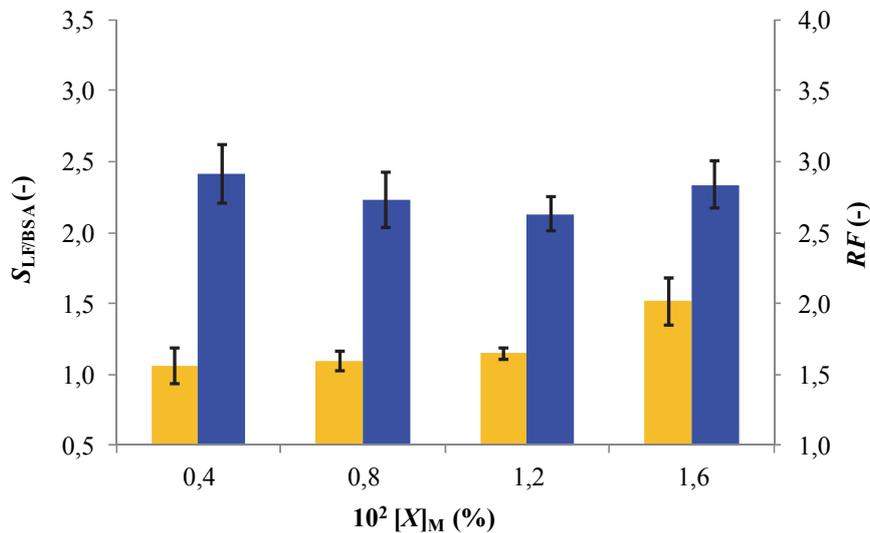


Figura 2.2.6. Influencia de la fracción másica de la proteína X en la selectividad LF/BSA de la técnica ILTPP, $S_{LF/BSA}$ y en el ratio másico de fases líquidas, RF , para los experimentos realizados a pH=5,5 a 25 °C. Notación: $S_{LF/BSA}$ (barras amarillas), RF (barras azules).

Tal y como se desprende de los resultados, a pH=5,5 la recuperación de proteína en la interfase se ve favorecida a bajas concentraciones. Esta tendencia es mucho más pronunciada para la BSA, ya que $\%BSA_I$ se incrementa desde el 55 % hasta el 88 % cuando su concentración disminuye hasta $4 \cdot 10^{-5}$ (m/m). En cambio, el aumento que experimenta la LF en este rango es mucho más limitado, al pasar $\%LF_I$ del 83 al 93 %. Por consiguiente, como puede apreciarse en la figura 2.2.6, donde se representan $S_{LF/BSA}$ y RF para los experimentos realizados a pH=5,5, el efecto anterior conlleva una notable disminución de la selectividad del proceso: $S_{LF/BSA}$ se reduce hasta 1,06 para la menor concentración. En relación a RF , se mantiene aproximadamente constante con la concentración de proteína, dado que la

composición global del sistema es la misma en todos los casos (salvo por el contenido en proteína). Por lo tanto, la influencia de la concentración de proteína puede considerarse despreciable en el comportamiento del sistema ILTPP, puesto que las pequeñas diferencias en los valores de RF pueden atribuirse a la propia variabilidad experimental.

La influencia de la concentración de proteína exhibe diferencias significativas cuando el estudio se lleva a cabo a $pH=4,0$ (tabla 2.2.9). En estas condiciones algo más ácidas, la concentración de la proteína no parece tener una influencia significativa ni en $S_{LF/BSA}$ ni en RF , ya que no se detecta ninguna tendencia, como se refleja en la figura 2.2.7. Así, ambas variables permanecen en los rangos de 1,7-1,9 y de 3,1-3,3, respectivamente.

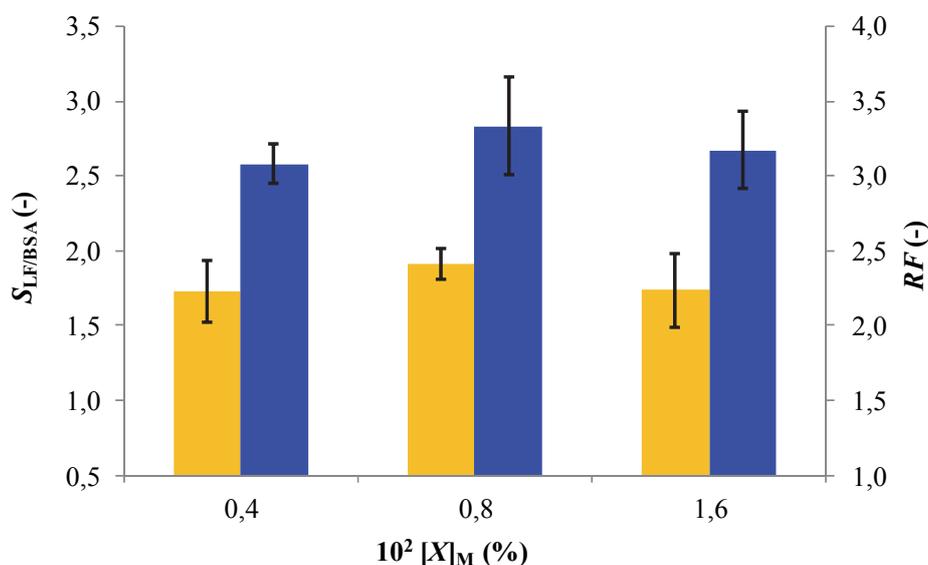


Figura 2.2.7. Influencia de la fracción másica de la proteína X en la selectividad LF/BSA de la técnica ILTPP, $S_{LF/BSA}$, y en el ratio másico de fases líquidas, RF , para los experimentos realizados a $pH=4,0$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Notación: $S_{LF/BSA}$ (barras amarillas), RF (barras azules).

En conclusión, los resultados anteriores revelan que ILTPP es una técnica muy prometedora para recuperar LF y concentrarla respecto de otras proteínas del lactosuero bovino como la BSA, cuya separación es especialmente difícil mediante otras técnicas. Por su parte, en las condiciones experimentales que conducen a una alta recuperación de ambas proteínas en la interfase (p. ej., bajas concentraciones de proteína a $pH=5,5$), la técnica ILTPP también puede verse como una alternativa para superar las limitaciones que presentan otras técnicas de concentración de proteínas para producir concentrados y aislados de proteínas del lactosuero, WPC y WPI (en sus acrónimos en inglés), respectivamente. Por ejemplo, las primeras etapas en la producción de WPC y de WPI están basadas en procesos con membranas, pero la máxima concentración de estos compuestos que puede alcanzarse mediante estas técnicas es del 20% (Marcelo y Rizvi, 2009; Eugster et al., 2012).

2.3. Propiedades y equilibrio termodinámico del sistema BmimTfO/NaH₂PO₄/H₂O para la separación/concentración de lactoferrina

En el apartado anterior se han identificado dos sistemas basados en BmimTfO como líquido iónico y en NaH₂PO₄ como sal que ofrecen resultados prometedores para la recuperación de LF. El primero de ellos, denotado en adelante mediante BmimTfO/NaH₂PO₄, se compone del 23,3% de líquido iónico y 26,3% del sal, siendo el resto agua. El segundo sistema se representa mediante BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) y posee una composición en masa del 24,6% de líquido iónico y 22,0% de sal. En este segundo caso, a pesar de coexistir dos especies de sal (NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄), la composición en sal del sistema se describe como si la sal estuviese constituida por un único componente, ya que el ratio NaH₂PO₄:NaOH con el que se prepara el sistema se mantiene constante e igual a 18 en todos los experimentos. De esta forma, teniendo presente este ratio y conociendo la composición global de sal, siempre es posible conocer la concentración de cada uno de los componentes individuales. En la tabla 2.3.1 se muestran las propiedades más relevantes para el proceso ILTPP de las dos fases líquidas de cada sistema: pH, conductividad (σ), densidad (ρ) y viscosidad dinámica (μ). Las medidas del pH y de la conductividad se determinaron a 298,0±0,1 K con un pH-metro/conductímetro Mettler Toledo S47 SevenMulti™ dual meter. Para el calibrado del pH-metro se emplearon soluciones tampón de pH igual a 4,00 y 7,00, mientras que el conductímetro se calibró con disoluciones patrón de KCl. Dado que la conductividad de las muestras excedía la de estos patrones de KCl, todas las muestras fueron diluidas 500 veces. En relación con la densidad y viscosidad, se obtuvieron a 298,00±0,02 K mediante un viscosímetro/densímetro automático SVM 3000 Anton Paar rotational Stabinger.

Tabla 2.3.1. Propiedades a 298,0 K y 0,10 MPa de las fases rica en sal y en líquido iónico de los sistemas de interés para llevar a cabo la ILTPP: BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄).

Propiedad	<i>BmimTfO/NaH₂PO₄</i> ($[IL]_M, [S]_M$)=(23,3, 26,3)		<i>BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄)</i> ($[IL]_M, [S]_M$)=(24,6, 22,0)	
	Fase rica en IL	Fase rica en sal	Fase rica en IL	Fase rica en sal
pH ^a	4,051	4,106	5,227	4,961
σ (S·m ⁻¹) ^b	22,048	25,023	21,318	25,574
ρ (kg·m ⁻³) ^c	1241,9	1307,3	1231,5	1275,3
μ (Pa·s) ^d	9,4693·10 ⁻³	6,2730·10 ⁻³	8,4159·10 ⁻³	5,0677·10 ⁻³

^a Incertidumbres estándar, u , en la determinación del pH: $u(\text{pH})=0,001$, $u(T)=0,1$ K, $u(p)=0,01$ MPa

^b Incertidumbres estándar, u , en la determinación de σ : $u(\sigma)=0,001$ S·m⁻¹, $u(T)=0,1$ K, $u(p)=0,01$ MPa

^c Incertidumbres estándar, u , en la determinación de ρ : $u(\rho)=0,1$ kg·m⁻³, $u(T)=0,02$ K, $u(p)=0,01$ MPa

^d Incertidumbres estándar, u , en la determinación de μ : $u(\mu)=10^{-7}$ Pa·s, $u(T)=0,02$ K, $u(p)=0,01$ MPa

El pH de ambas fases del sistema BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) es superior al de las fases del sistema BmimTfO/NaH₂PO₄, como cabía esperar puesto que el primero se prepara con una disolución salina concentrada a pH=5,5 y el segundo a pH=4,0. En relación a su conductividad,

es muy similar en ambos casos, puesto que se impuso que tuvieran la misma fuerza iónica para evitar que esta variable tuviese influencia en los resultados experimentales obtenidos. Por su parte, los valores de densidad y viscosidad recogidos en la tabla 2.3.1 se encuentran en el rango de otros ILATPS basados en BmimTfO estudiados previamente (Neves et al., 2012). No obstante, estas viscosidades son considerablemente inferiores a aquellas exhibidas por la fase rica en polímero de ATPS basados en estos componentes (en el entorno de 0,04 Pa s), lo que refuerza lo ventajoso de emplear líquidos iónicos en sistemas acuosos bifásicos (Freire et al., 2012).

La caracterización del equilibrio termodinámico de los sistemas ILTPP implica conocer la composición de las dos fases líquidas que se obtienen en cada sistema. A su vez, estos datos son indispensables para poder evaluar en el apartado siguiente la recuperación y reutilización del líquido iónico empleado en el proceso. Puesto que ILTPP emplea los mismos sistemas líquido iónico/sal que los ILATPS, la caracterización del equilibrio termodinámico desarrollada en este apartado también sería de aplicación para cualquier otro ILATPS.

Para la consecución de este objetivo, deben determinarse sus curvas binodales y las rectas de reparto en la región de composiciones de interés para el proceso de recuperación de proteínas. Las curvas binodales se determinan a 298 ± 1 K y a presión atmosférica mediante el método del "punto de niebla", ampliamente descrito y empleado en la literatura (Wu et al., 2008; Ventura et al., 2011, 2012). La concentración de los puntos experimentales de la curva binodal se determinó por pesada de los componentes del sistema con una balanza analítica Mettler Toledo Excellence XS205 Dual Range, que posee una precisión de $\pm 10^{-4}$ g. Más detalles de este procedimiento experimental pueden encontrarse en el trabajo de Alvarez-Guerra et al. (2014a).

Las rectas de reparto se construyeron mediante el método gravimétrico propuesto previamente por Merchuck et al. (1998). Los detalles experimentales para las medidas de las rectas de reparto se describen en un trabajo previo de Neves et al. (2012), con la salvedad de que en el presente trabajo se recurrió a centrifugación a 3000 rpm durante 5 min para promover la separación de fases antes de que se dejase equilibrar al sistema. Debe especificarse que en todos los casos la fase superior se corresponde con la fase rica en líquido iónico y la inferior con la fase rica en sal. Además, el punto crítico también se determinó en el diagrama ternario con el mismo procedimiento que el descrito por Neves et al. (2012).

El contenido en líquido iónico de los puntos experimentales de la curva binodal de mayor concentración de sal es muy bajo, por lo que incluso pequeños errores absolutos pueden implicar errores relativos muy notables. Por otro lado, debe tenerse presente que esta región del diagrama ternario es esencial para el análisis de la reutilización del líquido iónico. Por esta razón, se llevó a cabo, mediante espectroscopía UV a 211 nm empleando un espectrofotómetro

Shimadzu UV-1700 Pharma-Spec, la determinación de la fracción másica de líquido iónico en la fase rica en sal de las líneas de reparto trazadas. Este método proporciona una mayor precisión que el anterior y, para evitar cualquier interferencia de la sal, se midió también la absorbancia de blancos que contuvieran la misma concentración de sal que las fases ricas en sal objeto de este estudio detallado.

La figura 2.3.1 muestra el diagrama ternario de cada sistema de interés para la ILTPP, en el que se representa tanto la curva binodal como varias rectas de reparto en la región de composición del proceso. La concentración de los componentes se mide en fracción másica expresada como porcentaje. Los puntos de mezcla empleados en la construcción de las rectas de reparto corresponden a las composiciones que se obtienen por la adición de sal (NaH_2PO_4 o Na_2HPO_4) a los sistemas bajo estudio (puntos de mezcla C-F), cuyas rectas de reparto también se determinan (punto de mezcla B). Debe destacarse que la adición de sal para incrementar la fracción másica global de este componente es una de las alternativas que normalmente se utilizan para reducir la cantidad de líquido iónico presente en la fase rica en sal, por lo que puede conducir a una reducción de la fracción de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso (Li et al., 2010a). Además, se determina la recta de reparto para un punto de mezcla de menor concentración de sal para ampliar el rango de composiciones estudiadas y, de este modo, asegurar la validez de las expresiones que se deduzcan de los resultados (punto de mezcla A). Los datos experimentales pormenorizados de la curva binodal y de las rectas de reparto con los que se ha construido la figura 2.3.1 pueden consultarse en los datos suplementarios incluidos en Alvarez-Guerra et al. (2014a).

Por lo tanto, el estudio se centra en el entorno de composiciones de los puntos de operación de interés identificados para el desarrollo de la técnica ILTPP. De acuerdo a lo expuesto en la figura 2.3.1, será para los intervalos de composiciones en cada sistema expuestos en la tabla 2.3.2 para los que se desarrollará el modelo para describir el equilibrio termodinámico.

Tabla 2.3.2. Intervalos de composiciones de líquido iónico (IL) y sal (S) para los que se ha estudiado el equilibrio termodinámico de los sistemas de interés para la técnica ILTPP.

<i>Sistema</i>	<i>Punto/Fase</i>	<i>Intervalo de composiciones</i>	
		<i>[IL] (%)</i>	<i>[S] (%)</i>
BmimTfO/ NaH_2PO_4	<i>Puntos de mezcla</i>	20,5-24,9	20,9-35,0
	<i>Fase rica en IL</i>	84,1-98,8	0,3-0,6
	<i>Fase rica en S</i>	0,7-2,6	29,3-44,1
BmimTfO/ ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)	<i>Puntos de mezcla</i>	21,1-25,4	19,0-32,7
	<i>Fase rica en IL</i>	77,5-96,5	0,3-0,7
	<i>Fase rica en S</i>	0,5-2,5	27,5-41,7

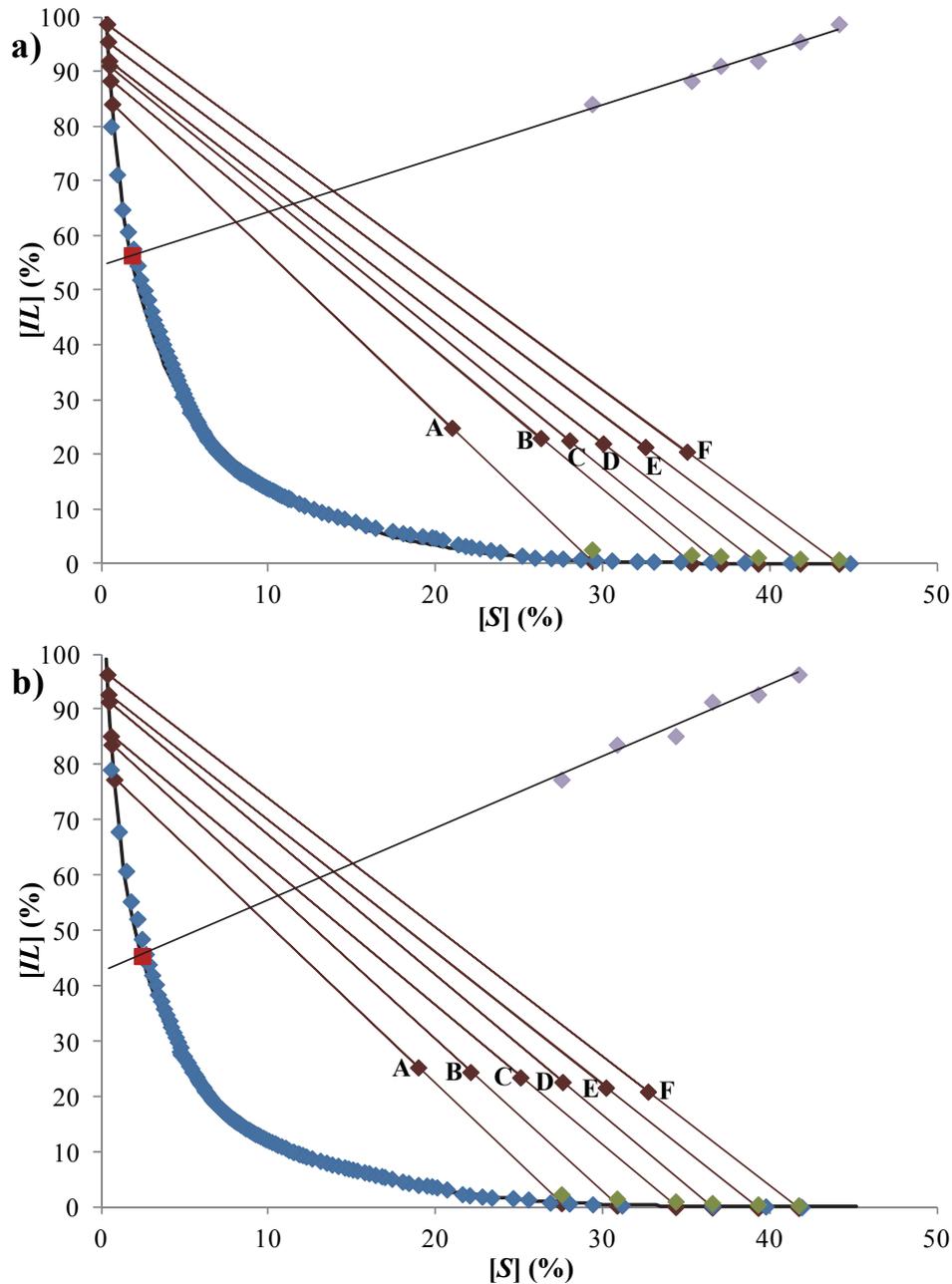


Figura 2.3.1. Diagrama de fases ternario a 298 ± 1 K y a $0,10 \pm 0,01$ MPa para los siguientes sistemas: a) BmimTfO/ NaH_2PO_4 ; b) BmimTfO/ $(\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$. Notación: \blacklozenge Curva binodal experimental; \blacklozenge Recta de reparto; \blacklozenge Puntos experimentales de la curva binodal a altas fracciones máscas de sal medidos por absorbancia UV; \blacksquare Punto crítico; \blacklozenge Puntos $([S]_S, [IL]_{IL})$ empleados para determinar el punto crítico; — Curva binodal ajustada de acuerdo a la ecuación 2.3.1 (los valores de los parámetros de ajuste pueden encontrarse en la tabla 2.3.3); — Recta de ajuste de los puntos $([S]_S, [IL]_{IL})$ de acuerdo a la ecuación 2.3.2 (los valores de los parámetros de ajuste pueden encontrarse en la tabla 2.3.4). Los datos experimentales pormenorizados de la curva binodal y de las rectas de reparto pueden consultarse en los datos suplementarios incluidos en Alvarez-Guerra et al. (2014a)

La forma convencional de modelar el equilibrio de los sistemas líquido iónico/sal se basa en la ecuación que describe la curva binodal (ecuación 2.3.1) y la recta utilizada para

determinar el punto crítico del sistema (ecuación 2.3.2) (Merchuk et al., 1998; Freire et al., 2012; Neves et al., 2012):

$$[IL] = A \cdot \exp(B[S]^{0.5} - C[S]^3), \quad \forall [S] < 27 \% \quad (2.3.1)$$

$$[IL]_{IL} = a_{IL}[S]_S + b_{IL} \quad (2.3.2)$$

donde $[IL]$ y $[S]$ son las fracciones másicas de líquido iónico y sal expresados como porcentajes, respectivamente; los subíndices S e IL hacen referencia a las composiciones en la fase rica en sal y la fase rica en líquido iónico, respectivamente; y A , B , C , a_{IL} y b_{IL} son los parámetros de ajuste.

De este modo, la ecuación 2.3.2 describe el reparto entre las fases líquidas en equilibrio, ya que relaciona las composiciones de las mismas: la concentración de líquido iónico en la fase rica en líquido iónico, $[IL]_{IL}$, con la concentración de sal en la fase rica en sal, $[S]_S$. Debe destacarse que esta ecuación permite trazar nuevas líneas de reparto para un punto de mezcla dado perteneciente a la región en la que se ha centrado el estudio. A su vez, la curva binodal, que delimita la región bifásica de la monofásica en el diagrama de fases, relaciona la composición de líquido iónico y de sal en cada fase. Así, conocidos $[IL]_{IL}$ y $[S]_S$, la curva binodal permite determinar las concentraciones $[S]_{IL}$ y $[IL]_S$. Por lo tanto, de los 4 grados de libertad asociados a las composiciones de líquido iónico y sal que se desean calcular en cada fase, la curva binodal permite eliminar 2 (uno por cada fase) y la ecuación 2.3.2 otro grado de libertad adicional. El último grado de libertad en el sistema se elimina mediante la "regla de la palanca", que no es más que un balance de materia que permite ubicar el punto de mezcla en el diagrama:

$$\frac{[IL]_M - [IL]_{IL}}{[S]_M - [S]_{IL}} = \frac{[IL]_S - [IL]_M}{[S]_S - [S]_M} \quad (2.3.3)$$

donde el subíndice M hace referencia a la composición del punto de mezcla. Así, las ecuaciones 2.3.1-2.3.3 serán referenciadas en la figura 2.3.3, en donde se esquematiza la caracterización del equilibrio termodinámico de estos sistemas ILTPP.

Los valores de los parámetros de ajuste (A , B y C) incluidos en la ecuación de la curva binodal de cada sistema líquido iónico/sal se exponen en la tabla 2.3.3. La calidad del ajuste que proporciona la curva binodal es notablemente alto, puesto que los valores de R^2 son superiores a 0,99 en ambos casos. Los valores de A y de B son muy similares para los dos sistemas, mientras que los de C son significativamente diferentes (casi un 50% superior en el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄). Esta diferencia en los valores de los parámetros de ajuste se traduce en que el sistema BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) conduce a una mayor región bifásica dado que la curva binodal se halla más próxima a los ejes del diagrama (independientemente de que la composición se expresase en fracción másica o en molalidad). Ello implica que el

sistema de mayor pH tiene mayor capacidad de inducir la formación de dos fases líquidas inmiscibles. Este resultado coincide con lo expuesto por Shahriari et al. (2012), quienes estudiaron las curvas binodales de los sistemas BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/Na₂HPO₄, concluyendo que el primero presenta la región bifásica más pequeña. Este comportamiento coincide también con la tendencia general acerca del efecto que las sales de base fosfato ejercen en la formación de ILATPS (Mourão et al., 2012).

Tabla 2.3.3. Parámetros de ajuste de la curva binodal a 298,0±0,1 K y a 0,10±0,01 MPa para los sistemas BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), cuando las fracciones másicas de los componentes se expresan en porcentaje (nivel de confianza al 95 %).

Parámetro/Coeficiente	BmimTfO/NaH ₂ PO ₄	BmimTfO/(NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄)
A	148,1±4,8	150,9±4,2
B	-0,7180±0,0177	-0,7703±0,0149
C	(7,598±2,716)·10 ⁻⁵	(5,284±2,015)·10 ⁻⁵
R ²	0,9909	0,9936

Tal y como puede apreciarse en la figura 2.3.1, la concentración de líquido iónico en la fase rica en sal es muy baja en ambos sistemas, ya que la mayor parte del BmimTfO se encuentra en la fase rica en líquido iónico a muy alta concentración. Esta baja concentración de BmimTfO en la fase rica en sal ($[IL]_s$) hace que, incluso bajos errores absolutos en la descripción de la curva binodal en esta región de composiciones, se traduzcan en errores relativos muy significativos. Por esta razón, se realiza un estudio detallado de esta zona de la curva binodal determinando mediante absorbancia a 211 nm el contenido en líquido iónico de las fases ricas en sal obtenidas en la construcción de las rectas de reparto. De acuerdo a los resultados experimentales, se establece la siguiente ecuación para describir la fracción másica de BmimTfO de la fase rica en sal:

$$[IL]_s = a_s \cdot \exp(b_s[S]_s), \quad \forall [S] > 27 \% \quad (2.3.4)$$

donde $[IL]_s$ y $[S]_s$ son las fracciones másicas de líquido iónico y de sal en la fase rica en sal, y a_s y b_s son parámetros de ajuste. La tabla 2.3.4 contiene los valores de a_s y b_s para ambos sistemas cuando las fracciones másicas se expresan en porcentaje, reflejando el ajuste casi perfecto entre los datos experimentales y la ecuación 2.3.4 ($R^2 > 0,999$). Esta ecuación puede considerarse como una simplificación de la ecuación 2.3.1 que modela la curva binodal completa, si bien la primera sólo podría aplicarse para describir la fase rica en sal a muy alta concentración de sal, esto es, la región de composiciones de interés para la técnica ILTPP. La figura 2.3.2 muestra los puntos experimentales de la curva binodal a alta concentración de sal medidos mediante absorbancia, así como las curvas predichas por las ecuaciones 2.3.1 y 2.3.4. Puede concluirse que la ecuación 2.3.1 subestima claramente el contenido en líquido iónico de la fase rica en sal, en contraste con el buen ajuste de la ecuación 2.3.4. Así, si bien los errores absolutos en $[IL]_s$ introducidos por la ecuación 2.3.1 son relativamente bajos (entre el 0,5 % y el 2 %), los errores relativos asociados son considerablemente superiores al 100% y no son

aceptables para cálculos en los que dicha variable juegue un papel importante, como por ejemplo la evaluación de las pérdidas de líquido iónico en el proceso. Por todo ello, la relación $[IL]_S-[S]_S$ se modelará por la ecuación de la curva binodal descrita por la ecuación 2.3.4, reemplazando a la ecuación 2.3.1 en esta región de alta concentración de sal del diagrama de fases.

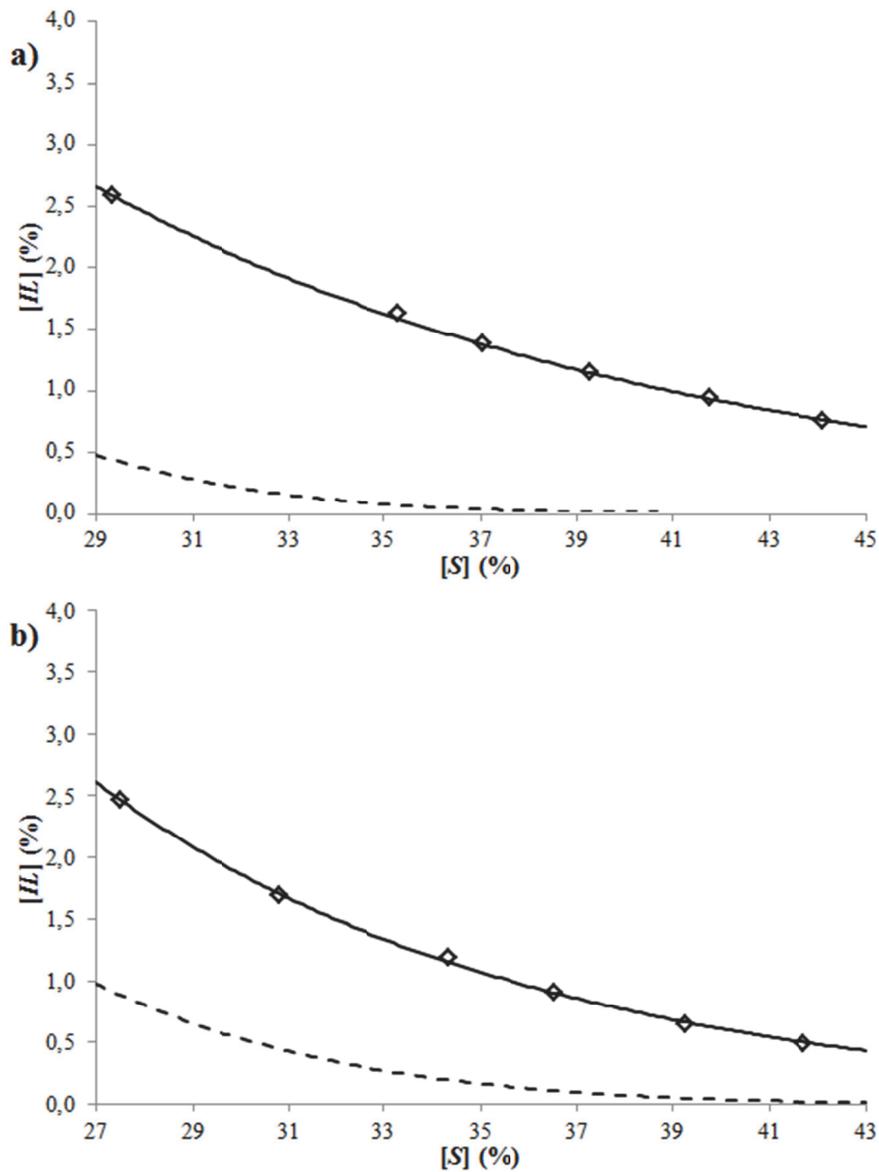


Figura 2.3.2. Región de la curva binodal a alta concentración de sal para los sistemas (a) BmimTfO/NaH₂PO₄ y (b) BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄). (◇) Puntos experimentales medidos mediante absorbancia; (—) curva binodal predicha por la ecuación 2.3.4; (---) curva binodal predicha por la ecuación 2.3.1.

Tabla 2.3.4. Parámetros de ajuste de las ecuaciones 2.3.2 y 2.3.4 cuando las fracciones másicas de los componentes se expresan en porcentaje para los sistemas BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) (nivel de confianza al 95 %).

Parámetro/Coeficiente	BmimTfO/NaH ₂ PO ₄	BmimTfO/(NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄)
Ecuación 2.3.2: $[IL]_{IL} = a_{IL}[S]_S + b_{IL}$		
a_{IL}	0,9789±0,2153	1,299±0,336
b_{IL}	54,65±8,21	42,44±11,87
R ²	0,9755	0,9665
Ecuación 2.3.4: $[IL]_S = a_S \cdot \exp(b_S[S]_S)$		
a_S	29,08±2,98	53,62±7,72
b_S	-0,0824±0,0030	-0,1119±0,0047
R ²	0,9993	0,9993

El punto crítico de cada sistema, definido por la intersección de la ecuación 2.3.2 y la curva binodal, también se representa en la figura 2.3.1. Su importancia radica en que permite determinar la composición de nuevas rectas de reparto, lo que exige conocer la relación entre $[IL]_{IL}$ y $[S]_S$ que establece la ecuación 2.3.2. Los valores de los parámetros de ajuste de esta ecuación, a_{IL} y b_{IL} , se muestran en la tabla 2.3.4. A pesar de la sensibilidad al error experimental asociado a la determinación de las rectas de reparto, los valores de R² son suficientemente altos de forma que permiten describir de forma satisfactoria el punto crítico.

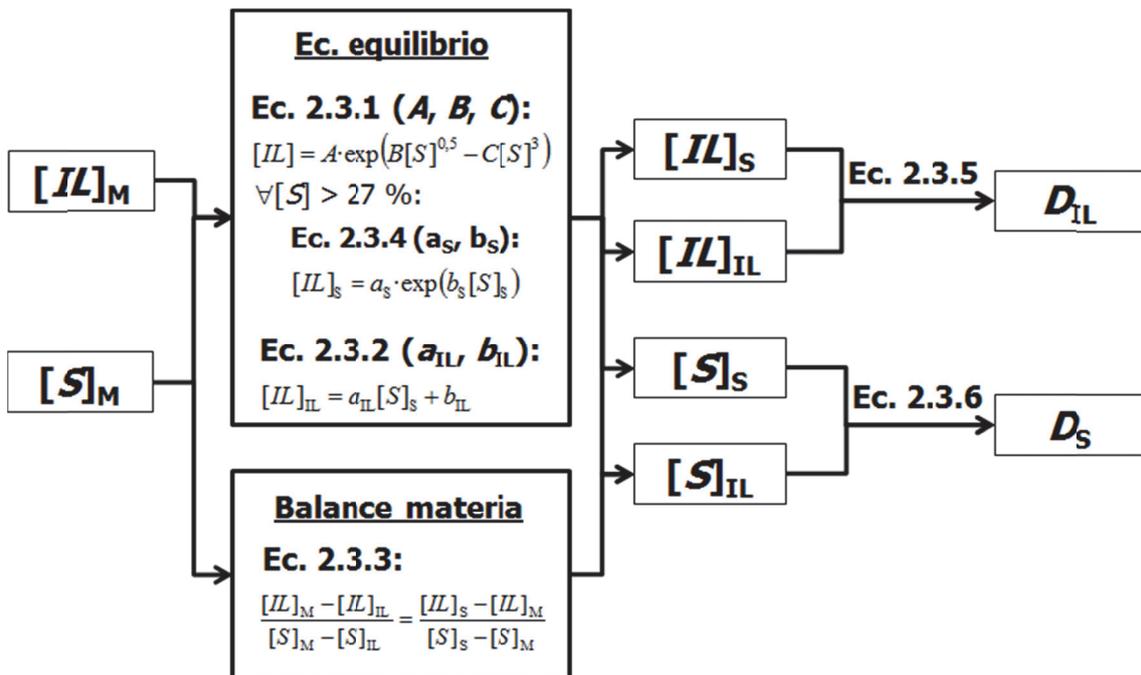


Figura 2.3.3. Caracterización del equilibrio termodinámico de los sistemas líquido iónico/sal empleados en la técnica ILTPP.

Por consiguiente, la composición de las fases ricas en sal y en líquido iónico que se obtiene a partir de un punto de mezcla que pertenezca a la región de composiciones del diagrama ternario de interés para realizar la técnica ILTPP puede calcularse mediante las ecuaciones

2.3.1-2.3.4, como se representa en la figura 2.3.3. La caracterización del equilibrio termodinámico se precisa para evaluar la fracción de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso. En una primera aproximación, el coeficiente de reparto del líquido iónico entre las dos fases líquidas, D_{IL} , puede utilizarse para medir la importancia relativa del líquido iónico que no puede reutilizarse:

$$D_{IL} = \frac{[IL]_S}{[IL]_{IL}} \quad (2.3.5)$$

De forma análoga, se puede definir el coeficiente de reparto de la sal entre las dos fases líquidas, D_S :

$$D_S = \frac{[S]_S}{[S]_{IL}} \quad (2.3.6)$$

El líquido iónico presente en la fase rica en sal puede considerarse como las pérdidas de este componente de la fase rica en líquido iónico que están determinadas por el equilibrio termodinámico. Por consiguiente, cuanto menor sea D_{IL} , menor es la concentración de líquido iónico en la fase rica en sal, lo que implica que el equilibrio termodinámico favorece la reutilización del líquido iónico puesto que aumenta la importancia relativa de $[IL]_{IL}$ con respecto de $[IL]_S$.

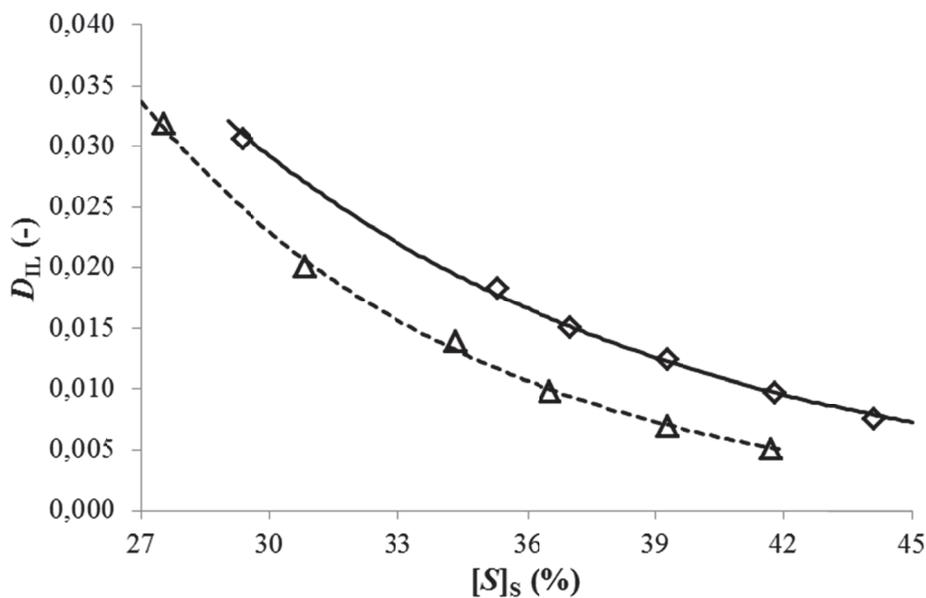


Figura 2.3.4. Coeficiente de reparto del líquido iónico, D_{IL} , vs. fracción másica de sal en la fase rica en sal, $[S]_S$ (%). Datos experimentales (◇) y simulados (—) para el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄; datos experimentales (△) y simulados (---) para el sistema BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄).

La figura 2.3.4 muestra los valores experimentales y simulados del coeficiente de reparto del líquido iónico, D_{IL} , en función de la fracción másica de sal en la fase rica en sal, $[S]_S$. Para

un valor dado de $[S]_s$, el valor simulado de D_{TL} se obtiene mediante las ecuaciones 2.3.2 y 2.3.4, ya que estas permiten calcular $[IL]_{IL}$ y $[IL]_s$, respectivamente. La alta calidad del ajuste de estas ecuaciones se pone de manifiesto en la figura 2.3.4, ya que los datos experimentales y los simulados son prácticamente idénticos. En relación a su tendencia, D_{TL} decrece de forma notable con $[S]_s$ puesto que el coeficiente de reparto disminuye un 80 % en el rango de valores de $[S]_s$ estudiado. Esta tendencia está en consonancia con lo expuesto por estudios previos, que sugieren aumentar la concentración de sal en el sistema para mejorar la reutilización del líquido iónico (Deng et al., 2009; Li et al., 2010a). Por lo tanto, D_{TL} es de utilidad para describir el equilibrio termodinámico cuando se persigue recuperar y reutilizar el líquido iónico, puesto que da una idea de lo favorable que es el equilibrio para este propósito.

Sin embargo, el equilibrio termodinámico debe acoplarse con los balances de materia del proceso y sus restricciones operativas para proporcionar una evaluación precisa de la fracción de líquido iónico que puede recuperarse.

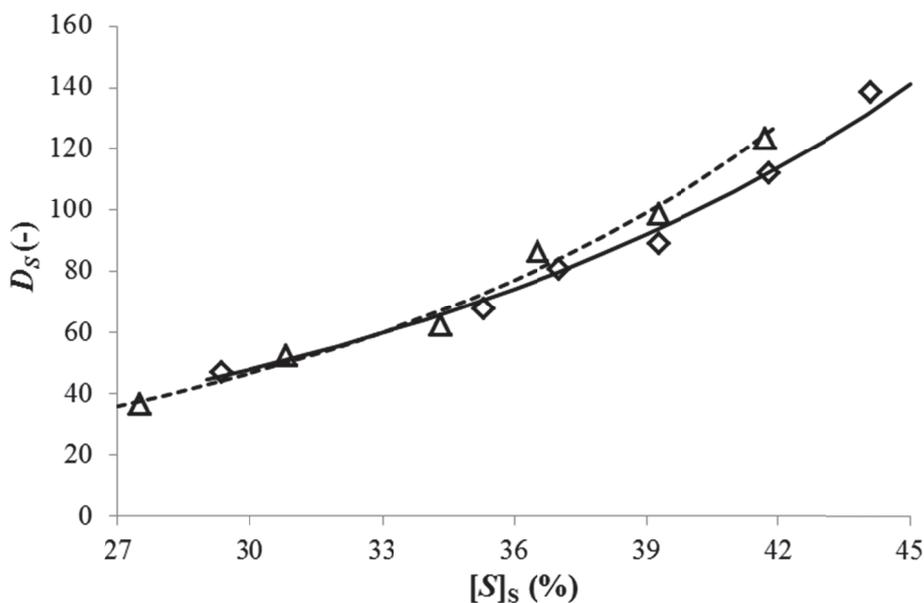


Figura 2.3.5. Coeficiente de reparto de la sal, D_s , vs. fracción másica de este componente en la fase rica en sal, $[S]_s$ (%). Datos experimentales (\diamond) y simulados (—) para el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄; datos experimentales (\triangle) y simulados (---) para el sistema BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄).

Finalmente, la figura 2.3.5 representa el coeficiente de reparto de la sal, D_s , en función de la fracción másica de este componente en la fase rica en sal, $[S]_s$. De acuerdo a lo recogido en la figura 2.3.3, el valor simulado de D_s se obtiene calculando $[S]_{IL}$ mediante las ecuaciones 2.3.1 y 2.3.2, a partir de un valor de $[S]_s$ dado, pudiéndose comprobar de nuevo la alta calidad del ajuste conseguido con las ecuaciones que describen el equilibrio termodinámico. En este caso, a diferencia de lo obtenido para D_{TL} , apenas se observan diferencias en el valor de D_s entre los dos sistemas. Además, su tendencia con la concentración de sal también es opuesta:

D_S se multiplica aproximadamente por 3 en el rango de valores de $[S]_S$ analizado. Por lo tanto, se vuelve a concluir la importancia de la concentración de sal en los valores de los coeficientes de reparto de ambos compuestos (líquido iónico y sal).

2.4. Estrategias para la recuperación del líquido iónico en el proceso ILTPP

El análisis de la recuperación de líquido iónico se realiza en términos de la cantidad de líquido iónico que no puede reutilizarse en la técnica ILTPP. La figura 2.4.1 muestra el diagrama de bloques del proceso genérico basado en ILTPP, en el que se incluye la recuperación del líquido iónico. Además, en esta figura también se incluye la notación empleada para describir las diferentes corrientes del proceso, de modo que cada variable representa la fracción másica de la corriente asociada con respecto al conjunto de corrientes de entrada al primer tanque de separación.

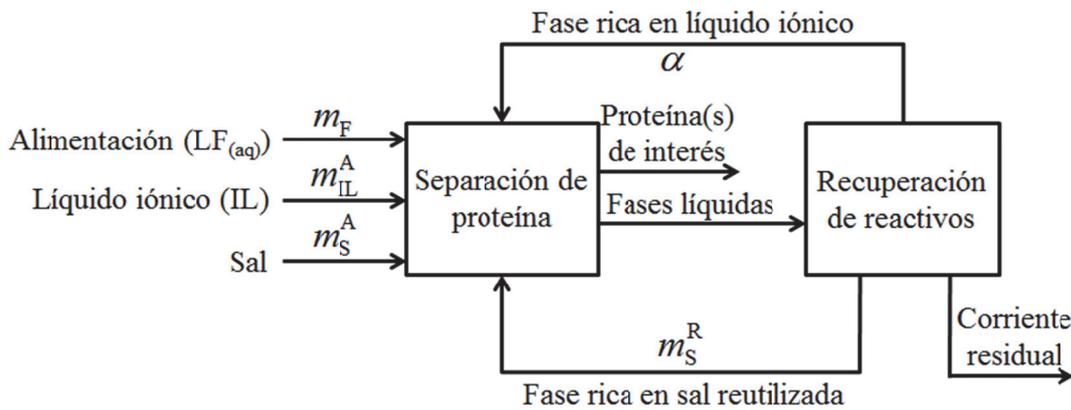


Figura 2.4.1. Diagrama de bloques del proceso ILTPP en el que se incluye la etapa de recuperación de los reactivos.

De acuerdo al diagrama de bloques, tanto la fase rica en líquido iónico (α) como la rica en sal se reutilizan, si bien únicamente la primera se recicla siempre por completo. De este modo, puesto que la concentración de líquido iónico en α es considerablemente elevada, la recirculación de esta fase garantiza altas tasas de recuperación de líquido iónico incluso cuando no se recurra a ninguna etapa de recuperación adicional. En relación a la fase rica en sal, únicamente puede reciclarse una fracción de la misma (m_S^R) para evitar que la masa total del sistema se vaya incrementando con el tiempo, por lo que el resto de esta fase constituye la corriente residual del proceso. Además de las dos corrientes de reciclo anteriores, el tanque de separación de proteína posee otras 3 corrientes de entrada: la de alimentación de la proteína

(m_F), así como la sal (m_S^A) y el líquido iónico (m_{IL}^A) que deben añadirse para mantener su concentración constante.

Conocida la composición de ambas fases, debe destacarse que independientemente de la alternativa de recuperación que se desarrolle, la fracción representada por la fase rica en líquido iónico, α , se calcula mediante un sencillo balance de materia según:

$$\alpha = \frac{[S]_S - [S]_M}{[S]_S - [S]_{IL}} \quad (2.4.1)$$

Por su parte, se define la fracción de líquido iónico que puede reutilizarse en el proceso ILTPP, R , como la variable clave para evaluar la efectividad de las distintas estrategias de recuperación de este componente. La definición cuantitativa de R viene dada por la ecuación 2.4.2:

$$R = \frac{\alpha[IL]_{IL} + m_S^R[IL]_S}{\alpha[IL]_{IL} + (1 - \alpha)[IL]_S} \quad (2.4.2)$$

En el estudio de la reutilización del líquido iónico, las 3 diferentes alternativas que se consideran para su recuperación son (Alvarez-Guerra et al., 2014b):

- a) No utilizar ninguna etapa de recuperación adicional, de forma que el líquido iónico reutilizado estaría constituido por el reciclado con la fase rica en líquido iónico y la fracción de la fase rica en sal que puede recircularse.
- b) Una vez que la proteína acumulada en la interfase líquido-líquido haya sido recuperada, incrementar el contenido en sal en el sistema para reducir la concentración de líquido iónico en la fase rica en sal y aumentar así su contenido en la fase rica en líquido iónico, que es la que se recircula en su totalidad (Deng et al., 2009; Li et al., 2010a).
- c) Eliminar agua de la fase rica en sal mediante evaporación a vacío, de modo que pueda recircularse una mayor fracción tanto del líquido iónico como de la sal contenidos en esta fase (Neves et al., 2012; Larriba et al., 2013).

Los diagramas esquemáticos del proceso ILTPP correspondientes a las 3 alternativas consideradas para reutilizar el líquido iónico se representan en la figura 2.4.2.

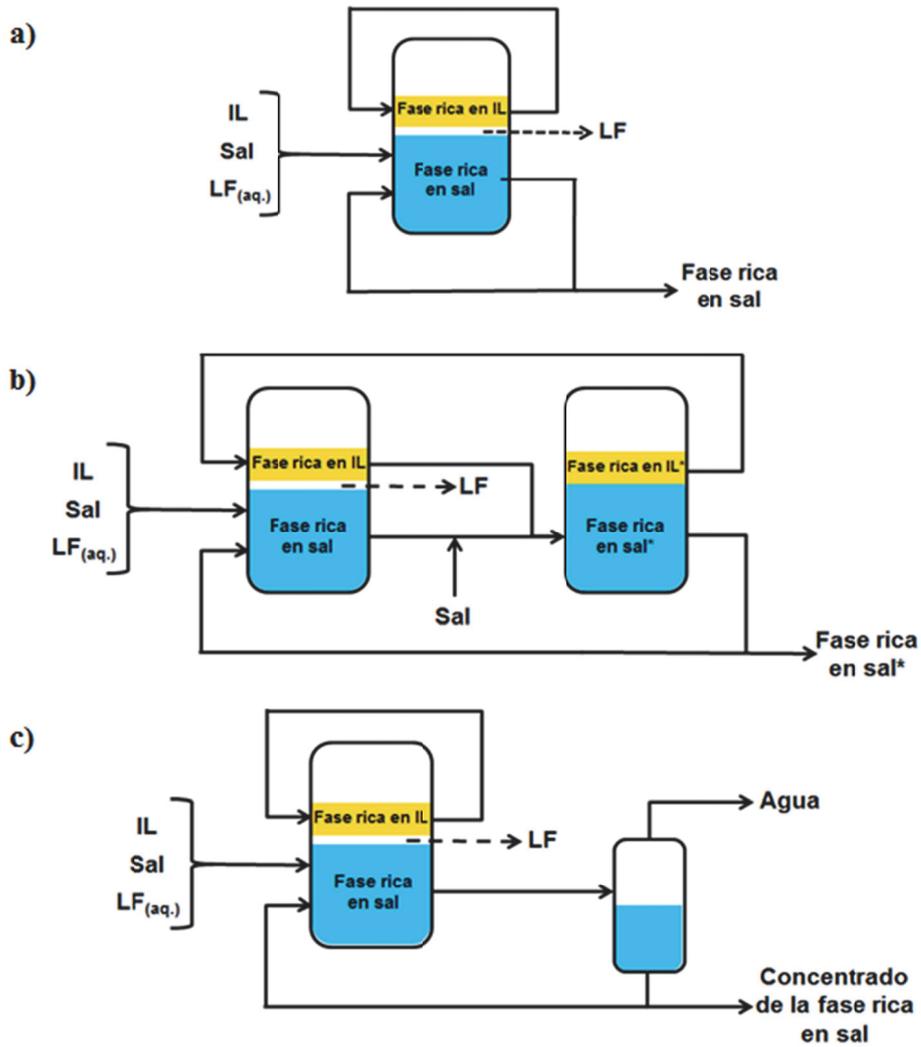


Figura 2.4.2. Diagramas esquemáticos del proceso ILTPP para las distintas alternativas consideradas para recuperar el líquido iónico: a) no se considera ninguna etapa de recuperación adicional; b) alternativa basada en el incremento del contenido en sal del sistema; c) alternativa basada en la evaporación a vacío de agua de la fase rica en sal. El asterisco (*) denota una composición distinta a la fase análoga del tanque anterior debido a la adición de la sal.

El objetivo general es maximizar la fracción de líquido iónico que puede reutilizarse en el proceso ILTPP, denotada por R , como se ha expuesto anteriormente. Para este objetivo, se desarrolla un modelo genérico válido para las 3 alternativas con la siguiente estructura general:

$$R = f([IL]_{IL}, [IL]_S, \alpha, m_S^R) \quad (2.4.3)$$

donde:

$$[IL]_{IL}, [IL]_S, [S]_{IL}, [S]_S = f([IL]_M, [S]_M) \quad (2.4.4)$$

$$\alpha = f([S]_S, [S]_{IL}, [S]_M) \quad (2.4.5)$$

$$m_F = f([LF]_M, [LF]_F, \dots) \quad (2.4.6)$$

$$m_S^A = f([S]_M, [S]_S, [S]_{IL}, \alpha, m_F, RA) \quad (2.4.7)$$

$$m_S^R = f(\alpha, m_F, m_S^A, RA) \quad (2.4.8)$$

$$\alpha + m_F + m_S^A \leq 1 \quad (2.4.9)$$

donde $[LF]_M$ es la fracción másica de la LF en el punto de mezcla en el tanque de separación de la proteína, $[LF]_F$ es la fracción másica de LF en la corriente de alimentación y RA hace referencia a la(s) variable(s) específica(s) de las diferentes alternativas de recuperación empleadas para mejorar la reutilización del líquido iónico. Asimismo, en el modelado del reciclado del líquido iónico se asumen las siguientes consideraciones:

- La LF presente en la fase rica en líquido iónico puede considerarse despreciable, de acuerdo a los resultados experimentales previos de su reparto entre las distintas fases (Alvarez-Guerra e Irabien, 2014b).
- La LF no influye en la recuperación de los componentes principales de los sistemas ILTPP (líquido iónico y sal) puesto que, por un lado, se emplea en el proceso una baja fracción másica de proteína ($1,6 \cdot 10^{-4}$) y, por otro lado, la etapa de reciclado del líquido iónico se produce una vez que la mayor parte de dicha proteína se ha recuperado en la interfase líquido-líquido en el primer tanque del proceso.
- La cantidad de líquido iónico que debe añadirse al sistema (m_{IL}^A) puede considerarse despreciable, puesto que la completa recirculación de la fase rica en líquido iónico asegura que la mayor parte de este componente pueda reutilizarse.

Por todo lo expuesto, para el cálculo de R , se precisan datos del equilibrio termodinámico de los sistemas ILTPP (ver apartado 2.3) así como los balances de materia del proceso. El equilibrio termodinámico de los sistemas ILTPP viene representado en el modelo anterior por las ecuaciones 2.4.4 y 2.4.5, precisando conocer los parámetros necesarios para describir este equilibrio (Alvarez-Guerra et al., 2014a): A , B , C , a_{IL} , a_S , b_{IL} y b_S . Debe resaltarse que no se requiere de ningún otro parámetro en las ecuaciones del modelo anterior (2.4.3-2.4.9). El equilibrio termodinámico permite conocer la composición de las dos fases líquidas así como la fracción másica relativa de cada fase, por lo que α viene establecido por la termodinámica, calculándose según la ecuación 2.4.1. Por su parte, las ecuaciones 2.4.6-2.4.8 proceden de los balances de materia del proceso, permitiendo determinar los flujos másicos de las corrientes de entrada al primer tanque de separación, con la excepción de α , que ya se ha calculado previamente, y de m_{IL}^A , que se considera despreciable. Debe precisarse que la expresión para calcular m_F puede simplificarse enormemente si se supone que toda la LF se acumula en la interfase líquido-líquido (esto es, $\%LF_1=100$), en cuyo caso esta variable sólo dependería de $[LF]_M$ y $[LF]_F$. Finalmente, debe resaltarse que la restricción impuesta por la ecuación 2.4.9 introduce la idea de que la masa total del sistema debe permanecer constante, por lo que la

suma de las fracciones másicas de la fase rica en líquido iónico (que se recicla por completo), de la corriente de alimentación y de la sal añadida para mantener la composición en este componente constante no puede ser superior a 1. Así, en caso de que dicha suma fuese igual a la unidad, implicaría que no podría recircularse nada de la fase rica en sal.

El análisis acerca de la reutilización del líquido iónico se centra en los dos sistemas identificados en el apartado 2.2 como de interés para recuperar LF mediante ILTPP, y cuyo equilibrio termodinámico se estudió en el apartado 2.3: BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄). El contenido de LF en el sistema, es decir, en el tanque de separación de la proteína, se mantiene constante e igual a $1,6 \cdot 10^{-4}$ (m/m), puesto que es la concentración a la que se han realizado la mayor parte de los experimentos con ILTPP. No obstante, si bien la concentración media de la LF en el lactosuero bovino es de 100 mg L^{-1} , en el estudio se consideran valores en la corriente de alimentación de hasta 2000 mg L^{-1} , puesto que esta es la concentración que puede alcanzarse cuando el suero se concentra mediante ultrafiltración (Eugster et al., 2012).

A continuación, se presentan las 3 alternativas mostradas en la figura 2.4.2 para la recuperación del líquido iónico empleado en los sistemas ILTPP. Debe destacarse que las conclusiones del estudio también son aplicables a los ILATPS siempre que pudiera recuperarse de forma eficiente el soluto extraído en la fase rica en líquido iónico.

a. Recuperación del líquido iónico en ausencia de etapas adicionales

La fracción de líquido iónico que puede reutilizarse en el proceso, R , se calcula según la ecuación 2.4.2. Por su parte, a partir del balance global al proceso y de los balances parciales a la LF y la sal, pueden obtenerse las ecuaciones para el cálculo de m_S^R , m_F y m_S^A , respectivamente:

$$m_S^R = 1 - \alpha - m_F - m_S^A \quad (2.4.10)$$

$$m_F = \frac{[LF]_M - LF_S \cdot [LF]_M + \frac{LF_S \cdot [LF]_M}{1 - \alpha} \left[\frac{[S]_M - \alpha[S]_{IL} - (1 - \alpha)[S]_S}{100 - [S]_S} \right]}{[LF]_F - \frac{LF_S \cdot [LF]_M}{1 - \alpha} \left(1 + \frac{[S]_S}{100 - [S]_S} \right)} \quad (2.4.11)$$

$$m_S^A = \frac{[S]_M - \alpha[S]_{IL} - (1 - \alpha - m_F)[S]_S}{100 - [S]_S} \quad (2.4.12)$$

donde LF_S es la fracción de LF que permanece en la fase rica en sal (es decir, $\%LF_S$ expresado en fracción unitaria). Como puede comprobarse, en este caso m_F no depende únicamente de

$[LF]_M$ y $[LF]_F$, puesto que se considera la posibilidad de que $\%LF_I$ sea menor de 100 %, quedando el resto de la proteína en la fase rica en sal.

La figura 2.4.3 muestra la fracción de líquido iónico, expresado como porcentaje, que no puede reutilizarse en el proceso, $100-R$, para diferentes valores de $\%LF_I$ y para los dos sistemas ILTPP de interés. Puede deducirse cómo cuanto mayor es la concentración de proteína en la corriente de alimentación, $[LF]_F$, menor es $100-R$, porque la cantidad de corriente de alimentación que se precisa para alcanzar el contenido de LF prefijado ($[LF]_M=0,016$ %) en el sistema disminuye y, en consecuencia, se puede recircular una fracción de la fase rica en sal mayor. Si no pudiera recircularse nada de fase rica en sal, el 4,97 % y el 4,71 % del líquido iónico presente en los sistemas BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), respectivamente, no podría reutilizarse en el proceso. En cambio, si se emplea una alimentación concentrada de proteína (p. ej., 2000 mg L⁻¹), estas pérdidas de líquido iónico se reducen al 0,83 % y al 0,76 %, respectivamente.

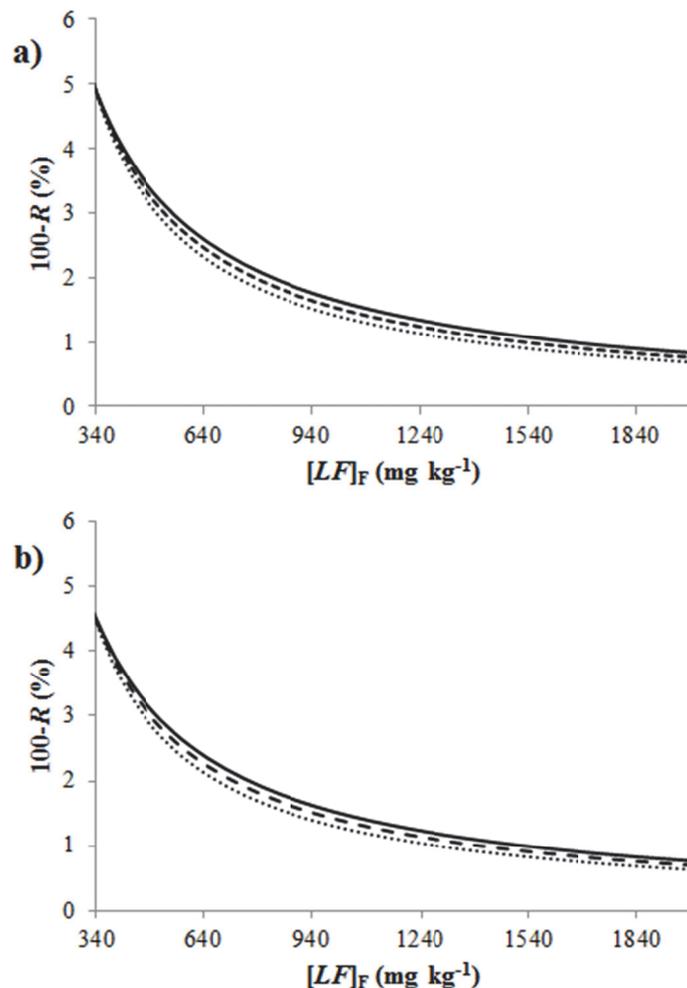


Figura 2.4.3. Porcentaje de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso ILTPP, $100-R$ (%), cuando no se emplea ninguna etapa adicional para su recuperación, a diferentes valores de $\%LF_I$ (— $\%LF_I=100$; - - - $\%LF_I=90$; ···· $\%LF_I=80$) para los sistemas: a) BmimTfO/NaH₂PO₄; b) BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), a diferentes valores de concentración de proteína en la corriente de alimentación, $[LF]_F$.

En relación a la influencia en la eficiencia de la técnica ILTPP, se obtiene que a menor $\%LF_1$, menor es $100-R$, dado que menores valores de $\%LF_1$ implican que la cantidad de LF contenida en la fase rica en sal aumenta, con lo que disminuye el volumen de corriente de alimentación de proteína que se requiere para mantener constante su concentración. De este modo, la fracción de la fase rica en sal que puede recircularse aumenta con esa disminución de $\%LF_1$. Sin embargo, la influencia de $\%LF_1$ es limitada, especialmente para bajas concentraciones de proteína en la alimentación ($[LF]_F$), ya que en este caso la fracción de fase rica en sal que se recicla es muy pequeña y, por consiguiente, la cantidad de proteína que se recircula con dicha fase también es muy baja. En el caso extremo, $100-R$ es independiente de $\%LF_1$ para el valor de $[LF]_F$ para el cual no se recircula nada de la fase rica en sal, cumpliéndose que $\alpha + m_F + m_S^A = 1$. Esta concentración de LF es igual a 334 mg kg^{-1} para el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ y a 325 mg kg^{-1} para el BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄). A menores valores de $[LF]_F$ en cada sistema, la corriente de alimentación introduciría tal cantidad de agua que sería imposible alcanzar la concentración deseada en líquido iónico y sal de los puntos de mezcla de interés para la técnica ILTPP.

Finalmente, comparando la recuperación del líquido iónico en ambos sistemas, se concluye que la cantidad de este componente que no puede reutilizarse es alrededor de un 8 % inferior con el sistema BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄). Ello se debe a que la curva binodal de este sistema se halla más cercana a los ejes del diagrama de fases ternario, con lo que se obtiene una región bifásica mayor que conduce a que el líquido iónico contenido en la fase rica en sal sea menor, tal y como se ha comentado en el apartado 2.3.

b. Adición de una cantidad extra de sal

En esta alternativa (ver figura 2.4.2.b), el proceso se desarrolla en dos tanques de separación secuenciales: en el primero, se realiza la separación de la proteína; mientras que en el segundo tiene lugar la recuperación del líquido iónico. Entre ambos tanques, se añade al sistema una cantidad extra de sal para mejorar la recuperación del líquido iónico en ese segundo tanque, tal y como se representa en la figura 2.4.2. Por lo tanto, la variable específica de esta alternativa para mejorar la reutilización del líquido iónico, denotada por RA en el modelo general, es la fracción másica de sal extra que se añade al sistema respecto del total de la masa asociada a las corrientes de entrada al primer tanque de separación, m_S^{extra} , calculada según:

$$m_S^{\text{extra}} = \frac{M_M}{M_{M,0}} - 1 \quad (2.4.13)$$

donde $M_{M,0}$ es el flujo másico total de las corrientes de entrada al primer tanque de separación (antes de la adición de la sal extra) y M_M es igual a la suma de $M_{M,0}$ y la sal extra añadida al sistema. En consecuencia, la nueva fracción másica de sal en el punto de mezcla en el segundo tanque, $[S]_M$, se calcula según:

$$[S]_M = \frac{[S]_{M,0} + 100m_S^{\text{extra}}}{(1 + m_S^{\text{extra}})} \quad (2.4.14)$$

donde $[S]_{M,0}$ es la fracción másica de sal en el punto de mezcla en el primer tanque en el que se realiza la separación de la proteína.

La fracción de líquido iónico que puede reutilizarse, R , viene determinada también en esta alternativa por la ecuación 2.4.2. No obstante, la fracción de la fase rica en sal que puede recircularse, m_S^R , puede estar limitada por dos restricciones diferentes en función de las condiciones de operación. Así, para bajas cantidades de sal extra añadida (m_S^{extra}) y/o bajas concentraciones de proteína en la alimentación ($[LF]_F$), m_S^R está limitada por la corriente de alimentación de proteína y la cantidad de sal que debe añadirse al sistema para que las concentraciones de LF y de sal permanezcan constantes en el primer tanque. Por el contrario, a relativamente altos valores de m_S^{extra} y/o de $[LF]_F$, m_S^R está limitada por la masa de sal que puede recircularse con la fase rica en este componente de modo que la concentración de sal en el primer tanque del proceso no aumente con el tiempo. Para modelar estas dos diferentes posibles restricciones sobre m_S^R , partiendo del balance de materia parcial a la sal en el primer tanque, se define una variable auxiliar Q_1 para definir la restricción que está activa:

$$Q_1 = \frac{[S]_{M,0} - \alpha(1 + m_S^{\text{extra}})[S]_{IL} - [1 - \alpha(1 + m_S^{\text{extra}}) - m_F][S]_S}{100 - [S]_S} \quad (2.4.15)$$

Q_1 representa la fracción másica de sal que debe añadirse al sistema para mantener constante la fracción másica de sal, m_S^A , cuando m_S^R está limitada por m_F y m_S^A , lo que implica que $Q_1 \geq 0$. En caso contrario ($Q_1 < 0$), no se precisa adicionar sal para mantener constante su concentración, con lo que $m_S^A = 0$ y m_S^R puede calcularse directamente del balance parcial a la sal. Matemáticamente, se emplean dos variables binarias, Y_1 e Y_2 , para modelar estos dos escenarios, con lo que el cálculo de m_S^A y de m_S^R queda como sigue:

$$m_S^A = Y_1 \cdot Q_1 \quad (2.4.16)$$

$$m_S^R = Y_1 \cdot [1 - \alpha(1 + m_S^{\text{extra}}) - m_F - m_S^A] + Y_2 \cdot \frac{[S]_{M,0} - \alpha(1 + m_S^{\text{extra}})[S]_{IL}}{[S]_S} \quad (2.4.17)$$

donde:

- Si $Q_1 \geq 0$: $Y_1 = 1$, $Y_2 = 0$
- Si $Q_1 < 0$: $Y_1 = 0$, $Y_2 = 1$

En el análisis de esta alternativa para reutilizar el líquido iónico, se considera en todos los casos que $\%LF_1=100$ dada la pequeña influencia que esta variable tiene sobre R , lo que simplifica notablemente el cálculo de m_F :

$$m_F = \frac{[LF]_M}{[LF]_F} \tag{2.4.18}$$

Finalmente, debe señalarse que la restricción de la ecuación 2.4.9 debe modificarse ligeramente para tener presente el aumento de masa del sistema debido a la adición de la sal extra, con lo que esta restricción queda:

$$\alpha(1 + m_S^{\text{extra}}) + m_F + m_S^A \leq 1 \tag{2.4.19}$$

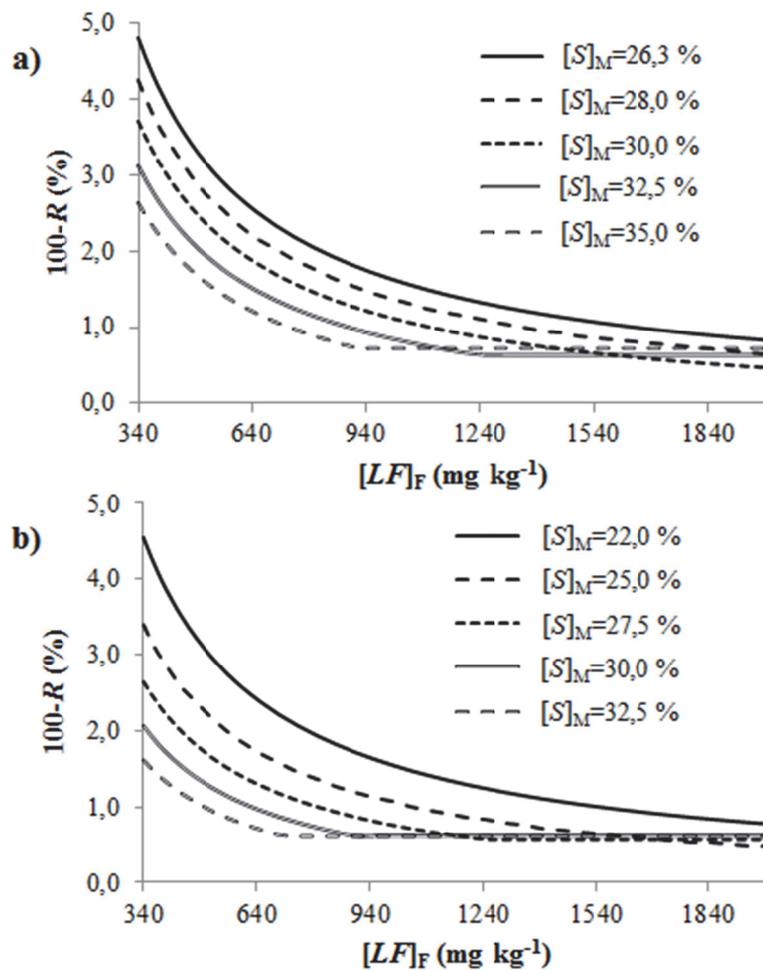


Figura 2.4.4. Porcentaje de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso ILTPP, $100-R$ (%), a diferentes fracciones máxicas de sal en el segundo tanque de separación para la recuperación de este componente, en los sistemas: a) BmimTfO/NaH₂PO₄; b) BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), a diferentes valores de concentración de proteína en la corriente de alimentación, $[LF]_F$.

La fracción de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso ILTPP se representa en la figura 2.4.4 para diferentes cantidades de sal extra añadidas (lo que conduce a diferente concentración de sal en el segundo tanque de alimentación) y los dos sistemas líquido iónico/sal de interés. En esta figura, la curva de menor $[S]_M$ representa el caso en el que no se añade nada de sal extra entre el primer y el segundo tanque (es decir, corresponde a las curvas a $\%LF_T=100$ de la figura 2.4.3). Puede comprobarse cómo la adición de sal permite reducir las pérdidas de líquido iónico al 0,5 % en el mejor escenario, presentando la misma tendencia general ya descrita según la cual $100-R$ es menor a altas concentraciones de proteína en la corriente de alimentación. Sin embargo, se aprecia cómo para distintos $[S]_M$, existe un valor de $[LF]_F$ a partir del cual un aumento adicional de la concentración de proteína en la alimentación no posibilita reducir más aún $100-R$. Así, aunque en la región en la que $100-R$ se mantiene constante se podría recircular una mayor fracción de la fase rica en sal sin incrementar la masa total del sistema, m_S^R no puede aumentarse puesto que ello conduciría a un incremento de la concentración de sal en el primer tanque de separación debido al alto contenido en sal de esta corriente que se recircula. El valor de $[LF]_F$ que limita la región en la que $100-R$ es constante disminuye con la cantidad de sal extra añadida, dado que a mayor m_S^{extra} , menor es la fracción de la fase rica en sal que se precisa para alcanzar la concentración deseada de este componente en el punto de mezcla del primer tanque.

Este comportamiento explica por qué la adición de sal extra es mucho más efectiva para la recuperación del líquido iónico a bajos valores de $[LF]_F$. Así, a bajos valores de esta variable la adición de sal extra conduce a reducciones en la pérdida de líquido iónico superiores al 60 %, mientras que esta mejora se reduce a menos del 20 % a altos valores de $[LF]_F$, con lo que esta alternativa basada en el aumento del contenido en sal no es muy efectiva a altas concentraciones de proteína en la corriente de alimentación. Además, para altos valores de $[LF]_F$, la adición de una mayor cantidad de sal extra puede ser contraproducente por conducir a un aumento de $100-R$, como se refleja en la figura 2.4.4. Por un lado, la fracción de líquido iónico que no puede recircularse de por sí es muy baja a altos valores de $[LF]_F$ incluso cuando no se recurre a ninguna etapa de recuperación adicional; por otro lado, la restricción para que la concentración de sal en el primer tanque permanezca constante se hace más restrictiva cuando se añaden mayores cantidades de sal extra.

La figura 2.4.5 muestra, para cada valor de $[LF]_F$ en cada sistema estudiado, el valor de la fracción másica de sal en el segundo tanque de separación que hace que $Q_1=0$ y el valor de $100-R$ que se obtiene en esas condiciones. Este valor de $100-R$ representa la pérdida mínima de líquido iónico que puede conseguirse para cada valor de $[LF]_F$ con esta alternativa basada en la adición de sal, puesto que para ese mismo valor de $[S]_M$, el valor de $100-R$ permanece ya constante incluso para mayor concentración de proteína en la alimentación, como se ha explicado con anterioridad. Por ejemplo, en el sistema BmimTfO/NaH₂PO₄, el valor de $[S]_M$ que

minimiza las pérdidas de líquido iónico para una concentración de proteína de 1000 mg kg^{-1} es de $34,2 \%$ (m/m); así, para concentraciones de proteína mayores que 1000 mg kg^{-1} , la fracción de líquido iónico que no puede reciclarse es de $0,705 \%$ cuando $[S]_M=34,2 \%$. Debe resaltarse que en la figura 2.4.5 únicamente se grafica el rango de valores de $[LF]_F$ que conduce a composiciones del sistema factibles. Esta figura refuerza la idea de que para $[LF]_F \geq 800 \text{ mg kg}^{-1}$, a mayor concentración de proteína en la alimentación, menor es el valor de $100-R$ y menor es el valor de $[S]_M$ que minimiza las pérdidas de líquido iónico, puesto que las pendientes de $[S]_M - [LF]_F$ y de $(100-R) - [LF]_F$ son negativas. Por consiguiente, para cada valor de $[LF]_F$, es inútil la adición de una cantidad de sal extra mayor que la requerida para conseguir los valores de $[S]_M$ que se muestran en la figura 2.4.5, puesto que mayores valores de $[S]_M$ aumentan la fracción de líquido iónico que no puede recuperarse.

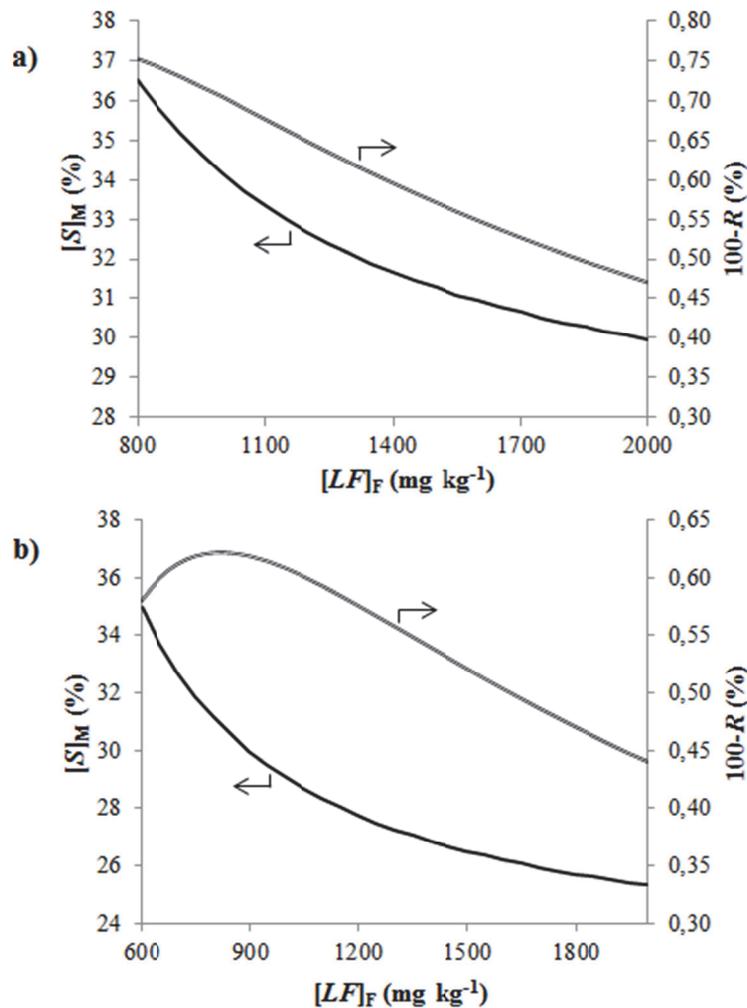


Figura 2.4.5. Valor de la fracción másica de sal en el segundo tanque de separación, $[S]_M$, que hace $Q_1=0$ y el valor correspondiente de $100-R$ en estas condiciones obtenidos para cada $[LF]_F$ en los sistemas: a) BmimTfO/ NaH_2PO_4 ; b) BmimTfO/ $(\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$.

Los valores de $[S]_M$ que se exponen en la figura 2.4.5 deben ser considerados como el límite superior para la adición de sal extra, ya que son los que minimizan las pérdidas de líquido

iónico para un valor dado de $[LF]_F$. No obstante, no deben considerarse como los valores óptimos para $[S]_M$, puesto que aunque unas pérdidas mínimas de líquido iónico puedan conllevar ventajas para el proceso desde un punto de vista medioambiental, esta adición de sal extra puede mejorar la reutilización del líquido iónico en una fracción tan pequeña que no sea rentable económicamente. Por ello, se propone el siguiente criterio económico, que puede considerarse como una restricción adicional que se añadiría para esta alternativa al modelo general descrito por las ecuaciones 2.4.3-2.4.9:

$$\frac{dM_S^{IL}}{dM_M^S} \geq \frac{\text{Precio de S}}{\text{Precio de IL}} \quad (2.4.20)$$

donde M_S^{IL} es la masa de líquido iónico presente en la fase rica en sal y M_M^S es la masa de sal presente en el sistema global. La idea que apoya esta ecuación es que el valor del líquido iónico que se recupera de la fase rica en sal debido a la adición de sal extra no debe ser menor que el valor de la sal extra que se añade. Desarrollando dicha expresión y para un ratio de precios igual a 0,0508 (Alvarez-Guerra et al., 2014b), se obtiene que la adición de sal extra es rentable hasta que $[S]_M$ alcance el 27,5 % y el 26,5 % para los sistemas BmimTfO/NaH₂PO₄ y BmimTfO/(NaH₂PO₄/Na₂HPO₄), respectivamente. Por lo tanto, puesto que estas concentraciones de sal pertenecen al rango bajo en relación a las estudiadas en la figura 2.4.5, la reutilización de la máxima cantidad de líquido iónico cuando se recurre a la sal extra añadida no es la opción óptima desde el punto de vista económico.

En conclusión, aunque diversos trabajos previos proponen incrementar el contenido en sal del sistema para mejorar la recuperación del líquido iónico (Deng et al., 2009; Li et al., 2010a), se ha demostrado en este estudio que bajo determinadas condiciones, esta alternativa no sólo no mejora sino que incrementa las pérdidas de líquido iónico. Igualmente, aunque se pueden alcanzar tasas de recuperación de este componente del 99,5 %, la influencia de la adición de sal extra es muy limitada cuando se emplean alimentaciones concentradas en la proteína. Además, el mayor consumo de sal que se precisa debe tenerse presente puesto que las adiciones de sal extra que son rentables desde un punto de vista económico son menores que las requeridas para maximizar el líquido iónico recuperado. En consecuencia, un aumento en el contenido en sal del sistema puede ser útil cuando se añade una moderada cantidad de sal extra y, especialmente, para bajas concentraciones de proteína en la alimentación, pero esta alternativa presenta diversas y serias limitaciones que deben tenerse en cuenta.

c. Concentración de la fase rica en sal mediante evaporación

La entrada de la LF en el sistema lleva asociada la introducción de una cantidad muy significativa de agua, que evita que pueda recircularse la fase rica en sal por completo. De este modo, si la misma cantidad de agua que se añade con la corriente de alimentación de proteína

se retirase previamente de la fase rica en sal, todo el líquido iónico y la sal contenidos en esta fase podrían recircularse. Puesto que la presión de vapor tanto del líquido iónico como de la sal son despreciables, el agua puede separarse fácilmente de ellos mediante evaporación (Neves et al., 2012; Larriba et al., 2013). Para ello, se recurre a la evaporación a vacío a temperatura ambiente para prevenir la posible degradación por altas temperaturas de la proteína o del líquido iónico que pudieran quedar en la fase rica en sal. El diagrama esquemático de esta alternativa se muestra en la figura 2.4.2.c.

La fracción de la fase rica en sal que debe evaporarse tendría que ser igual a la cantidad de corriente de alimentación y de sal que han de añadirse al sistema para que la concentración del sistema permanezca constante. No obstante, para bajos valores de $[L]_F$, la fracción de fase rica en sal que debería evaporarse puede ser superior a su contenido en agua, por lo que en estos casos se procede a la eliminación de toda el agua contenida en dicha fase, siendo la máxima fracción de fase rica en sal que puede evaporarse igual a la fracción másica de agua en la misma. Para el modelado de estos escenarios, se recurre a una variable auxiliar Q_2 que permite identificar el caso que corresponde a unas condiciones de operación dadas y que representa la fracción de la fase rica en sal que se evapora cuando su valor es inferior a la fracción másica de agua en esta fase:

$$Q_2 = \frac{m_F + m_S^A}{1 - \alpha} \quad (2.4.21)$$

Para su cálculo, m_F se obtiene de acuerdo a la ecuación 2.4.18, mientras que m_S^A y m_S^R se determinan a través de:

$$m_S^A = \frac{([S]_M - \alpha[S]_{IL})(1 - m_S^E) - (1 - \alpha - m_F)[S]_S}{100 - [S]_S - 100m_S^E} \quad (2.4.22)$$

$$m_S^R = 1 - \alpha - m_F - m_S^A \quad (2.4.23)$$

donde m_S^E es la fracción másica de la fase rica en sal que se evapora, por lo que es la variable que se corresponde con RA en el modelo general introducido por las ecuaciones 2.4.3-2.4.9. Teniendo presente que Q_2 puede ser equivalente a m_S^E y combinando las ecuaciones 2.4.21 y 2.4.22, se obtiene:

$$Q_2 = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (2.4.24)$$

donde:

$$a = 1 - \alpha \quad (2.4.25)$$

$$b = -[(1 - \alpha)(1 - 0.01[S]_S) + m_F + 0.01[S]_M - 0.01\alpha[S]_{IL}] \quad (2.4.26)$$

$$c = (1 - 0.01[S]_S)m_F + 0.01[S]_M - 0.01\alpha[S]_{IL} - 0.01(1 - \alpha - m_F)[S]_S \quad (2.4.27)$$

Como resultado, el cálculo de m_S^E y de la fracción de líquido iónico contenida en la fase rica en sal que se recicla, IL_S^R , puede realizarse de acuerdo a las ecuaciones 2.4.28 y 2.4.29:

$$m_S^E = Y_3[1 - 0.01([S]_S + [IL]_S)] + Y_4 \cdot Q_2 \quad (2.4.28)$$

$$IL_S^R = Y_3 \frac{m_S^R}{(1 - m_S^E)(1 - \alpha)} + Y_4 \quad (2.4.29)$$

donde:

- Si $Q_2 \geq 1 - 0.01([S]_S + [IL]_S)$: $Y_3=1$, $Y_4=0$
- Si $Q_2 < 1 - 0.01([S]_S + [IL]_S)$: $Y_3=0$, $Y_4=1$

Así, en el primer caso ($Y_3=1$, $Y_4=0$), m_S^E está limitada por la concentración de agua en la fase rica en sal, mientras que en el segundo caso, la masa de esta fase se reduce en la misma cantidad que la masa que debe añadirse al sistema debido a m_F y a m_S^A . Por consiguiente, la expresión para calcular la fracción de líquido iónico que puede reutilizarse, R , es igual a:

$$R = \frac{\alpha[IL]_{IL} + IL_S^R(1 - \alpha)[IL]_S}{\alpha[IL]_{IL} + (1 - \alpha)[IL]_S} \quad (2.4.30)$$

Como puede apreciarse, la variable m_S^R se reemplaza por IL_S^R , porque en esta alternativa la corriente residual tiene una composición distinta que la fracción de la fase rica en sal que se recircula, siendo la fracción que se recupera de líquido iónico presente en esta fase la variable que realmente es de interés para el cálculo de R . En las alternativas previas, se cumplía que la corriente residual y la fase rica en sal que se recircula tenían la misma composición, por lo que $m_S^R = IL_S^R(1 - \alpha)$.

De acuerdo al modelo expuesto para esta alternativa basada en la evaporación a vacío, se logra una recuperación completa tanto del líquido iónico como de la sal para casi todas las concentraciones de proteína en la alimentación, con excepción del estrecho rango de $[LF]_F$ que se representa en la figura 2.4.6. Para valores de $[LF]_F$ superiores a los del rango mencionado, la fracción evaporada de la fase rica en sal es menor que su fracción en agua, $Q_2 < 1 - 0.01([S]_S + [IL]_S)$, por lo que el 100 % del líquido iónico y de la sal pueden recircularse. Para valores menores de $[LF]_F$ que los representados en la figura 2.4.6, la corriente de alimentación introduciría tal cantidad de agua que no podría alcanzarse la composición deseada para el punto de mezcla en el primer tanque de separación, como se ha comentado con anterioridad. Por su parte, en el rango de valores de $[LF]_F$ mostrados en la figura mencionada, puede observarse cómo la fracción de líquido iónico que se pierde en el proceso

decrece rápidamente con la concentración de proteína desde valores superiores a 4,5 % a 0,0 %. En este caso, la cantidad de agua que debería eliminarse es superior al contenido en agua de la fase rica en sal, por lo que sólo es posible recircular parte del líquido iónico presente en esta fase. Así, al menor valor de $[LF]_F$ para el que $100-R=0$, se produce la evaporación completa del agua contenida en la fase rica en sal, por lo que la corriente que se recircula estaría compuesta de sal (principalmente) y de líquido iónico. Si el concentrado de la fase rica en sal estuviera compuesto sólo por sal, sería equivalente a m_s^A , por lo que toda la sal del sistema podría reutilizarse y $m_s^A=0$. Sin embargo, la fase rica en sal contiene también líquido iónico, con lo que sólo puede recircularse parte de esta fase para evitar un aumento de la masa del sistema. En consecuencia, tanto $100-R$ como m_s^A son mayores que 0. Puesto que la concentración de líquido iónico es muy baja en la citada fase, el comportamiento descrito en el que $100-R$ disminuye drásticamente con $[LF]_F$ se produce para un rango muy estrecho de esta última variable.

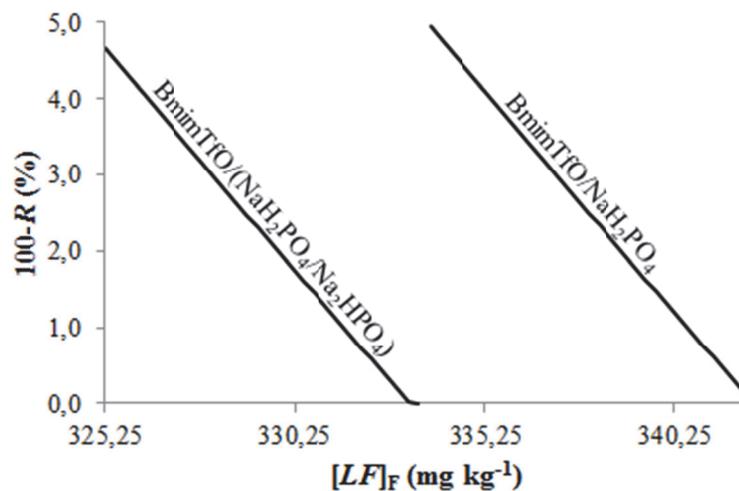


Figura 2.4.6. Porcentaje de líquido iónico perdido en el proceso, $100-R$ (%), cuando se recurre a la evaporación a vacío para mejorar la recuperación de este componente.

Finalmente, debe resaltarse que si se produjese la evaporación total del agua contenida en la fase rica en sal, quedaría una mezcla formada por sal (principalmente) y líquido iónico. Aunque el manejo de esta corriente resultante sería más complejo que el de las otras corrientes del proceso, en ningún caso conduciría a un sistema infactible.

Por consiguiente, a diferencia de la alternativa basada en la adición de sal extra, que presenta diversas restricciones y limitaciones, la concentración de la fase rica en sal mediante evaporación permite reutilizar el 100% del líquido iónico y la sal del proceso, bajo la práctica totalidad de condiciones de operación. Ello implica que el proceso ILTPP en el que para la recuperación del líquido iónico se emplee evaporación a vacío no precisa de un consumo neto de reactivos.

d. Verificación experimental del reciclado del líquido iónico de los sistemas ILTPP

El modelo desarrollado para recuperar el líquido iónico cuando no se emplea ninguna etapa adicional se basa directamente en el equilibrio termodinámico del sistema ILTPP estudiado y modelado en el apartado 2.3. En cambio, debido a su mayor complejidad por implicar varias etapas, se considera conveniente validar experimentalmente los modelos desarrollados para describir la recuperación del líquido iónico cuando se recurre a un aumento del contenido de sal en el sistema y al empleo de evaporación a vacío. Si bien estos modelos se han desarrollado para un modo de operación del proceso ILTPP en continuo, los experimentos para su validación se han ejecutado en discontinuo, puesto que los modelos propuestos pueden adaptarse a esta operación en discontinuo sin más que reemplazar el concepto de corriente por el de carga.

Estos experimentos constan de 6 ciclos, y en cada ciclo, se determina la composición global del sistema y de cada una de las fases líquidas mediante el método gravimétrico propuesto por Merchuck et al. (1998). El líquido iónico de los sistemas ILTPP se recircula en estos experimentos de acuerdo a una de las dos alternativas desarrolladas para este propósito. En estas pruebas, la corriente de alimentación de proteína se reemplaza por agua desionizada porque en el proceso la recuperación del líquido iónico tiene lugar una vez que la mayor parte de la proteína, que se encuentra acumulada en la interfase, se retira del sistema. Además, la fracción másica global de proteína en los sistemas ILTPP es muy baja ($1,6 \cdot 10^{-4}$ m/m), por lo que la composición global puede describirse únicamente mediante los tres componentes principales: líquido iónico, sal y agua.

A su vez, según se recurra a una alternativa u otra para mejorar la reutilización del líquido iónico, los experimentos presentan ciertas peculiaridades. Así, en aquellos en los que se incrementa la concentración de sal para mejorar la reciclabilidad de ese componente, cada ciclo consta de dos etapas secuenciales. En primer lugar, una cantidad predeterminada de sal adicional se añade al sistema ILTPP, cuya composición se había obtenido previamente. Una vez que el nuevo punto de mezcla se equilibra y se determina su composición, la fase rica en líquido iónico, la fracción de la fase rica en sal que puede recircularse según el modelo desarrollado para describir esta alternativa y el agua fresca que simula la corriente de alimentación de proteína se mezclan para dar comienzo a un nuevo ciclo.

Por otro lado, la alternativa basada en la evaporación a vacío de parte de la fase rica en sal retira del sistema la cantidad de agua de dicha fase que establece el modelo desarrollado (apartado 2.4.c). Posteriormente, se añade al sistema la cantidad de agua que simula la corriente de alimentación, que se mezcla con la fase rica en líquido iónico y la fracción no evaporada de la fase rica en sal que se recircula, comenzando un nuevo ciclo del proceso.

Estos experimentos se realizan para una concentración $[L]_F=1000 \text{ mg kg}^{-1}$, ya que es una concentración intermedia en el rango de concentraciones analizado y es la empleada en las disoluciones de proteínas utilizadas en trabajos previos acerca de ILTPP (Alvarez-Guerra e Irabien, 2014a, 2014b). La reutilización del líquido iónico se evalúa durante 6 ciclos para ambos sistemas de interés: $\text{BmimTfO}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ y $\text{BmimTfO}/(\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ para verificar la alternativa basada en evaporación, retirando el 22 % de la fase rica en sal en cada ciclo, ya que es la fracción de esta fase que el modelo predice que se debe evaporar para asegurar la completa recirculación del líquido iónico y de la sal en ella contenidos. En relación a la alternativa que emplea un incremento en el contenido en sal del sistema, se evalúa el sistema $\text{BmimTfO}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ empleando en el punto de mezcla del segundo tanque $[S]_M=35 \%$, porque asegura la mayor recuperación de líquido iónico para la mencionada concentración de proteína.

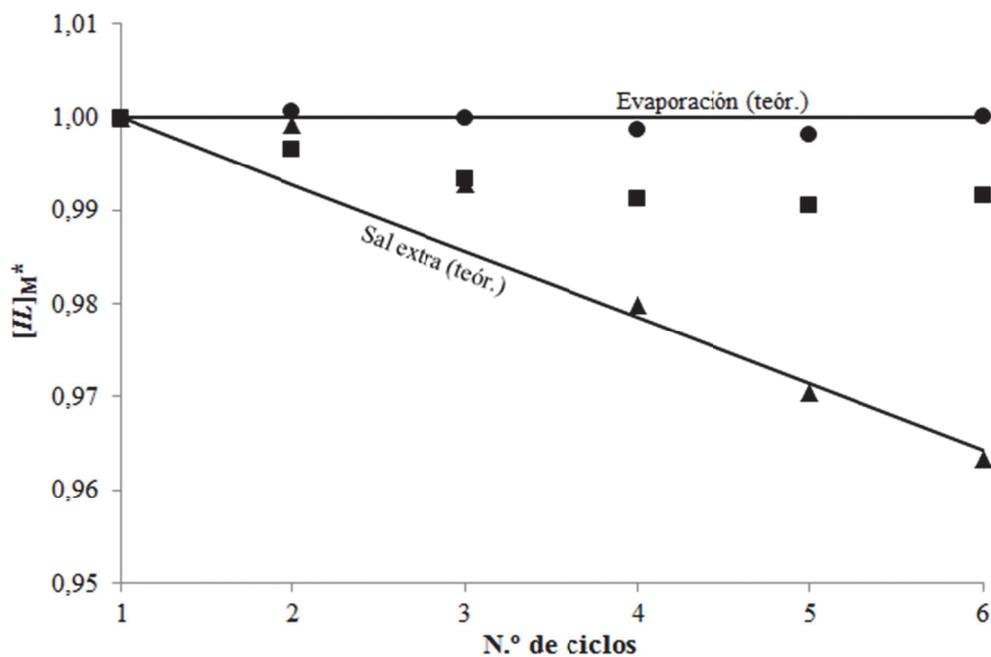


Figura 2.4.7. Evolución de los valores adimensionales tanto teóricos como experimentales de $[IL]_M$, $[IL]_{M^*}$, para los diferentes experimentos de recidabilidad del líquido iónico. Notación de los puntos experimentales: (■) evaporación a vacío con el sistema $\text{BmimTfO}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; (●) evaporación a vacío con el sistema $\text{BmimTfO}/(\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4)$; (▲) adición de sal extra al sistema $\text{BmimTfO}/\text{NaH}_2\text{PO}_4$.

En la figura 2.4.7 se representa la fracción másica del líquido iónico del punto de mezcla, $[IL]_M$, en los diferentes experimentos para verificar los modelos acerca de la recuperación de este componente. Se comprueba cómo el empleo de evaporación a vacío permite mantener aproximadamente constante el contenido de líquido iónico en el sistema, puesto que permite la recuperación total de este componente, tal y como el modelo predice. Por su parte, el líquido iónico perdido en cada ciclo cuando se recurre a la alternativa basada en la adición de sal extra coincide con la predicha por el modelo (0,72 %). De este modo, tras 6 ciclos, el valor

experimental y teórico de $[IL]_M$ son prácticamente idénticos: 96,3 % frente al 96,4 %, respectivamente.

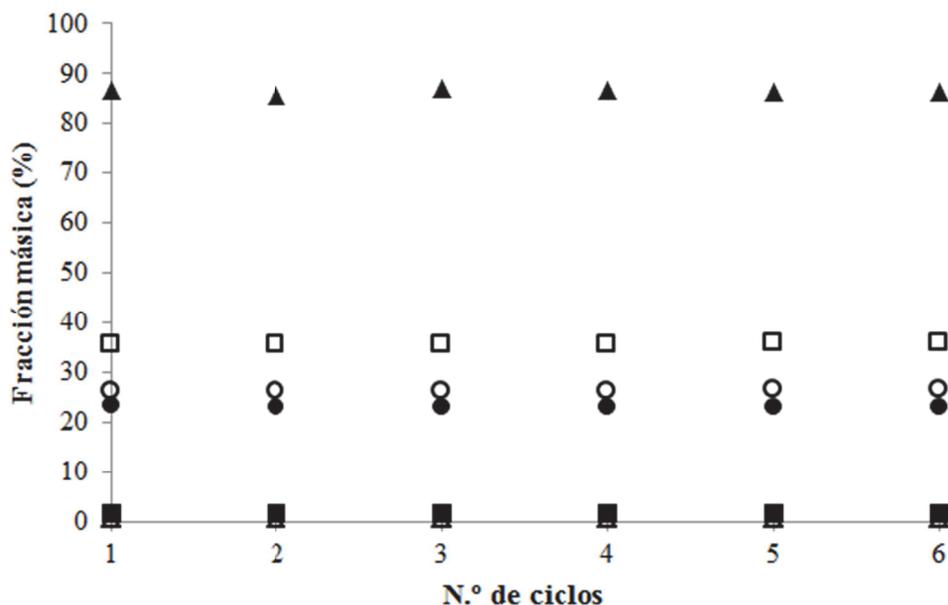


Figura 2.4.8. Evolución de la composición global del sistema y de las fases líquidas cuando se mejora la reutilización del líquido iónico del sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ mediante evaporación a vacío. Notación: (●) $[IL]_M$; (○) $[S]_M$; (▲) $[IL]_{IL}$; (△) $[S]_{IL}$; (■) $[IL]_S$; (□) $[S]_S$.

La figura 2.4.8 muestra las concentraciones de líquido iónico y sal del sistema BmimTfO/NaH₂PO₄ y de sus fases líquidas (la rica en líquido iónico y la rica en sal), cuando se emplea evaporación a vacío para mejorar la recuperación de líquido iónico. Se verifica cómo todas las concentraciones se mantienen constantes durante 6 ciclos, sin precisar de ninguna adición de sal o de líquido iónico. Por consiguiente, se demuestra experimentalmente que es posible que el proceso ILTPP pueda operar sin precisar de un consumo neto de reactivos cuando emplea la recuperación a vacío para recircular el líquido iónico y la sal que constituyen el sistema en que se basa esta técnica.

2.5. Nomenclatura del Capítulo 2

- a actividad del soluto en la fase acuosa
- \bar{a} actividad del soluto en la fase orgánica (líquido iónico)
- a_{IL} parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.2
- a_S parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.4
- A parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.1
- b_{IL} parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.2

b_S	parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.4
B	parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.1
C	parámetro de ajuste de la ecuación 2.3.1
D	coeficiente de reparto entre dos fases líquidas (si tuviese un subíndice, hace referencia al componente cuyo reparto se estudia)
E	eficiencia de extracción cuando se emplean líquidos iónicos hidrofóbicos
I_A	fuerza iónica de la fase de alimentación acuosa A (M)
k	constante cinética del proceso de extracción con líquidos iónicos hidrofóbicos utilizada como parámetro de ajuste de la ecuación 2.1.2 (min^{-1})
IL_S^R	fracción de líquido iónico contenido en la fase rica en sal que se recircula en el proceso ILTPP
m_F	fracción másica de la corriente de alimentación con respecto del total de corrientes de entrada al primer tanque del proceso ILTPP
m_{IL}^A	fracción másica de líquido iónico añadida al primer tanque de separación (para mantener la concentración de líquido iónico constante) con respecto del total de corrientes de entrada a ese primer tanque del proceso ILTPP
m_S^A	fracción másica de sal añadida al primer tanque de separación (para mantener la concentración de sal constante) con respecto del total de corrientes de entrada a ese primer tanque del proceso ILTPP
m_S^E	fracción másica de la fase rica en sal que se evapora en el proceso ILTPP
m_S^{extra}	fracción másica de sal extra añadida al sistema entre el primer y el segundo tanque del proceso con respecto del total de corrientes de entrada al primer tanque del proceso ILTPP
m_S^R	fracción másica de fase rica en sal que se recicla con respecto del total de corrientes de entrada al primer tanque del proceso ILTPP
$M^{X,0}$	masa inicial de la proteína X en el sistema ILTPP (g), donde X puede ser: <ul style="list-style-type: none"> • BSA seroalbúmina bovina • LF lactoferrina
M_i	masa de la fase i del sistema ILTPP (g), donde i puede ser: <ul style="list-style-type: none"> • IL fase rica en líquido iónico • S fase rica en sal
M_i^X	masa de la proteína X en la fase i del sistema ILTPP (g), donde: <ul style="list-style-type: none"> • X puede ser: <ul style="list-style-type: none"> -BSA seroalbúmina bovina -LF lactoferrina • i puede ser:

-I	interfase líquido-líquido
-IL	fase rica en líquido iónico
-S	fase rica en sal
M_M	suma de $M_{M,0}$ y sal extra añadida al sistema en el proceso ILTPP (g s^{-1})
$M_{M,0}$	flujo másico total de las corrientes de entrada al primer tanque de separación del proceso ILTPP (g s^{-1})
M_M^S	masa de sal contenida en el sistema global del proceso ILTPP (g)
M_S^{IL}	masa de líquido iónico contenido en la fase rica en sal del proceso ILTPP (g)
p	presión (MPa)
Q_1	variable auxiliar
Q_2	variable auxiliar
r	parámetro de ajuste de la ecuación 2.1.2 definido de acuerdo a la ecuación 2.1.3
R	fracción del líquido iónico del sistema ILTPP que puede reutilizarse en el proceso ILTPP
RA	variable(s) específica(s) de la etapa adicional para mejorar la recuperación de líquido iónico en el proceso ILTPP
RF	ratio másico de fases líquidas (fase rica en sal entre fase rica en líquido iónico)
$S_{LF/BSA}$	selectividad del proceso hacia la lactoferrina con respecto de la seroalbúmina bovina
T	temperatura (K o °C)
x_i	factores del diseño factorial de experimentos (donde $i=1,2$)
X_i	fracción de la proteína X en la fase i del sistema ILTPP ($\%X_i$ cuando se expresa en porcentaje), donde: <ul style="list-style-type: none"> • X puede ser: <ul style="list-style-type: none"> -BSA seroalbúmina bovina -LF lactoferrina • i puede ser: <ul style="list-style-type: none"> -I interfase líquido-líquido -IL fase rica en líquido iónico -S fase rica en sal
Y_i	variables binarias (donde $i=1,4$)
$[S]_{M,0}$	fracción másica de sal del sistema ILTPP antes de la adición de sal extra para incrementar su concentración y mejorar la recuperación del líquido iónico (m_S^{extra})
$[X]_i$	concentración (medida en mg L^{-1} , mg kg^{-1} o fracción másica, m/m) del componente X en la fase/corriente i , donde: <ul style="list-style-type: none"> • X puede ser: <ul style="list-style-type: none"> -BSA seroalbúmina bovina -IL líquido iónico

-*LF* lactoferrina

-*S* sal

• *i* puede ser:

-*A* fase acuosa

-*A,∞* fase acuosa en el equilibrio (tiempo $t=\infty$)

-*F* alimentación de proteína

-*F,0* alimentación de proteína a tiempo $t=0$

-*F,t* alimentación de proteína a tiempo t cualquiera

-*F,∞* alimentación de proteína en el equilibrio (tiempo $t=\infty$)

-*IL* fase rica en líquido iónico

-*IL,∞* fase de líquido iónico en el equilibrio (tiempo $t=\infty$)

-*M* punto de mezcla (*IL* + *S*)

-*O* fase orgánica (líquido iónico)

-*S* fase rica en sal

Letras griegas

α fracción másica de la fase rica en líquido iónico

β_i coeficientes de los modelos de regresión derivados del diseño factorial de experimentos (donde $i=0,5$)

γ coeficiente de actividad en la fase acuosa

$\bar{\gamma}$ coeficiente de actividad en la fase orgánica

μ viscosidad dinámica (Pa s)

ρ densidad (kg m^{-3})

σ conductividad eléctrica (S m^{-1})

$1-\alpha$ fracción másica de la fase rica en sal

2.6. Referencias del Capítulo 2

Absalan G., Akhond M., Sheikhan L., Partitioning of acidic, basic and neutral amino acids into imidazolium-based ionic liquids, *Amino Acids* **2010**, 39, 167-174.

Adam V., Zitka O., Dolezal P., Zeman L., Horna A., Hubalek J., Sileny J., Krizkova S., Trnkova L., Kizek R., Lactoferrin isolation using monolithic column coupled with spectrometric or micro-amperometric detector, *Sensors* **2008**, 8, 464-487.

Alvarez-Guerra M., Irabien A., Design of ionic liquids: An ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach, *Green Chem.* **2011**, 13, 1507-1516.

Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 98, 432-440.

Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Sep. Sci. Technol.* **2014a**, 49, 957-965.

Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014b**, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/jctb.4401.

Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilibr.* **2014a**, 371, 67-74.

Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE J.* **2014b**, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/aic.14530.

Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.

Branco L.C., Crespo J.G., Afonso C.A.M., Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as novel supported liquid membranes, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 3865-3871.

Çalci E., Demir T., Çelem E.B., Önal S., Purification of tomato (*Lycopersicon esculentum*) α -galactosidase by three-phase partitioning and its characterization, *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 70, 123-127.

Cheng D.H., Chen X.W., Shu Y., Wang J.H., Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF₆), *Talanta* **2008a**, 75, 1270-1278.

Cheng D.H., Chen X.W., Shu Y., Wang J.H., Selective extraction of cytochrome C by ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate, *China J. Anal. Chem.*, **2008b**, 36, 1187-1190.

Deng Y., Long T., Zhang D., Chen J., Gan S., Phase diagram of [Amim]Cl + salt aqueous biphasic systems and its application for [Amim]Cl recovery, *J. Chem. Eng. Data* **2009**, 54, 2470-2473.

Dennison C., Lovrien R., Three phase partitioning: Concentration and purification of proteins, *Protein Expr. Purif.* **1997**, 11, 149-161.

Domínguez-Pérez M., Tomé L.I.N., Freire M.G., Marrucho I.M., Cabeza O., Coutinho J.A.P., (Extraction of biomolecules using) aqueous biphasic systems formed by ionic liquids and aminoacids, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 72, 85-91.

Dreyer S., Kragl U., Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, 41, 1416-1424.

Dreyer S., Salim P., Kragl U., Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system, *Biochem. Eng. J.* **2009**, 46, 176-185.

Du Z., Yu Y.L., Wang J.H., Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system, *Chem. – Eur. J.* **2007**, 13, 2130-2137.

Eugster E., Jakob E., Wechsler D., Cheese, processed cheese, and whey, en: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, *John Wiley & Sons, Inc., Weinheim, Alemania*, **2012**.

Fortunato R., González-Muñoz M.J., Kubasiewicz M., Luque S., Alvarez J.R., Afonso C.A.M., Coelho I.M., Crespo J.G., Liquid membranes using ionic liquids: the influence of water on solute transport, *J. Membr. Sci.* **2005**, 249, 153-162.

Franks F., Conformational stability of proteins, en: Franks F. (ed.), Protein Biotechnology: Isolation, Characterization, and Stabilization, *The Humana Press Inc., Totowa, EE.UU.*, **1993**, 395-436.

Freire M.G., Neves C.M.S.S., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Fernandes A.M., Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids, *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 3744-3749.

Freire M.G., Cláudio A.F.M., Araújo J.M.M., Coutinho J.A.P., Marrucho I.M., Lopes J.N.C., Rebelo L.P.N., Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 4966-4995.

Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G., Barone G., DSC studies on bovine serum albumin denaturation effects of ionic strength and SDS concentration, *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, 20, 193-204.

Han J., Wang Y., Yu C.L., Yan Y.S., Xie X.Q., Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1295-1304.

Heebøll-Nielsen A., Justesen S.F.L., Høbley T.J., Thomas O.R.T., Superparamagnetic cation-exchange adsorbents for bioproduct recovery from crude process liquors by high-gradient magnetic fishing, *Sep. Sci. Technol.* **2004**, 39, 2891-2914.

Jiang Y., Xia H., Guo C., Mahmood I., Liu H., Enzymatic hydrolysis of penicillin in mixed ionic liquids/water two-phase system, *Biotechnol. Prog.* **2007a**, 23, 829-835.

Jiang Y., Xia H., Guo C., Mahmood I., Liu H., Phenomena and mechanism for separation and recovery of penicillin in ionic liquids aqueous solution, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007b**, 46, 6303-6312

Kawakami H., Tanaka M., Tatsumi K., Dosako S., Effects of ionic strength and pH on the thermostability of lactoferrin, *Int. Dairy J.* **1992**, 2, 287-298.

Kiss E., Szamos J., Tamás B., Borbás R., Interfacial behavior of proteins in three-phase partitioning using salt-containing water/tert-butanol systems, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* **1998**, 142, 295-302.

Kumar V.V., Sathyaselvabala V., Kirupha S.D., Murugesan A., Vidyadevi T., Sivanesan S., Application of response surface methodology to optimize three phase partitioning for purification of laccase from *Pleurotus ostreatus*, *Sep. Sci. Technol.* **2011**, 46, 1922-1930.

Larriba M., Navarro P., García J., Rodríguez F., Liquid-liquid extraction of toluene from heptane using [emim][DCA], [bmim][DCA], and [emim][TCM] ionic liquids, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, 52, 2714-2720.

Li C., Han J., Wang Y., Yan Y., Pan J., Xu X., Zhang Z., Phase behavior for the aqueous two-phase systems containing the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and kosmotropic salts, *J. Chem. Eng. Data* **2010a**, 55, 1087-1092.

Li Z., Pei Y., Liu L., Wang J., (Liquid + liquid) equilibria for (acetate-based ionic liquids + inorganic salts) aqueous two-phase systems, *J. Chem. Thermodyn.* **2010b**, 42, 932-937.

Liu Q., Yu J., Li W., Hu X., Xia H., Liu H., Yang P., Partitioning behavior of penicillin G in aqueous two phase system formed by ionic liquids and phosphate, *Sep. Sci. Technol.* **2006**, 41, 2849-2858.

Lu Y., Lu W., Wang W., Guo Q., Yang Y., Thermodynamic studies of partitioning behavior of cytochrome c in ionic liquid-based aqueous two-phase system, *Talanta* **2011**, 85, 1621-1626.

Marcelo P.A., Rizvi S.S.H., Applications of Membrane Technology in the Dairy Industry, en: Pabby A.K., Rizvi S.S.H., Sastre A.M. (eds.), Handbook of Membrane Separations. Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications, *CRC Press*, Boca Raton, EE.UU., **2009**, 635-669.

Merchuk J.C., Andrews B.A., Asenjo J.A., Aqueous two-phase systems for protein separation studies on phase inversion, *J. Chromatogr. B* **1998**, 711, 285-293.

Montgomery D.C., Design and Analysis of Experiments, 4th ed., *John Wiley & Sons, Inc.*, Nueva York, EE.UU., **1997**.

- Mota I., Rodrigues Pinto P.C., Novo C., Sousa G., Guerreiro O., Guerra A.R., Duarte M.F., Rodrigues A.E., Extraction of polyphenolic compounds from *Eucalyptus globulus* bark: Process optimization and screening for biological activity, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2012**, 51, 6991-7000.
- Mourão T., Cláudio A.F.M., Boal-Palheiros I., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Evaluation of the impact of phosphate salts on the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Chem. Thermodyn.* **2012**, 54, 398-405.
- Müller A., Górak A., Extraction of 1,3-propanediol from aqueous solutions using different ionic liquid-based aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 130-136.
- Ndiaye N., Pouliot Y., Saucier L., Beaulieu L., Bazinet L., Electroseparation of bovine lactoferrin from model and whey solutions, *Sep. Purif. Technol.* **2010**, 74, 93-99.
- Neves C.M.S.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Improved recovery of ionic liquids from contaminated aqueous streams using aluminium-based salts, *RSC Adv.* **2012**, 2, 10882-10890.
- Novak U., Pohar A., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction within a microchannel system, *Sep. Purif. Technol.* **2012**, 97, 172-178.
- Nyström M., Aimar P., Luque S., Kulovaara M., Metsämuuronen S., Fractionation of model proteins using their physicochemical properties, *Colloids Surf., A* **1998**, 138, 185-205.
- Pei Y., Wang J., Wu K., Xuan X., Lu X., Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins, *Sep. Purif. Technol.* **2009**, 64, 288-295.
- Pei Y., Li Z., Liu L., Wang J., Wang H., Selective separation of protein and saccharides by ionic liquids aqueous two-phase systems, *Sci. China Chem.* **2010**, 53, 1554-1560.
- Pei Y., Li L., Li Z., Wu C., Wang J., Partitioning Behavior of Wastewater Proteins in Some Ionic Liquids-Based Aqueous Two-Phase Systems, *Sep. Sci. Technol.* **2012**, 72, 85-91.
- Peinado I., Lesmes U., Andrés A., McClements J.D., Fabrication and morphological characterization of biopolymer particles formed by electrostatic complexation of heat treated lactoferrin and anionic polysaccharides, *Langmuir* **2010**, 26, 9827-9834.
- Rabiller-Baudry M., Chaufer B., Lucas D., Michel F., Ultrafiltration of mixed protein solutions of lysozyme and lactoferrin: role of modified inorganic membranes and ionic strength on the selectivity, *J. Membr. Sci.* **2001**, 184, 137-148.
- Shahriari S., Neves C.M.S.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Role of the Hofmeister series in the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 7252-7258.
- Shimojo K., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., Crown ether-mediated extraction and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2-5.

Sreedhara A., Flengsrud R., Langsrud T., Kaul P., Prakash V., Vegarud G.E., Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins, *Biomaterials* **2010a**, 23, 1159-1170.

Sreedhara A., Flengsrud R., Prakash V., Krowarsch D., Langsrud T., Kaul P., Devold T.G., Vegarud G.E., A comparison of effects of pH on the thermal stability and conformation of caprine and bovine lactoferrin, *Int. Dairy J.* **2010b**, 20, 487-494.

Tan Z.J., Li F.F., Xu X.L., Xing J.M., Simultaneous extraction and purification of aloe polysaccharides and proteins using ionic liquid based aqueous two-phase system coupled with dialysis membrane, *Desalination* **2012a**, 286, 389-393.

Tan Z., Li F., Xu X., Isolation and purification of aloe anthraquinones based on an ionic liquid/salt aqueous two-phase system, *Sep. Purif. Technol.* **2012b**, 98, 150-157.

Ventura S.P.M., Sousa S.G., Serafim L.S., Lima A.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Ionic liquid based aqueous biphasic systems with controlled pH: The ionic liquid cation effect, *J. Chem. Eng. Data* **2011**, 56, 4253-4260.

Ventura S.P.M., Sousa S.G., Serafim L.S., Lima A.S., Freire M.G., Coutinho J.A.P., Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems with controlled pH: The ionic liquid anion effect, *J. Chem. Eng. Data* **2012**, 57, 507-512.

Wang J., Pei Y., Zhao Y., Hu Z., Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media, *Green Chem.* **2005**, 7, 196-202.

Wang Y., Han J., Xie X., Li C., Extraction of trace acetylspiramycin in real aqueous environments using aqueous two-phase system of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and phosphate, *Cent. Eur. J. Chem.* **2010**, 8, 1185-1191.

Wu B., Zhang Y., Wang H., Phase behavior for ternary systems composed of ionic liquid + saccharides + water, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 6426-6429.

Yan-Ying Y., Wei Z., Shu-Wen C., Extraction of ferulic acid and caffeic acid with ionic liquids, *China J. Anal. Chem.* **2007**, 35, 1726-1730.

Zhao H., Jones C.L., Cowins J.V., Lipase dissolution and stabilization in ether-functionalized ionic liquids, *Green Chem.* **2009**, 11, 1128-1138.

Zydney A.L., Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation, *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 243-250.

3 Conclusiones

Conclusions

«caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.»

Prof. Antonio Machado (1875-1939)

Poeta español

CAPÍTULO 3. CONCLUSIONES

3.1. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a lo largo de la presente tesis doctoral han sido difundidas en revistas científicas incluidas en el *Journal of Citation Reports-Science Edition (JCR)*. Las publicaciones se listan a continuación indicando el índice de impacto para 2012 así como el cuartil de la revista dentro de la categoría de Ingeniería Química, disponibles en la plataforma *ISI Web of Knowledge*.

1. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Separation and Purification Technology*, **2012**, 98, 432-440. Índice de impacto: 2,894. Primer cuartil (Q1).
2. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Separation Science and Technology*, **2014**, 49, 957-965. Índice de impacto: 1,164. Segundo cuartil (Q2).
3. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **aceptado (en prensa)**, DOI: 10.1002/jctb.4401. Índice de impacto: 2,504. Primer cuartil (Q1).
4. **Alvarez-Guerra E.**, Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilibria*, **2014**, 371, 67-74. Índice de impacto: 2,379. Primer cuartil (Q1).
5. **Alvarez-Guerra E.**, Ventura S.P.M., Coutinho, J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE Journal*, **aceptado (en prensa)**, DOI: 10.1002/aic.14530. Índice de impacto: 2,493. Primer cuartil (Q1).

Las principales conclusiones extraídas de este trabajo son las siguientes:

- 1) El empleo de **líquidos iónicos hidrofóbicos de base imidazolio permite extraer la lactoferrina con eficiencias de hasta el 20 % y elevada selectividad (9)** con respecto de la seroalbúmina bovina. Las condiciones experimentales que proporcionan los mejores resultados son pH neutro, baja fuerza iónica y baja concentración de proteína. Estos resultados pueden explicarse por la importancia de las interacciones

entre los átomos de hierro de la lactoferrina y el catión de base imidazolio del líquido iónico.

Sin embargo, la **imposibilidad de reextraer la proteína** hace que esta aproximación basada en líquidos iónicos hidrofóbicos **no permita desarrollar un proceso para la recuperación de la proteína de interés**, a pesar de ser esta la aproximación más sencilla para su diseño y operación, así como contar con resultados prometedores en la etapa de extracción.

2) Se ha desarrollado una nueva técnica para la recuperación de proteínas denominada reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (*Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning, ILTPP*). Esta técnica ILTPP emplea los mismos sistemas líquido iónico/sal que los sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos (*Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems, ILATPS*), obteniendo resultados que son característicos de la técnica de reparto en tres fases (*Three Phase Partitioning, TPP*), es decir, la(s) proteína(s) de interés se acumula(n) en la interfase líquido-líquido facilitando su recuperación y evitando así la etapa de reextracción.

La técnica ILTPP **se ha descrito por primera vez para el sistema $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, con el que se consigue recuperar la mayor parte de la lactoferrina (74-99 %) en la interfase líquido-líquido**. La concentración de sal del sistema es la variable de mayor influencia en la distribución de la proteína, si bien esta también depende de la concentración de líquido iónico y de la temperatura.

3) El sistema líquido iónico/sal basado en BmimTfO y NaH_2PO_4 se identifica como el más adecuado para llevar a cabo la técnica ILTPP, puesto que proporciona resultados de recuperación de lactoferrina en la interfase líquido-líquido competitivos (83-99 %) a la vez que no presenta problemas de estabilidad en contacto con agua. Con este sistema, las mayores tasas de recuperación de lactoferrina se obtienen a condiciones moderadamente ácidas ($\text{pH}=3,1-4,0$) y a concentraciones de proteína relativamente bajas.

La selectividad de la técnica ILTPP hacia la lactoferrina con respecto a la seroalbúmina bovina varía entre 1 y 3 en función del pH y la concentración de proteína, por lo que la **ILTPP puede aplicarse para recuperar tanto proteínas específicas (p. ej. lactoferrina) como grupos de ellas**, dependiendo de las condiciones de operación.

4) Los sistemas ILTPP de interés se han caracterizado a través de sus propiedades de mayor importancia para el proceso, así como a través de la descripción de su equilibrio termodinámico. De este modo, **la fracción de líquido iónico que no puede recircularse en el proceso varía entre el 0,8 y el 5 %**, dependiendo estas pérdidas fundamentalmente de la concentración de proteína en

la corriente de alimentación. Así, cuanto mayor sea esta concentración, menor es la fracción de líquido iónico que no puede reutilizarse.

5) Se ha analizado la incorporación al proceso ILTPP de una etapa adicional de recuperación de líquido iónico para reducir las pérdidas de este valioso componente. Para ello, se han considerado dos alternativas: incrementar el contenido en sal del sistema y evaporar parte del agua contenida en la fase rica en sal. Si bien la primera alternativa se ha propuesto en la literatura para mejorar la recuperación del líquido iónico, **se ha demostrado cómo restricciones del proceso hacen que el incremento del contenido en sal tenga una eficacia limitada y, en ciertas condiciones, pueda conducir a un incremento de las pérdidas de líquido iónico.** Por el contrario, **la evaporación de agua de la fase rica en sal permite la recuperación total del líquido iónico y de la sal para la gran mayoría de condiciones de operación,** lo que permite concluir que **el proceso ILTPP no precisa de un consumo neto de reactivos.**

3.2. Progreso de la investigación

En relación con los resultados de la presente tesis doctoral, se consideran relevantes las siguientes líneas para el progreso científico-técnico futuro:

- 1) Aplicación del proceso ILTPP a sistemas reales complejos que contengan proteínas, como el lactosuero bovino.** De esta forma, se analizará la posible influencia que la presencia simultánea de otras proteínas, así como de otro tipo de biomoléculas como la lactosa, puede tener en la recuperación de la proteína de interés (p. ej. lactoferrina) y en la selectividad del proceso.
- 2) Búsqueda de sistemas ILTPP alternativos que estén autorizados o sean especialmente adecuados para procesar productos destinados a aplicaciones alimentarias.** Si bien el sistema ILTPP basado en el líquido iónico BmimTfO presenta una toxicidad menor a la de otros sistemas y otros disolventes orgánicos convencionales, dado que la mayoría de aplicaciones de la lactoferrina implica su administración por vía oral, es conveniente encontrar líquidos iónicos con similar desempeño que el BmimTfO y con la menor toxicidad posible (p. ej., líquidos iónicos de base colina).
- 3) Estudio de la estructura de las moléculas de proteína recuperadas mediante ILTPP.** Puesto que dependiendo de las condiciones experimentales se observa que en ocasiones la proteína recuperada no podía redisolverse por completo, lo que sugiere que pueden tener lugar cambios conformacionales en la misma, se considera oportuno

realizar el análisis de su estructura. No obstante, dado que la mayoría de las aplicaciones de la lactoferrina son por vía oral, debe tenerse presente que su desnaturalización debida a las condiciones ácidas del estómago es probable y que, en todo caso, para su absorción intestinal las proteínas son hidrolizadas hasta aminoácidos o dipéptidos.

CHAPTER 3. CONCLUSIONS

3.1. Conclusions

The conclusions obtained during this PhD thesis have been reported in scientific journals included in the *Journal of Citation Reports-Science Edition (JCR)*. The publications are listed below, showing the impact factors for 2012 and the quartile of the journals in the category of Chemical Engineering that are available in *ISI Web of Knowledge* platform.

1. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Separation and Purification Technology*, **2012**, 98, 432-440. Impact factor: 2.894. First quartile (Q1).
2. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Separation Science and Technology*, **2014**, 49, 957-965. Impact factor: 1.164. Second quartile (Q2).
3. **Alvarez-Guerra E.**, Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **accepted (in press)**, DOI: 10.1002/jctb.4401. Impact factor: 2.504. First quartile (Q1).
4. **Alvarez-Guerra E.**, Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilibria*, **2014**, 371, 67-74. Impact factor: 2.379. First quartile (Q1).
5. **Alvarez-Guerra E.**, Ventura S.P.M., Coutinho, J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE Journal*, **accepted (in press)**, DOI: 10.1002/aic.14530. Impact factor: 2.493. First quartile (Q1).

The main conclusions derived from this work are:

- 1) **The use of hydrophobic imidazolium-based ionic liquids allows the extraction of lactoferrin with efficiencies up to 20 % and high selectivity (9)** with respect to bovine serum albumin. The experimental conditions that lead to the best results are neutral pH, low ionic strength and low protein concentration. These results may be explained in terms of the importance of the interaction between iron atoms of the lactoferrin and the imidazolium-based cation of the ionic liquid.

However, the **impossibility of achieving the protein back-extraction** determines that **a process based on hydrophobic ionic liquids to recover the protein of interest cannot be developed**, even though it is a simple approach for its design and operation, and it provides promising results in the extraction step.

2) A novel technique for protein recovery called Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) has been developed. This ILTPP technique uses the same ionic liquid/salt systems as Ionic Liquid-based Aqueous Two Phase Systems (ILATPS) to obtain results that are characteristic of Three Phase Partitioning (TPP), that is, the protein(s) of interest is (are) accumulated at the liquid-liquid interface making its (their) recovery easier and avoiding in this way the back-extraction step.

The ILTPP technique **has been reported for the first time for the BmimBF₄/NaH₂PO₄ system, with which most of lactoferrin (74-99 %) is recovered at the liquid-liquid interface.** The salt concentration of the system resulted to be the variable with the highest influence on the protein distribution, although it also depends on the ionic liquid concentration and temperature.

3) The ionic liquid/salt system based on BmimTfO and NaH₂PO₄ is identified as the most suitable system to carry out the ILTPP technique, since it combines competitive results in terms of lactoferrin recoveries at liquid-liquid interface (83-99 %) and chemical stability when it is in contact with water. With this system, the highest lactoferrin recoveries occur at moderate acidic pH (3.1-4.0) and relatively low protein concentrations.

The selectivity of the ILTPP technique towards lactoferrin with respect to bovine serum albumin varies between 1 and 3 depending on the pH and the protein concentration, so **ILTPP can be applied to recover specific proteins (e.g. lactoferrin) or groups of them,** depending on operating conditions.

4) The ILTPP systems of interest have been characterized by means of their properties that are relevant for the process, and their thermodynamic equilibria have been described. In this way, **the fraction of ionic liquid which cannot be recycled in the process varies between 0.8 and 5 %,** depending mainly on the protein concentration in the feed stream. The higher this protein concentration, the lower the ionic liquid fraction that cannot be reused.

5) Additional steps to recover the ionic liquid have been assessed to introduce them in the ILTPP process in order to reduce the losses of this valuable component. For this purpose, two alternatives have been considered: an increase in the salt content of the system and evaporation of part of the water present in the salt-rich phase. Even though the first alternative has been proposed in the literature to enhance the ionic

liquid recovery, **it has been demonstrated that process constraints limit its effectiveness and, under several conditions, it may cause an increase in the ionic liquid losses.** In contrast, **water evaporation from the salt-rich phase allows the total recovery of both the ionic liquid and the salt under almost all the experimental conditions,** which may allow concluding that **the ILTPP process does not require any net reagent consumption.**

3.2. On-going research

Based on the results reported in this PhD thesis, the following relevant lines are considered for the future scientific-technical progress:

- 1) Application of the ILTPP process to real, complex systems that contain proteins, such as bovine whey.** In this sense, the possible influence of the simultaneous presence of other proteins and other types of biomolecules, such as lactose, on the recovery of proteins of interest (e.g. lactoferrin) and on the process selectivity will be assessed.
- 2) Search of alternative ILTPP systems that are authorized or especially suitable for processing products to be used in food applications.** Even though the ILTPP system based on BmimTfO shows a lower toxicity than other systems and other conventional organic solvents, considering that most of lactoferrin applications imply its oral administration, the use of ionic liquids that present similar results as BmimTfO with lower toxicity (e.g. choline-based ionic liquids) is highly desirable.
- 3) Study of the structure of protein molecules recovered by means of ILTPP.** Considering that depending on the experimental conditions the recovered protein may not be completely redissolved, which suggests that conformational changes can occur, this protein structural analysis should be carried out. Nevertheless, since most of lactoferrin applications are based on oral administration, it should be noted that the denaturation of this protein is probable due to the acidic conditions of the stomach and, anyway, proteins must be hydrolyzed into amino acids or dipeptides so that they can be absorbed in the intestine.

4 Artículos científicos

Scientific articles

«Necio es, muy necio, el que, descubriendo un secreto a otro,
le pide encarecidamente que lo calle»

D. Miguel de Cervantes (1547-1616)
a través de D. Quijote de la Mancha

Novelista español

CAPÍTULO 4. Artículos científicos / CHAPTER 4. Scientific articles**4.1. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**Resumen

La lactoferrina es una proteína de alto valor añadido que se encuentra en el lactosuero bovino. Este trabajo presenta el estudio de la extracción de lactoferrina con líquidos iónicos de base imidazolio como un nuevo proceso de separación que puede permitir superar las limitaciones asociadas a las técnicas convencionales de separación y purificación de esta proteína (p.ej. cromatografía). Se utiliza para ello una configuración de membrana "bulk" basada en el empleo de tubos en U. Se consiguen eficiencias de extracción de lactoferrina de hasta el 20 %. A pesar de las menores eficiencias obtenidas con la bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimNTf₂), se prefiere este líquido iónico al hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimPF₆), dado que el primero es más estable y menos soluble en agua. Las condiciones experimentales que proporcionan mayores eficiencias de extracción son bajas concentraciones de proteína (100 mg L⁻¹), pH neutro (6,4-8,2) y baja fuerza iónica (0,03 M). BmimNTf₂ es selectivo hacia la lactoferrina respecto de la seroalbúmina bovina (BSA), puesto que la cantidad de BSA extraída es un orden de magnitud inferior. Sin embargo, no se observó la reextracción de la proteína del líquido iónico. En conclusión, se puede extraer lactoferrina de forma selectiva mediante líquidos iónicos hidrofóbicos de base imidazolio, lo que puede deberse a la interacción de estos con los átomos de hierro de la proteína. El coeficiente de reparto entre la fase orgánica y la acuosa depende principalmente de la concentración de proteína en la fase orgánica (exponente -2,8), exhibiendo una ligera influencia de la concentración en la fase acuosa.

Original abstract

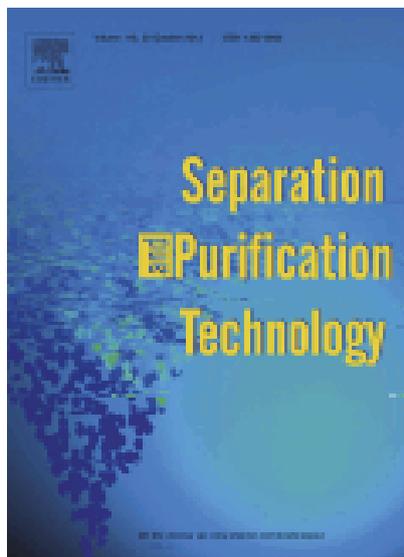
Lactoferrin is a high-added value protein that is contained in bovine whey. This work presents the study of lactoferrin extraction with imidazolium-based ionic liquids as a novel separation process that can overcome constraints associated with conventional techniques used to separate and purify this protein (e.g. chromatography). A bulk membrane configuration based on U-shaped tubes is used as an experimental set-up. Lactoferrin extraction efficiencies of up to 20 % are achieved. Despite the lower efficiencies obtained with 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide (BmimNTf₂), this ionic liquid is preferred to 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate (BmimPF₆) because the former is more stable and less soluble in water. Low protein concentration (100 mg L⁻¹), neutral pH (6.4–8.2)

and low ionic strength (0.03 M) are the experimental conditions with highest extraction efficiencies. BmimNTf₂ is selective towards lactoferrin with respect to bovine serum albumin (BSA), since the amount of BSA extracted is almost one order of magnitude lower. However, back-extraction of protein from the ionic liquid was not observed. In conclusion, hydrophobic, imidazolium-based ionic liquids are able to extract lactoferrin selectively, which may be due to their interaction with iron atoms of this protein. The distribution coefficient between the organic and aqueous phase depends mainly on the concentration of protein in the organic phase (exponent -2.8), showing a slight influence on the aqueous phase concentration.

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

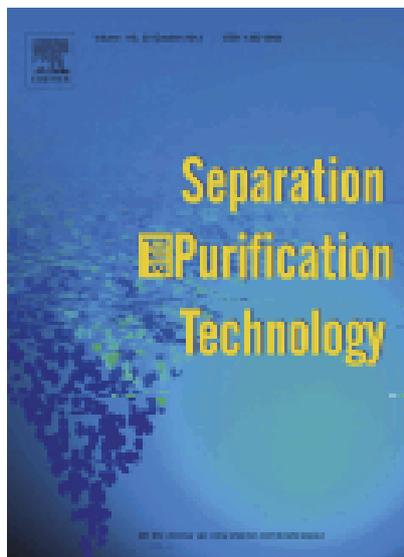
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

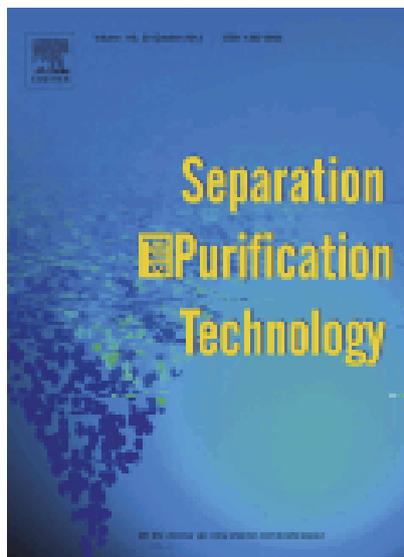
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

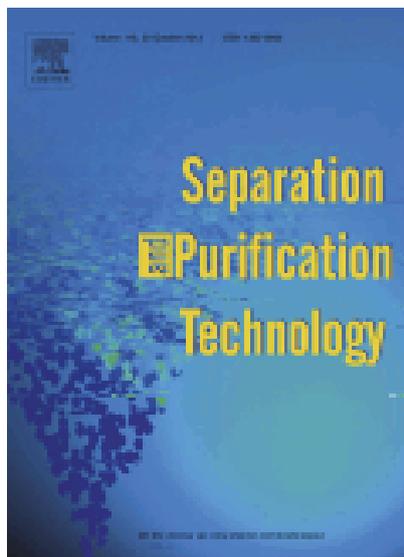
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

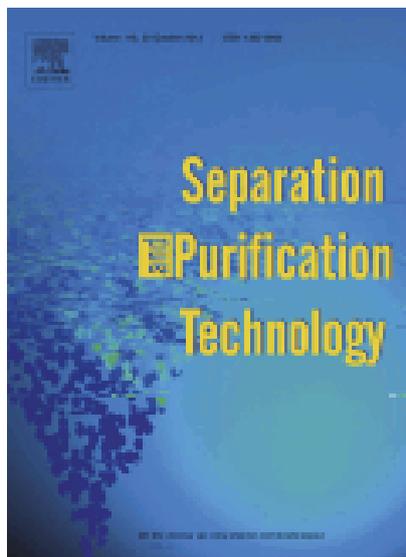
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

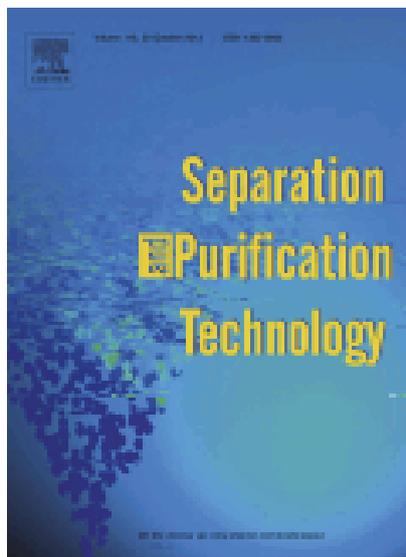
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

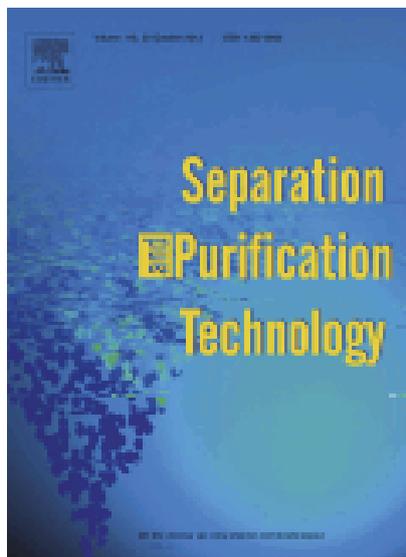
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

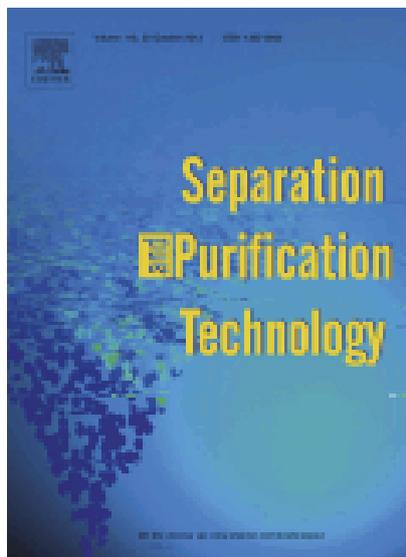
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

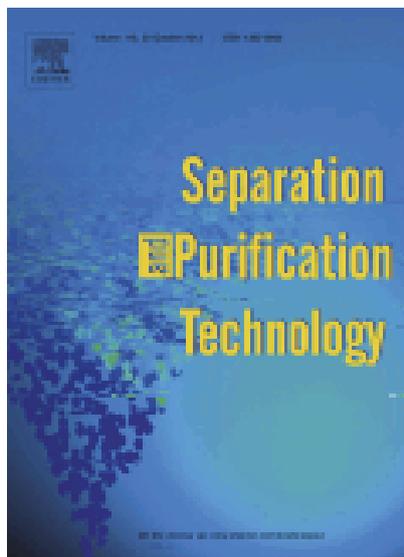
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Purif. Technol.*, 2012, 98, 432-440.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation and Purification Technology*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612004406>

4.2. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, *Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.Resumen

En este trabajo se presenta una técnica novedosa denominada reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP en su acrónimo inglés: *ionic liquid-based three phase partitioning*) que combina las interesantes propiedades de los líquidos iónicos como extractantes y las ventajas del reparto en la interfase para recuperar proteínas. El sistema ternario $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ se utiliza para acumular lactoferrina (una proteína del lactosuero bovino con importantes propiedades nutraceuticas) en la interfase líquido-líquido. Entre el 74 % y el 99 % de la lactoferrina se recupera en la interfase, dependiendo de la temperatura, el contenido en líquido iónico y, especialmente, la concentración de sal. En consecuencia, ILTPP puede verse como una técnica prometedora que permita superar las limitaciones de las técnicas convencionales para recuperar lactoferrina.

Original abstract

A novel technique called ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) that combines the interesting properties of ionic liquids as extracting solvents and the advantages of interfacial partitioning for protein recovery is presented in this work. The ternary system $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ is used to accumulate lactoferrin (a bovine whey protein with important nutraceutical properties) at the liquid-liquid interface. Between 74 % and 99 % of the lactoferrin is recovered at the interface, depending on the temperature, the ionic liquid content, and, especially, the salt concentration. Consequently, ILTPP can be seen as a promising technique that may overcome the drawbacks of conventional techniques to recover lactoferrin.

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***Sep. Sci. Technol.*, 2014, 49, 957-965.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Separation Science and Technology*.

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2013.878722#.U8VUqO-KA5g>

4.3. Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/jctb.4401.

Resumen

ANTECEDENTES: La técnica de reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP en su acrónimo inglés: *ionic liquid-based three phase partitioning*) es una alternativa prometedora a las tecnologías convencionales para separar y purificar proteínas puesto que permite la recuperación de la proteína en la interfase líquido-líquido. En un trabajo previo, se ha desarrollado la ILTPP con el sistema $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ para recuperar lactoferrina, una proteína del lactosuero bovino con importantes propiedades nutraceuticas. Sin embargo, BmimBF_4 puede sufrir hidrólisis cuando está en contacto con agua, por lo que debería seleccionarse un líquido iónico alternativo con resultados similares en relación a la recuperación de lactoferrina.

RESULTADOS: El sistema basado en BmimTfO y fosfato se selecciona como el más adecuado al combinar recuperaciones de lactoferrina relativamente elevadas en la interfase líquido-líquido (83-99 %) con estabilidad química. Las mayores recuperaciones de lactoferrina tienen lugar a pH moderadamente ácidos (3,1-4,0), que incluso pueden mejorarse a concentraciones de proteína relativamente bajas. La selectividad del proceso con respecto de la seroalbúmina bovina (otra proteína del lactosuero) varía entre 1,1 y 3,0, dependiendo de las condiciones experimentales.

CONCLUSIONES: ILTPP es una técnica prometedora para recuperar la fracción proteica del lactosuero bovino o para enriquecer proteínas específicas como la lactoferrina, por lo que ILTPP podría reemplazar a las técnicas alternativas como las basadas en membranas. El riesgo de hidrólisis asociado al líquido iónico de sistemas ILTPP previos se ha superado de forma satisfactoria.

Original abstract

BACKGROUND: The ionic liquid three phase partitioning (ILTPP) technique is a promising alternative to conventional processing technologies for protein separation and purification since it allows protein recovery at the liquid-liquid interface. In previous work, ILTPP has been developed with the $\text{BmimBF}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ system for lactoferrin recovery, a bovine whey protein with important nutraceutical properties. However, BmimBF_4 may suffer from hydrolysis when it is in contact with water, so the selection of an alternative ionic liquid with similar results regarding lactoferrin recovery should be sought.

RESULTS: The system based on BmimTfO and phosphate is selected as the most suitable since it combines relatively high lactoferrin recoveries at the liquid–liquid interface (83–99 %) and chemical stability. The highest lactoferrin recoveries occur at moderate acidic pH (3.1–4.0), which may also be improved at relatively low protein concentrations. The process selectivity with respect to bovine serum albumin (another whey protein) varies from 1.1 to 3.0, depending on experimental conditions.

CONCLUSION: ILTPP is a promising technique to recover the protein fraction from bovine whey or to enrich specific proteins such as lactoferrin, so ILTPP could replace alternative techniques such as membranes. The risk of hydrolysis associated with previous ionic liquid ILTPP systems has been successfully overcome.

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irbien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection

E. Alvarez-Guerra, A. Irabien

***J. Chem. Technol. Biotechnol.*, in press, DOI: 10.1002/jctb.4401.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4401/abstract>

4.4. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, *Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.

Resumen

El reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP en su acrónimo inglés: *ionic liquid-based three phase partitioning*) es una técnica prometedora para recuperar lactoferrina, una proteína del lactosuero de alto valor añadido, porque combina las ventajas asociadas al empleo de líquidos iónicos con la posibilidad de recuperar el producto característico del reparto en tres fases. El reciclado del líquido iónico es esencial para la viabilidad y desarrollo de la técnica ILTPP, debido al elevado coste y al impacto medioambiental asociado con la descarga de este tipo de compuestos. Para este propósito, la caracterización termodinámica de los sistemas de interés para la ILTPP, que están basados en el empleo de trifluorometanosulfonato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimTfO) y dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4), se realiza para determinar la composición de las fases líquidas en el equilibrio y el coeficiente de reparto entre las mismas. Adicionalmente, se ha evaluado la fracción de líquido iónico que no puede reutilizarse en el proceso ILTPP, concluyendo que la reciclabilidad de este compuesto es altamente dependiente de la concentración de proteína en la corriente de alimentación. Para concentraciones de proteína elevadas (2 g L^{-1}) y eficiencias moderadas de ILTPP (en torno al 80 %), es posible reciclar más del 99 % del líquido iónico, lo que mejora tanto el perfil económico como medioambiental del proceso ILTPP.

Original abstract

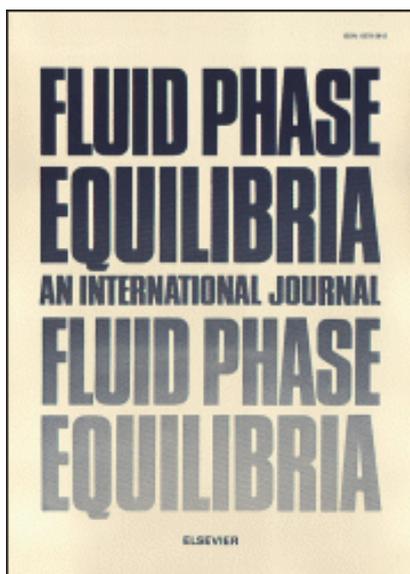
Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) is a promising technique to recover lactoferrin, a high-added value whey protein, because it combines the advantages associated with the use of ionic liquids and the feasibility of the product recovery characteristic of three phase partitioning. The recyclability of the ionic liquid is essential for the feasibility and development of ILTPP technique, due to the high cost and environmental impact associated with the discharge of this type of compounds. For this purpose, the thermodynamic characterization of the systems of interest for ILTPP, which are based on the use of 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate (BmimTfO) and sodium dihydrogenophosphate (NaH_2PO_4), is here performed to determine the composition of the liquid phases in equilibrium and the distribution coefficient between them. In addition, the fraction of ionic liquid that cannot be reused in the ILTPP process has been assessed, concluding that the recyclability of this compound is highly dependent on the protein concentration in the feed stream. At high protein concentrations (2 g L^{-1}) and moderate ILTPP efficiencies (around 80 %) it is possible to

recycle more than 99 % of the ionic liquid, which improves both the economic and environmental performance of the ILTPP process.

**Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP)
systems: Ionic liquid recovery and recycling**

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

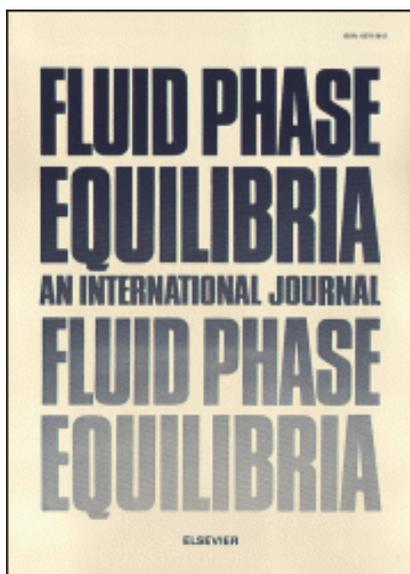
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

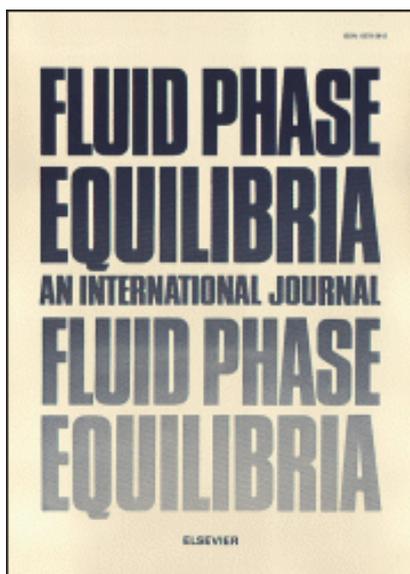
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

**Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP)
systems: Ionic liquid recovery and recycling**

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

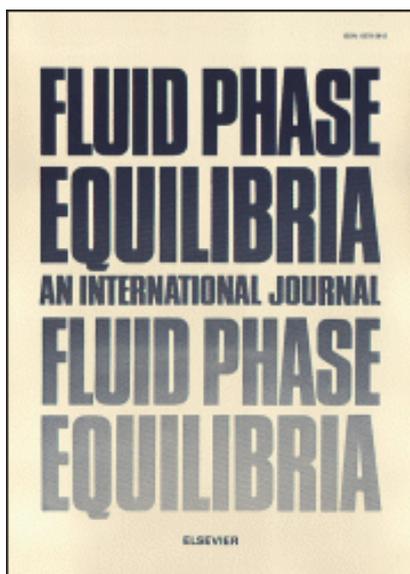
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

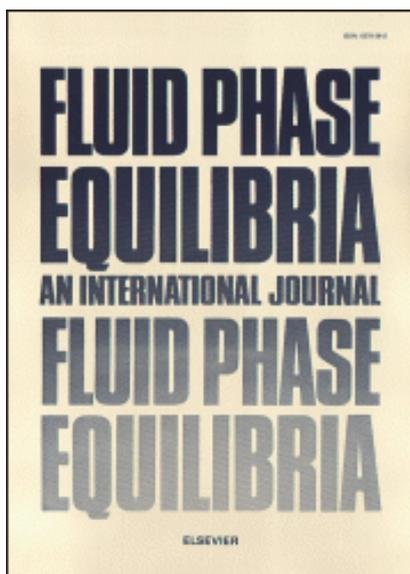
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

**Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP)
systems: Ionic liquid recovery and recycling**

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

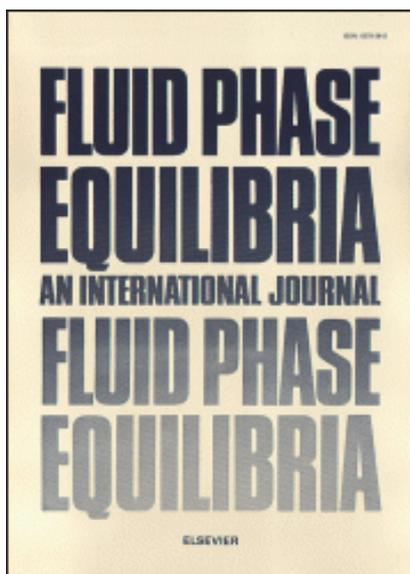
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

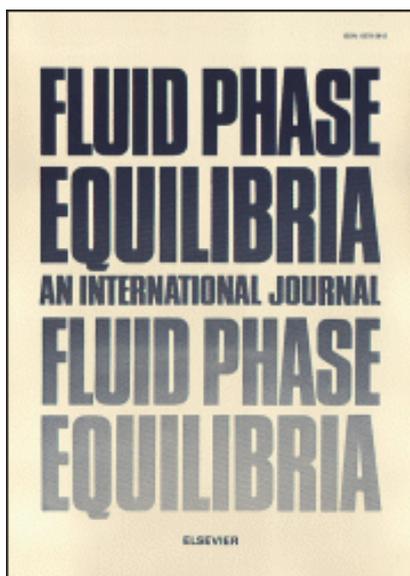
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

**Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP)
systems: Ionic liquid recovery and recycling**

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

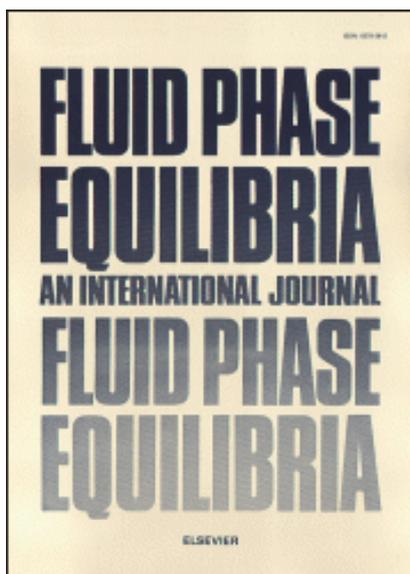
The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irbien

***Fluid Phase Equilibr.*, 2014, 371, 67-74.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *Fluid Phase Equilibria*:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378381214001678>

4.5. Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), *AIChE J.*, aceptado (en prensa), DOI: 10.1002/aic.14530.

Resumen

El reparto en tres fases basado en líquidos iónicos (ILTPP en su acrónimo inglés: *ionic liquid-based three phase partitioning*) es una técnica prometedora para recuperar proteínas de alto valor añadido en la interfase líquido-líquido. Su perfil económico y medioambiental depende fuertemente del consumo neto de líquido iónico. Se estudian así las alternativas para maximizar la fracción de líquido iónico que puede reciclarse. Se ha demostrado que la adición de cantidades adicionales de sal, alternativa ya propuesta en la literatura, tiene un efecto muy limitado sobre la recuperación de líquido iónico para concentraciones de proteína en la corriente de alimentación relativamente elevadas, pudiendo incluso conducir a un incremento en las pérdidas de líquido iónico bajo determinadas condiciones. Sin embargo, pequeñas adiciones de sal resultan ser efectivas y rentables desde un punto de vista económico. La evaporación a vacío permite la recuperación completa del líquido iónico y de la sal, lo que refuerza la sostenibilidad y viabilidad de los procesos ILTPP.

Original abstract

Ionic liquid-based three-phase partitioning (ILTPP) is a promising technique to recover high-added value proteins at the liquid-liquid interface. Its economic and environmental performance highly depends on the net ionic liquid consumption. Alternatives to maximize the fraction of ionic liquid that can be recycled are studied. It is demonstrated that the addition of extra salt, previously proposed in literature, has a very limited effect on ionic liquid recovery for relatively high protein concentrations in the feed stream, and that it may even lead to an increase of the ionic liquid losses under certain conditions. However, small additions of salt are shown to be effective and profitable from an economic point of view. Vacuum evaporation is shown to allow for the complete ionic liquid and salt recovery, reinforcing the sustainability and viability of ILTPP processes.

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AIChE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AIChE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AIChE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AIChE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**



El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTTP)

E. Alvarez-Guerra, S.P.M. Ventura, J.A.P. Coutinho, A. Irabien

***AICHE J.*, in press, DOI: 10.1002/aic.14530.**

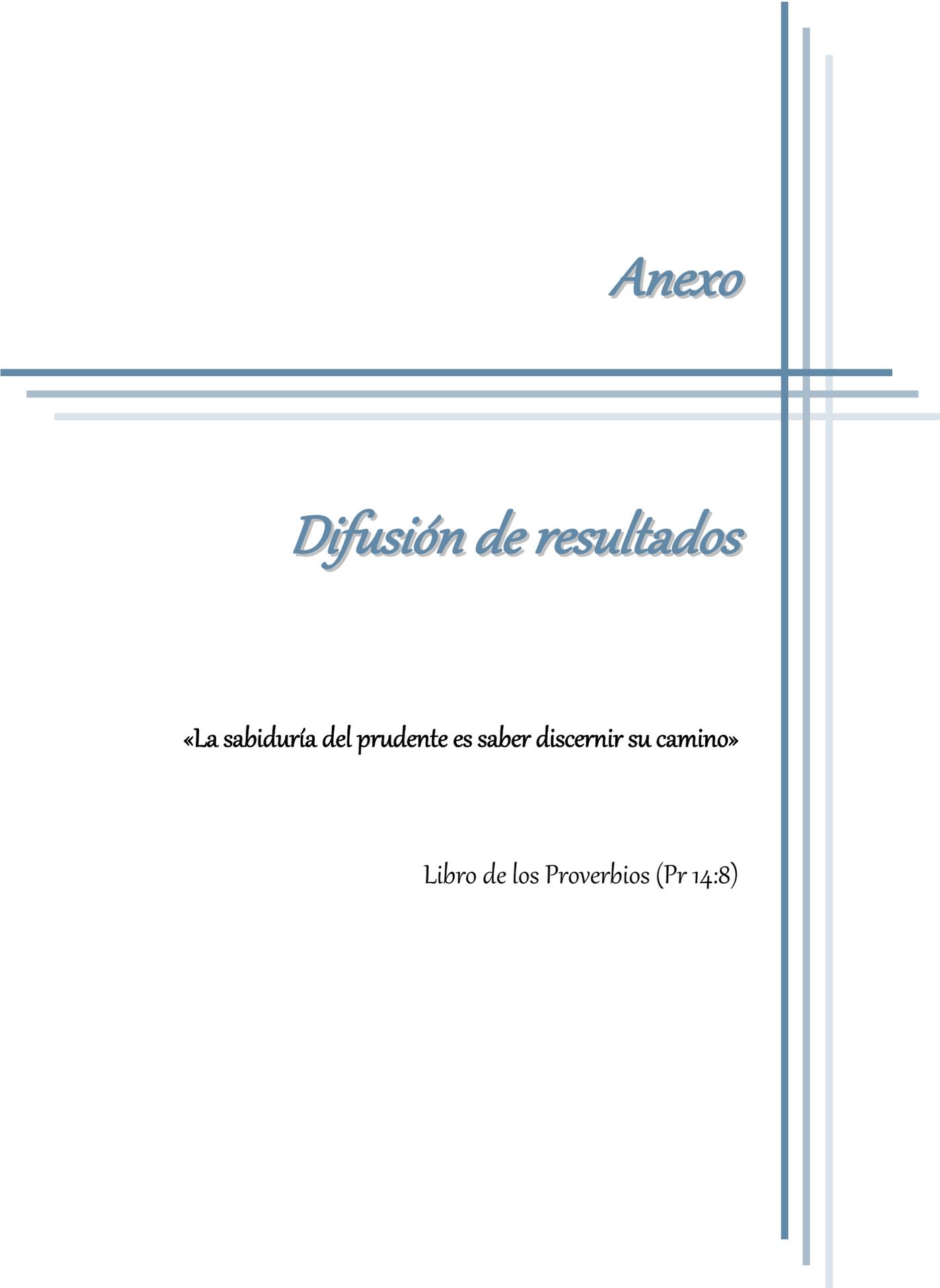


El texto completo del artículo puede encontrarse en el siguiente enlace de la página web de la revista *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>

The full text of the article can be found in the following link to the web page of *AIChE Journal*:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14530/abstract>



Anexo

Difusión de resultados

«La sabiduría del prudente es saber discernir su camino»

Libro de los Proverbios (Pr 14:8)

ANEXO. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

A.1. Artículos científicos relativos a la presente tesis doctoral (2011-2014)

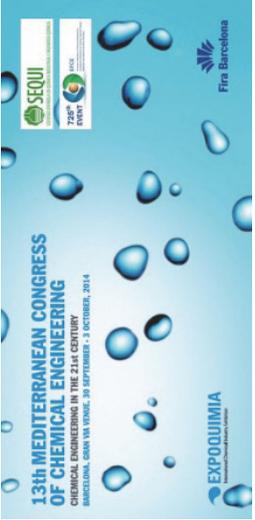
Revista	Autores, título, revista, año, número y páginas
 <p>Índice de impacto: 2,894</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A., Extraction of lactoferrin with hydrophobic ionic liquids, <i>Separation and Purification Technology</i>, 2012, 98, 432-440.</p>
 <p>Índice de impacto: 1,164</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) for Lactoferrin Recovery, <i>Separation Science and Technology</i>, 2014, 49, 957-965.</p>
 <p>Índice de impacto: 2,504</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems for whey protein recovery: ionic liquid selection, <i>Journal of Chemical Technology & Biotechnology</i>, aceptado (en prensa). DOI: 10.1002/jctb.4401.</p>

 <p>Índice de impacto: 2,379</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A., Ionic liquid-based three phase partitioning (ILTPP) systems: Ionic liquid recovery and recycling, <i>Fluid Phase Equilibria</i>, 2014, 371, 67-74.</p>
 <p>Índice de impacto: 2,493</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho, J.A.P., Irabien A., Ionic liquid recovery alternatives in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP), <i>AIChE Journal</i>, aceptado (en prensa). DOI: 10.1002/aic.14530.</p>

A.2. Capítulo de libro relativo a la presente tesis doctoral (2011-)

Editorial	Autores, título, revista, año, número y páginas
	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A., Separation of Proteins by Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning, en: Perez de los Rios A., Hernandez-Fernandez F.J. (eds.), Ionic Liquids in Separation Technology, <i>Elsevier Inc.</i>, 2015, en prensa, DOI: 10.1016/B978-0-444-63257-9.</p>

A.3. Comunicaciones a congresos relativas a la presente tesis doctoral (2011-2014)

Congreso	Autores, título y tipo de comunicación
<p>13th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (13MCCE) http://www.ub.edu/congmedit/ 30 septiembre-3 octubre 2014 Barcelona (España)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A. Ionic liquid recovery in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) systems Comunicación tipo póster</p> <p>Alvarez-Guerra E., Herrero P., Irabien A. Simplified models for ionic liquid recovery in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) process Comunicación tipo póster</p>
<p>International Solvent Extraction Conference 2014 (ISEC 2014) http://events.dechema.de/isec2014 7-11 septiembre 2014 Würzburg (Alemania)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A. Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning for protein recovery Comunicación oral</p>

 <p>ANQUE-ICCE-BIOTEC 2014 http://www.angue-icce-biotec2014.org/ 1-4 julio 2014 Madrid (España)</p>	<p>Alvarez-Guerra E., Dominguez-Ramos A., Irabien A. An innovative process for protein recovery: Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) Comunicación tipo póster</p>
<p>2nd International Conference on Ionic Liquids in Separation and Purification Technology (ILSEPT) http://www.ilsept.com/ 29 junio-2 julio 2014 Toronto (Canadá)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A. Lactoferrin recovery by means of Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) Comunicación oral</p> <p>Alvarez-Guerra E., Ventura S.P.M., Coutinho J.A.P., Irabien A. Ionic Liquid Recycling in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) systems Comunicación oral</p>
<p>XXXIV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ) http://rseq2013.unican.es/ 15-18 septiembre 2013 Santander (España)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A. Selección del sistema líquido iónico/sal para separar lactoferrina mediante "Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning" (ILTPP) Comunicación tipo póster</p>

 <p>9th World Congress of Chemical Engineering (WCCE9) http://www.wcce9.org/ 18-23 agosto 2013 Seúl (República de Corea)</p>	<p><u>Alvarez-Guerra E.,</u> Irabien A. Lactoferrin Distribution in Ionic Liquid-based Three Phase Partitioning (ILTPP) Systems Comunicación tipo póster</p>
 <p>9th European Congress of Chemical Engineering (ECCE9) http://www.ecce2013.eu/ 21-25 abril 2013 La Haya (Países Bajos)</p>	<p><u>Alvarez-Guerra E.,</u> Irabien A. Lactoferrin Concentration by means of Ionic-Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) Comunicación oral</p>
	<p><u>Alvarez-Guerra E.,</u> Irabien A. Assessment of Ionic Liquid/ Salt Systems for Lactoferrin Recovery with Ionic-Liquid-Based Three Phase Partitioning (ILTPP) Comunicación tipo póster</p>

<p>20th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2012) http://www.chisa.cz/2012/ 25-29 agosto 2012 Praga (República Checa)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A. Selective extraction of lactoferrin with imidazolium-based ionic liquids Comunicación tipo póster</p>
<p>ANQUE International Congress of Chemical Engineering (ANQUE-ICCE 2012) http://anqueicce2012.org/ 24-27 junio 2012 Sevilla (España)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A. Direct extraction of lactoferrin with ionic liquids Comunicación oral</p>
<p>12th Mediterranean Congress of Chemical Engineering (12MCCE) 15-18 noviembre 2011 http://www.ub.edu/congmedit/ Barcelona (España)</p> 	<p>Alvarez-Guerra E., Irabien A. Transport of lactoferrin through bulk ionic liquid membranes Comunicación tipo póster</p>

 <p>Minilubes Scientific Fellows' Congress http://regid.cesga.es 1-3 junio 2011 Vigo (España)</p>	<p><u>Alvarez-Guerra E.</u>, Irabien A. Innovative lactoferrin extraction with ionic liquids Comunicación oral</p>
---	---

A.4. Producción científica anterior al doctorado

Artículos:

- **Alvarez-Guerra E.**, Dominguez-Ramos A., Irabien A., Photovoltaic solar electro-oxidation (PSEO) process for wastewater treatment, *Chemical Engineering Journal* **2011**, 170, 7-13.
- **Alvarez-Guerra E.**, Dominguez-Ramos A., Irabien A., Design of the Photovoltaic Solar Electro-Oxidation (PSEO) process for wastewater treatment, *Chemical Engineering Research and Design* **2011**, 89, 2679-2685.
- **Alvarez-Guerra E.**, Molina A., Viguri J.R., Alvarez-Guerra M., A SOM-based methodology for classifying air quality monitoring stations, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **2011**, 30, 424-438.
- Alvarez-Guerra M., **Alvarez-Guerra E.**, Alonso-Santurde R., Andrés A., Coz A., Soto J., Gómez-Arozamena J., Viguri J.R., Sustainable Management Options and Beneficial Uses for Contaminated Sediments and Dredged Material, *Fresenius Environmental Bulletin*, **2008**, 17, 1539-1553.

Comunicaciones a congresos:

- **Alvarez-Guerra E.**, Electro-oxidation for wastewater treatment powered by photovoltaic solar energy, comunicación tipo póster. Congreso: *Cantabria Campus Nobel* (<http://www.cantabriacampusnobel.es>), 11-15 junio 2012, Santander (España).
- **Alvarez-Guerra E.**, Dominguez-Ramos A., Irabien A., Photovoltaic Solar Electro-Oxidation process: modeling, design and applications, comunicación tipo póster. Congreso: *International congress on Green Process Engineering (GPE 2011)* (<http://inpact.inp-toulouse.fr/GPE2011/home.htm>), 6-8 diciembre 2011, Kuala Lumpur (Malasia).
- Irabien A., Dominguez-Ramos A., **Alvarez-Guerra E.**, Photovoltaic Solar Electro-Oxidation (PSEO) process for wastewater treatment, keynote. Congreso: *8th European Congress of Chemical (8ECCE)* (<http://www.ecce2011.de/>), 25-29 septiembre 2011, Berlín (Alemania).
- **Alvarez-Guerra E.**, Dominguez-Ramos A., Irabien A., Photovoltaic solar energy supply to Electro-Oxidation processes for wastewater treatment, comunicación oral. Congreso: *9th European Symposium on Electrochemical Engineering (9th ESEE)* (<http://www.9thesee.gr/>), 19-23 junio 2011, Chania (Grecia).

Sobre el autor

Enrique Álvarez Guerra (1987) es Ingeniero Químico (2005-10) y Máster en Ingeniería Química (2010-11) por la Universidad de Cantabria.

Miembro del grupo de investigación Desarrollo de Procesos Químicos y Control de Contaminantes (DePRO), desde 2011 ha realizado sus estudios de doctorado en Ingeniería Química y de Procesos en la Universidad de Cantabria bajo la supervisión del Prof. Dr. Ángel Irabien. En 2013, en el marco de la tesis doctoral, realizó una estancia breve de tres meses en la Universidade de Aveiro (Portugal) bajo la supervisión del Prof. Dr. João A.P. Coutinho.

Tras haber disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, en la actualidad ocupa una plaza de Ayudante LOU en el Departamento de Ingenierías Química y Biomolecular de la Universidad de Cantabria.

Ha sido galardonado con diversos premios de ámbito nacional: Premio Nacional Fin de Carrera en Ingenierías y Arquitectura (2013), Premio Futura en los Premios SusChem Jóvenes Investigadores Químicos (2011), I Premio Responsible Care



por el proyecto Fin de Carrera de Ingeniería Química-Tecnología (2010), Premio Especial IBM en el 7º Certamen Universitario Arquímedes (2008) y medalla de plata en la XVIII Olimpiada Nacional de Química (2005).

En el ámbito asociativo, ha sido el Presidente-fundador del Universidad de Cantabria Student Chapter of AIChE así como el Secretario-fundador de la Asociación de Química e Ingeniería Química de Cantabria (AQUIQÁN).

About the author

Enrique Álvarez Guerra (1987) is Chemical Engineer (2005-10) and Master in Chemical Engineering (2010-11) by the Universidad de Cantabria.

Member of the Development of Chemical Processes and Pollutant Control (DePRO) research group, since 2011 he has been involved in the PhD studies in Chemical and Process Engineering at Universidad de Cantabria under the supervision of Prof. Dr. Ángel Irabien. In 2013, in the framework of his PhD studies, he carried out a short stay during three months at Universidade de Aveiro (Portugal) under the supervision of Prof. Dr. João A.P. Coutinho.

After being supported by a postgraduate fellowship for the Training of University Academic Staff (FPU) of the Spanish Ministry of Education, nowadays he holds

the position of assistant professor in the Department of Chemical and Biomolecular Engineering of the Universidad de Cantabria.

He has been awarded with several national prizes: National Prize of Degree in Engineering and Architecture (2013), Futura Prize in the SusChem Young Chemical Researcher Awards (2011), I Responsible Care Prize for the End-of-Course Project in Chemical Engineering-Technology (2010), IBM Special Prize in the 7th Archimedes University Contest (2008) and silver medal in the XVIII National Chemistry Olympiad (2005).

Regarding associations, he has been Founder-President of the Universidad de Cantabria Student Chapter of AIChE, and Founder-Secretary of the Association of Chemistry and Chemical Engineering of Cantabria (AQUIQÁN).

La separación de proteínas de medios complejos como el lactosuero bovino suele representar entre el 50 y el 80 % de los costes de producción, por lo que esta etapa constituye el cuello de botella para su valorización. La extracción líquido-líquido puede tener un gran potencial para reducir estos costes y la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales por líquidos iónicos permite superar los principales problemas ambientales y de seguridad asociados a la extracción.

La presente tesis doctoral tiene como objetivo desarrollar una técnica innovadora para la recuperación de proteínas, y en particular, de lactoferrina, basada en líquidos iónicos y que permita tanto la recuperación de la proteína como la reutilización del líquido iónico.



*«We know what we have to do to achieve the sustainability,
now it's time to do it»*