



Máster en Biotecnología Avanzada

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Aplicación de sistemas acuosos bifásicos para la separación de contaminantes emergentes.

Application of aqueous biphasic systems for emerging contaminant separation.

AUTOR: Lois Morandeira Conde

DIRECTORES: Dra. M^a Ángeles Sanromán Braga
Dr. Francisco Javier Deive Herva



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



La Dra M^a Ángeles Sanromán Braga y el Dr Francisco Javier Deive Herva,
profesores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Vigo

INFORMAN:

que el presente trabajo fin de máster, con título

*Aplicación de sistemas acuosos bifásicos para la separación de
contaminantes emergentes.*

*Application of aqueous biphasic systems for emerging
contaminant separation.*

ha sido realizado en el Grupo de Bioingeniería y Procesos Sostenibles de la Universidad de Vigo (BIOSUV) por **Lois Morandeira Conde** bajo la dirección de la **Dra. M^a Ángeles Sanromán Braga** y del **Dr. Francisco Javier Deive Herva**, y autorizan su presentación en la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Vigo, 19 de Enero de 2017

Fdo. Francisco Javier Deive

Fdo. M^a Ángeles Sanromán

ÍNDICE:

Índice:	i
Memoria	0
0 Objetivo.....	1
1 Introducción	2
1.1 Estado del arte	2
1.2 Estrategia:	3
1.3 Conceptos	5
1.3.1 Sistema acuoso bifásico	5
1.3.2 Líquidos iónicos	5
2 Materiales y métodos	8
2.1 Reactivos	8
2.2 Caracterización de las curvas binodales	9
2.3 Rectas de reparto y extracción.....	9
2.4 Determinación de los contaminantes	10
3 Resultados y Discusión	12
3.1 Región de inmiscibilidad	12
3.1.1 Determinación de la ventana de inmiscibilidad provocada por los dos líquidos iónicos en base imidazolio con el Tween 20	12
3.1.2 Determinación de la ventana de inmiscibilidad generada por el $C_2C_{11}imC_1SO_4$ con Triton X-100 y X-102.....	14
3.2 Rectas de reparto	18
3.3 Optimización de las condiciones de extracción del etinilestradiol y el clembuterol	20
4 Conclusiones	26
5 Bibliografía	27
ANEXO I.....	1
1 Tablas	1
2 Rectas de reparto	7

MEMORIA

0 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el diseño de una estrategia de separación novedosa y de aplicación para la eliminación de contaminantes emergentes de aguas residuales. Con este fin, se ha decidido apostar por evaluar la viabilidad del empleo de líquidos iónicos comerciales como agentes de segregación de fases en disoluciones acuosas de compuestos tensoactivos no iónicos más habituales. Para ello, se ha llevado a cabo una comparación entre distintos sistemas y se ha seleccionado el líquido iónico y el tensioactivo que presentaban unas propiedades de separación más prometedoras para ser aplicados a la separación de los dos contaminantes emergentes modelo, utilizando finalmente un diseño factorial de experimentos con el *software* Design-Expert 8.0.0 para optimizar el proceso de separación.

El fin último del desarrollo de este documento es su presentación como Trabajo Fin de Máster (TFM) del Máster de Biotecnología Avanzada impartido por las Universidades de Vigo y la Universidade da Coruña.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Estado del arte

El diseño de las plantas de tratamiento de aguas residuales se encuentra afectado por numerosos factores tales como la presencia de contaminantes emergentes, entre los cuales se encuentran los cada vez más estudiados productos farmacéuticos y de higiene personal (PPCPs por sus siglas en inglés). Las tendencias actuales de ingeniería ambiental apuestan por la segregación de efluentes con el fin de lograr la máxima eficiencia de tratamiento (Masi et al. 2010, www.grundfound.com). En este sentido, la complejidad de las aguas residuales, como las procedentes de los hospitales, que por lo general contienen PPCPs, medios de contraste de rayos X, detergentes o antibióticos, compromete seriamente la eficacia de los procesos de depuración convencionales y supone un riesgo para el medio ambiente y la salud pública. Por lo tanto, estas corrientes acuosas deben ser separadas antes de llegar a las plantas de aguas residuales públicas con el fin de evitar que terminen en los biotopos acuáticos y puedan afectar negativamente a los seres vivos (Pauwels et al. 2006). De la ingente cantidad de posibles contaminantes, para este trabajo se seleccionaron el clenbuterol y el 17 α -etinilestradiol como fármacos modelo con diferente grado de hidrofobicidad ($\log P = 2,33$ y $3,90$, respectivamente (www.chemspider.com)), siendo el primero un receptor antagonista β -adrenérgico con efecto broncodilatador para el tratamiento del asma y el segundo un disruptor endocrino utilizado como anticonceptivo y para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (González et al 2015, Giordani et al. 2015).

Conforme crece la preocupación causada por estos contaminantes, se hace necesario investigar nuevas estrategias para su concentración y cuantificación. El análisis bibliográfico revela que la mayoría de las opciones son destructivas e implican la degradación de estos contaminantes emergentes por métodos como oxidación avanzada o biodegradación (Postigo et al. 2014, Zhang et al 2016). Como alternativa, recientemente se están aplicando los sistemas acuosos bifásicos mediante la adición de agentes de segregación para favorecer la eliminación de compuestos persistentes como hidrocarburos aromáticos o colorantes industriales de las corrientes acuosas contaminadas (Álvarez et al. 2013, Álvarez et al 2014 a). Tradicionalmente, se ha destacado la capacidad de polímeros y sales para formar ventanas de inmiscibilidad en disolución acuosa (Albertsson 1986). Este fenómeno ha sido descrito como una competición entrópica entre las moléculas presentes en disolución acuosa para ser hidratadas, de modo que se logra la segregación del

compuesto con menos capacidad de establecer enlaces puente de hidrógeno con las moléculas de agua (Sadeghi 2014).

1.2 Estrategia:

En los últimos años, los sistemas acuosos bifásicos experimentaron un renacimiento gracias a la aparición de los líquidos iónicos. Estas sales tienen propiedades ventajosas que las han hecho ser objeto de estudio en campos tan diversos como el electroquímico, el biotecnológico o el analítico (Plechkova et al. 2008, Freire et al. 2012). La disponibilidad de una gran variedad de líquidos iónicos abre un sinfín de posibilidades para su aplicación en este tipo de equilibrios líquido-líquido (Freire et al. 2014). Desde que Gutowski et al. (2003) demostraron la capacidad de estas sales para actuar como agentes *salting-out*, se ha detectado un interés creciente en la aplicación de estos sistemas para la extracción de diferentes tipos de moléculas, ya sean para enzimas (Deive et al. 2012, Ranyere et al. 2015), polímeros (Álvarez et al. 2015 a) o contaminantes (Lee et al. 2016).

En trabajos de investigación previos del grupo BIOSUV de la Universidad de Vigo, se demostró la capacidad de los líquidos iónicos con base catiónica de imidazolio para provocar la separación de fases en soluciones acuosas de surfactantes no iónicos, concluyendo que la mezcla de estos surfactantes con un líquido iónico en base de imidazolio con cadena alquílica corta maximiza la zona inmiscibilidad (Álvarez et al. 2014 b). En este contexto, el presente trabajo de fin de máster se ha centrado en la aplicación de dos líquidos iónicos de base imidazolio como metilsulfato de 1-etil-3-metil imidazolio ($C_2C_{1im}C_1SO_4$) y el etilsulfato de 1-etil-3-metil imidazolio ($C_2C_{1im}C_2SO_4$), ya que son líquidos iónicos que ya se comercializan a gran escala (más de una tonelada anual) y que aseguraría su disponibilidad para ser aplicados (Álvarez et al. 2014b) para separar cada contaminante modelo (clembuterol y etinilestradiol). Por otro lado, se seleccionaron dos familias de surfactantes no-iónicos (Triton y Tween) como modelo de detergentes que podrían estar presentes en las propias aguas residuales domésticas o de hospitales. Con los datos de equilibrio se podrá elegir la combinación más apropiada para maximizar la región de inmiscibilidad y, con ello, incrementar las posibilidades de éxito en la separación de los compuestos objeto de estudio.

Para caracterizar los sistemas acuosos bifásicos es necesario llevar a cabo la determinación de las curvas de solubilidad y las rectas de reparto a diferentes temperaturas con el fin de asegurar la estabilidad térmica de la región de inmiscibilidad y de la

capacidad de separación. Además, los sistemas que vayan a ser aplicados deben ser evaluados en condiciones ambientales normales (20-40°C). Este estudio se apoya también en el uso de distintas ecuaciones teóricas con el fin de modelar adecuadamente los datos experimentales tanto para la región de inmiscibilidad como para la capacidad de extracción.

A continuación, se abordará un primer estudio que establezca la capacidad del sistema para separar cada contaminante modelo (clombuterol y etinilestradiol) individualmente y de forma conjunta. De acuerdo a los datos obtenidos, mediante un diseño factorial de experimentos con el software Design-Expert 8.0.0 se optimizarán las condiciones de extracción (temperatura, pH y concentración de líquido iónico en la alimentación) usando la metodología de superficie de respuesta. Con los datos obtenidos se espera tener suficientes evidencias para plantear una estrategia capaz de separar selectiva y eficazmente los dos contaminantes emergentes estudiados de muestras de aguas residuales.

La estrategia seguida para realizar el presente trabajo se resume en la Figura 1:

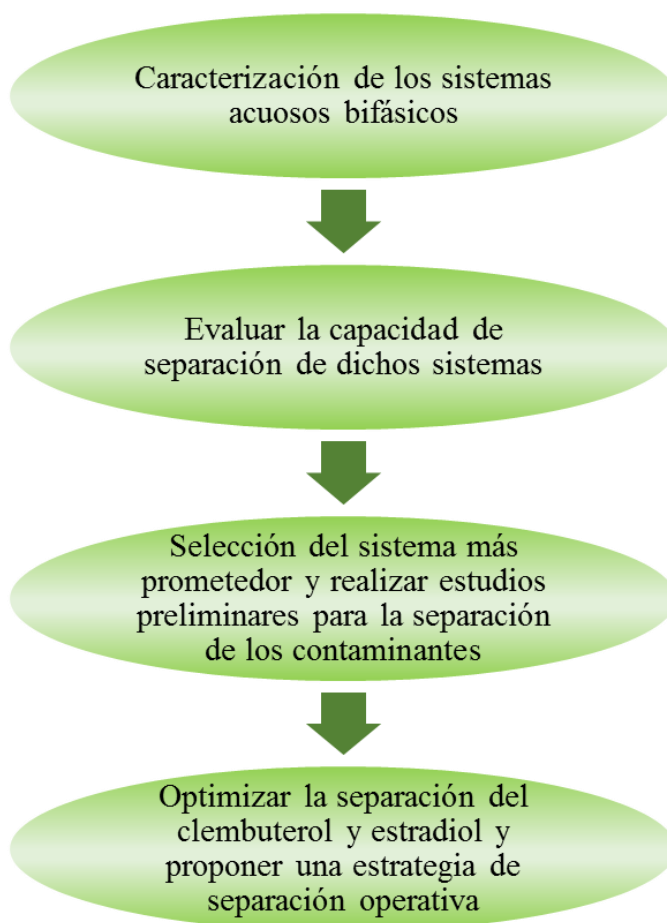


Figura 1: Estrategia propuesta para abordar el problema.

1.3 Conceptos

1.3.1 Sistema acuoso bifásico

Un sistema acuoso bifásico es un tipo de equilibrio líquido-líquido que está compuesto de una disolución acuosa en la que se encuentran disueltos polímeros, una sal y un polímero, o dos sales (Walter et al. 1985). El sistema se basa en una separación de una mezcla inmiscible de tres componentes en dos fases en equilibrio, una más densa (inferior) y otra menos (superior), y cada una tiene unas propiedades distintas que permiten la partición de distintas moléculas de interés dependiendo de su afinidad hacia cada una de las fases.



Figura 2: Ejemplo de equilibrio líquido-líquido en un sistema acuoso bifásico.

Los sistemas acuosos bifásicos han sido propuestos como técnica de separación para diversidad de compuestos presentes en disolución acuosa, entre ellos una amplia gama de biocompuestos (Deive et al, 2011a; Ventura et al, 2012) como antioxidantes (Ulloa et al, 2012), antibióticos (Soto et al, 2005), alcaloides (Freire et al, 2010) u otros compuestos orgánicos contaminantes (Inoue et al, 2007).

1.3.2 Líquidos iónicos

Paul Walden escribió por primera vez en 1914 sobre nitrato de etilamonio ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$), una sal en base amonio cuyo punto de fusión estaba entre 13-14 °C (Walden 1914). Él describió este tipo nuevo de sales orgánicas como aquellas de tipo

anhidro cuyo punto de fusión es menor a los 100 °C. Desde entonces y de forma puramente convencionalista, los líquidos iónicos se han definido como aquellas sales con parte orgánica cuyo punto de fusión es inferior a dichos 100 °C (Plechkova 2008).

En su momento este descubrimiento no captó el interés del mundo científico, sin embargo, a lo largo del siglo XX diversos avances en el campo de la investigación, y fundamentalmente en la industria, fueron despertando el interés de este tipo de compuestos. Así en los últimos 20 años, se ha detectado un crecimiento exponencial que se evidencia en el número de artículos publicados sobre el tema. Como se puede apreciar en la Imagen 2, el máximo se alcanzó en 2014 con 6649 publicaciones, crecimiento que también comparte el número de patentes sobre estos compuestos (Plechkova 2008).

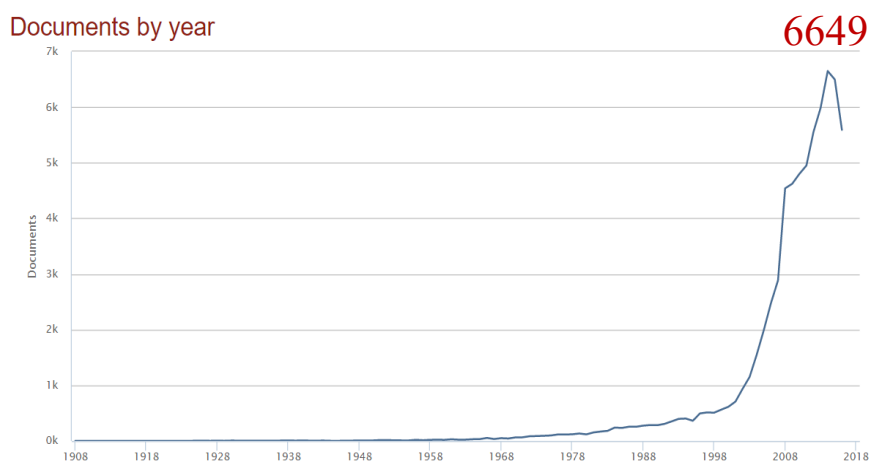


Figura 3: Resultado de una búsqueda en Scopus con las palabras “ionic liquids” (31/10/2016) en la que se contabiliza el número de publicaciones con esas palabras clave a lo largo de los años.

La principal cualidad que hace a estas sales versátiles y de gran aplicabilidad es la posibilidad de formular un líquido iónico en función de las necesidades de su uso. Como sal posee un anión y un catión y la combinación de todos los cationes y aniones que forman líquidos iónicos conocidos permite un número altísimo de posibles mezclas y, con ello, compuestos. Debido a su gran número y variabilidad, sus propiedades difieren entre cada familia. Sin embargo, existen unas características que son generalmente comunes como son una alta solubilidad en agua, presión de vapor despreciable y una buena estabilidad química y térmica.

Actualmente, estas sales están revolucionando varios campos de la industria (Plechkova 2008) y existen infinidad de aplicaciones teóricas así como otras ya implantadas industrialmente. La Figura 4 recoge algunas de las más importantes actualmente.

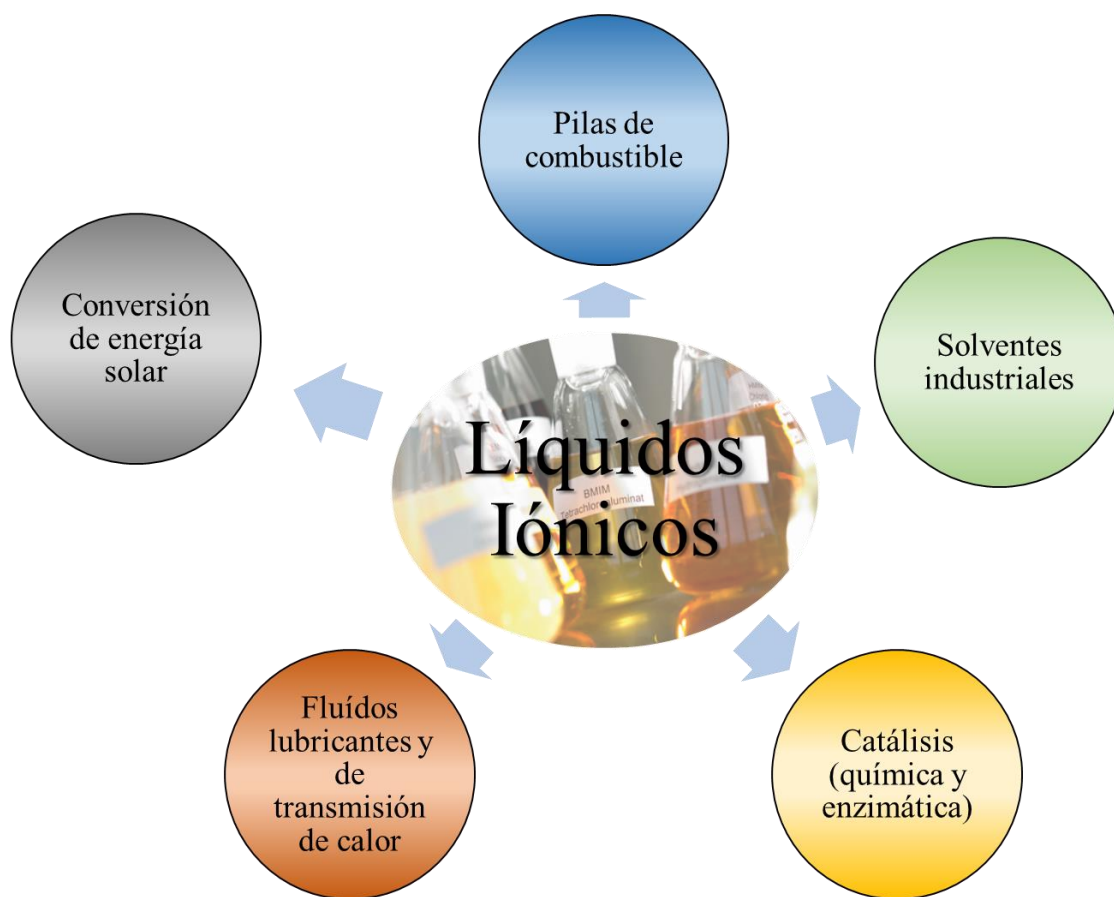


Figura 4: Aplicaciones actuales de importancia para los líquidos iónicos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Los surfactantes no iónicos Triton X-100 y Triton X-102 fueron suministrados por Panreac y Sigma-Aldrich, respectivamente, así como el monolaurato de polioxietilén sorbitano 20 (Tween 20), también por Sigma-Aldrich. El proveedor de los líquidos iónicos $C_2C_{1im}C_1SO_4$ y $C_2C_{1im}C_2SO_4$ fue la empresa IoLiTec, y posteriormente a su recepción se mantuvieron a presión reducida ($P = 0,2$ Pa, aproximadamente) durante tres días y a $50^\circ C$ para asegurar la eliminación de la humedad que pudiese contener antes de su uso. Tanto el clenbuterol ($> 95\%$) como el 17α -etinilestradiol ($> 98\%$) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Las estructuras de todos estos compuestos se muestran en la Figura 5.

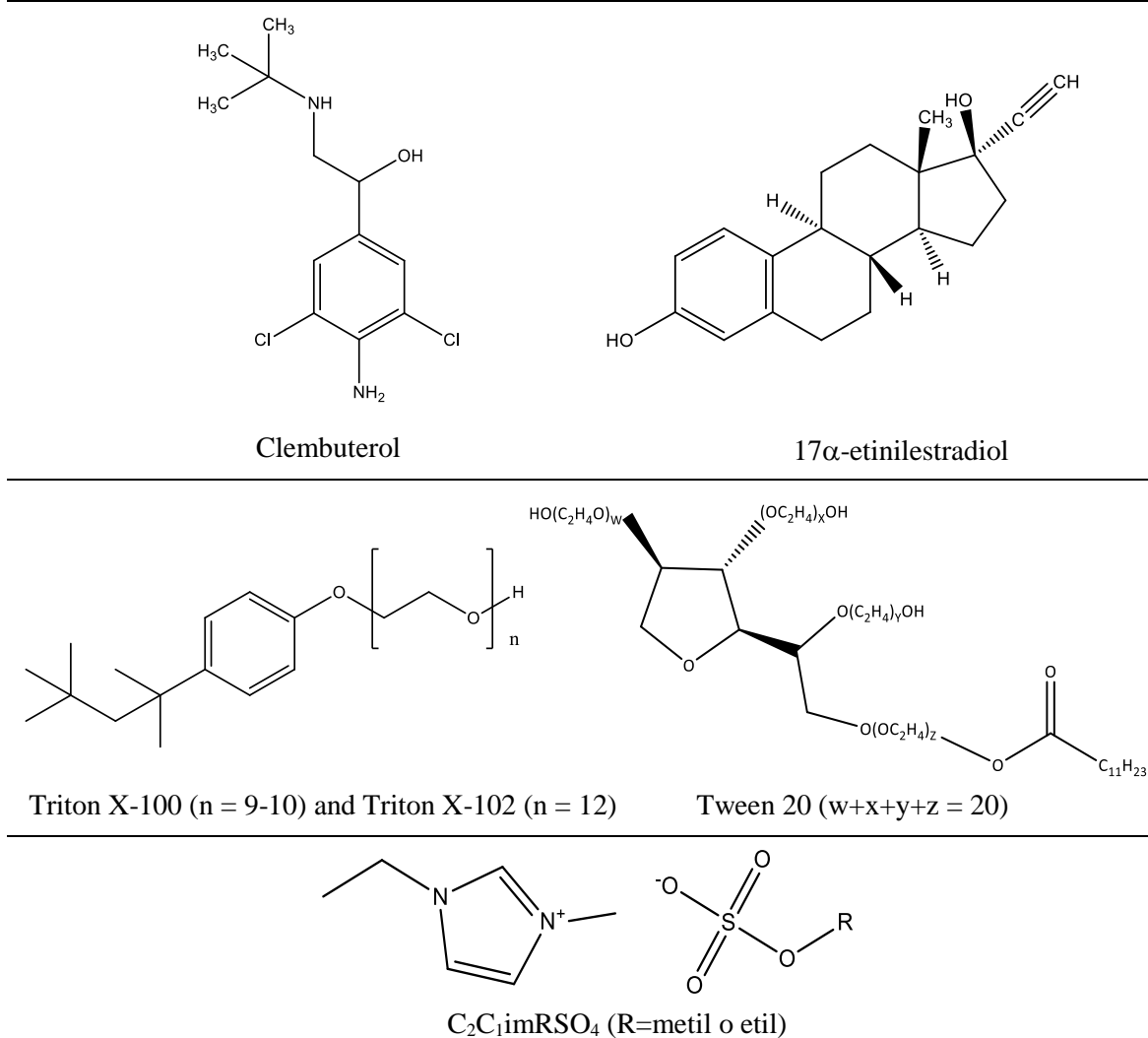


Figura 5: Estructura de los compuestos utilizados.

2.2 Caracterización de las curvas binodales

Los datos de solubilidad se obtuvieron por medio del método de punto de niebla (Álvarez et al. 2014 b), operando en una celda de vidrio con termostato para mantener la temperatura de 20 a 40°C (termómetro digital F200 ASL con una incertidumbre de $\pm 0,01$ K). Para ello se mezclaron cantidades conocidas del surfactante y del líquido iónico en una cámara seca (balanza Sartorius Cubis MSA 125P-100-DA, $\pm 10^{-5}$ g), la cual cubre todo el rango de fracción de masa. Se añadió agua gota a gota a cada mezcla hasta detectar turbidez/transparencia, delimitando así la región de inmiscibilidad. La Figura 6 muestra imágenes de la mezcla binaria, la mezcla ternaria inmiscible y la miscible obtenidas mediante la aplicación de este método. Para caracterizar la región de inmiscibilidad se utilizó un densímetro tipo tubo vibrante digital de Anton Paar DSA-48 ($\pm 2 \cdot 10^{-4}$ g cm⁻³), y un refractómetro Dr. Kernchen Abbemat WR ($\pm 4 \cdot 10^{-5}$), previamente calibrado siguiendo las directrices del proveedor, para medir la densidad y el índice de refracción.

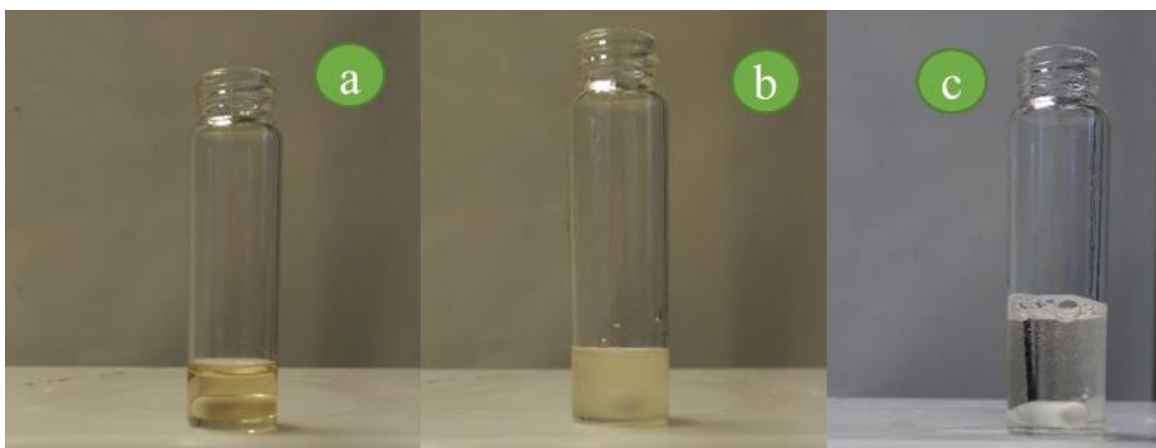


Figura 6: Método del punto de niebla (Álvarez et al. 2014 b); a) Mezcla de líquido iónico y surfactante, b) Mezcla previa a la que se adiciona gotas de agua hasta que se genera la turbidez (zona de inmiscibilidad), c) Se sigue adicionando agua hasta la mezcla se vuelve transparente (zona de miscibilidad otra vez).

2.3 Rectas de reparto y extracción

Para realizar las rectas de reparto se partió de una mezcla con composición conocida perteneciente a la región bifásica, se agitó vigorosamente durante 1 h y se dejó reposar durante 48 h con el fin de asegurar el equilibrio termodinámico y químico y finalmente retirar la fase pesada (inferior). La Figura 7 muestra el procedimiento realizado para la obtención de las distintas rectas de reparto (las cuales están representadas en las Figuras a.1, a.2 y a.3 del Anexo I). La composición de las fases segregadas se determinó mediante la densidad y la medición del índice de refracción (incertidumbre estimada de la concentración de $\pm 0,01$).

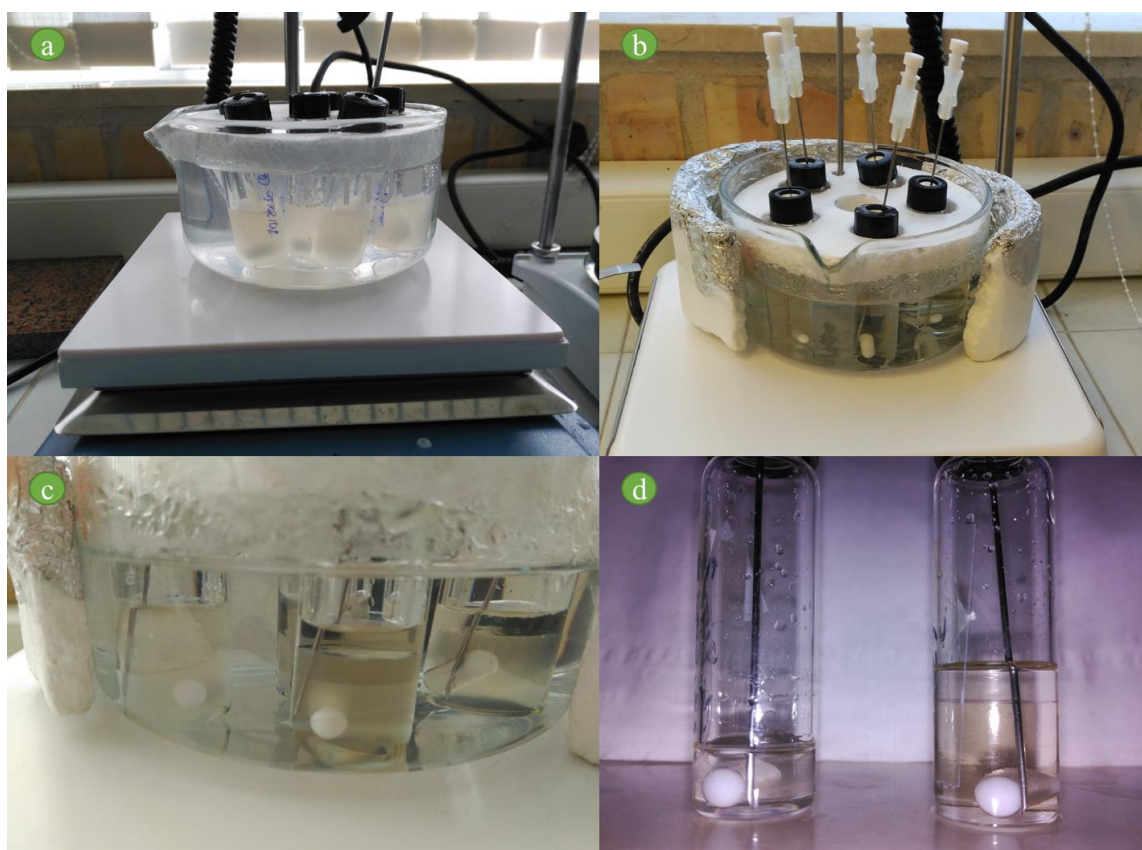


Figura 7: Procedimiento para el estudio de rectas de reparto a temperatura controlada; a) Agitación durante 1 hora, b) 24 horas de reposo, c) Resultado de las 24 horas de reposo, d) Extracción de la fase inferior (mayoritariamente líquido iónico y agua).

2.4 Determinación de los contaminantes

Se añadió clenbuterol y 17α -etinilestradiol a mezclas ternarias pertenecientes a la región bifásica hasta alcanzar una concentración de 3,5 ppm, dado que este valor asegura una concentración razonable que evita posibles interferencias del líquido iónico o el surfactante residual presente en la muestra una vez que se alcanza la separación de fases, y claramente sobrepasa los niveles (0,03 ppm) detectados en las aguas residuales de hospitales (Verdicci et al. 2016). Las mezclas ternarias se agitaron vigorosamente y se dejaron sedimentar, de acuerdo con el mencionado procedimiento descrito para la determinación de las rectas de reparto. La concentración de los contaminantes se determinó por HPLC-DAD (Agilent 1260 infinity) equipado con una columna Kinetex Biphenyl (4,6 x 150 mm; diámetro interno 5 μ m, Phenomenex). La muestra (10 μ L) se eluyó con un caudal de 1 mL/min operando en gradiente con una mezcla de agua (A), metanol (B) y formiato de amonio 100 mM (C) siguiendo el siguiente esquema: i) a 0 min, 65% A, 30% B y 5% de C, ii) a 10 min, 15% A, 80% B y 5% de C, y iii) a 15 min, 15% A, 80% B y 5% C. El tiempo de retención para el clenbuterol y 17α -etinilestradiol es 6,9 min y 11,8 min, respectivamente.

La Figura 8 muestra distintos cromatogramas en los que se puede apreciar el clenbuterol y estradiol medidos a su longitud de onda específica (determinada como el máximo del pico característico del espectro de cada molécula) en una muestra de orina artificial y en una muestra real de la fase pesada (inferior) tras la extracción.

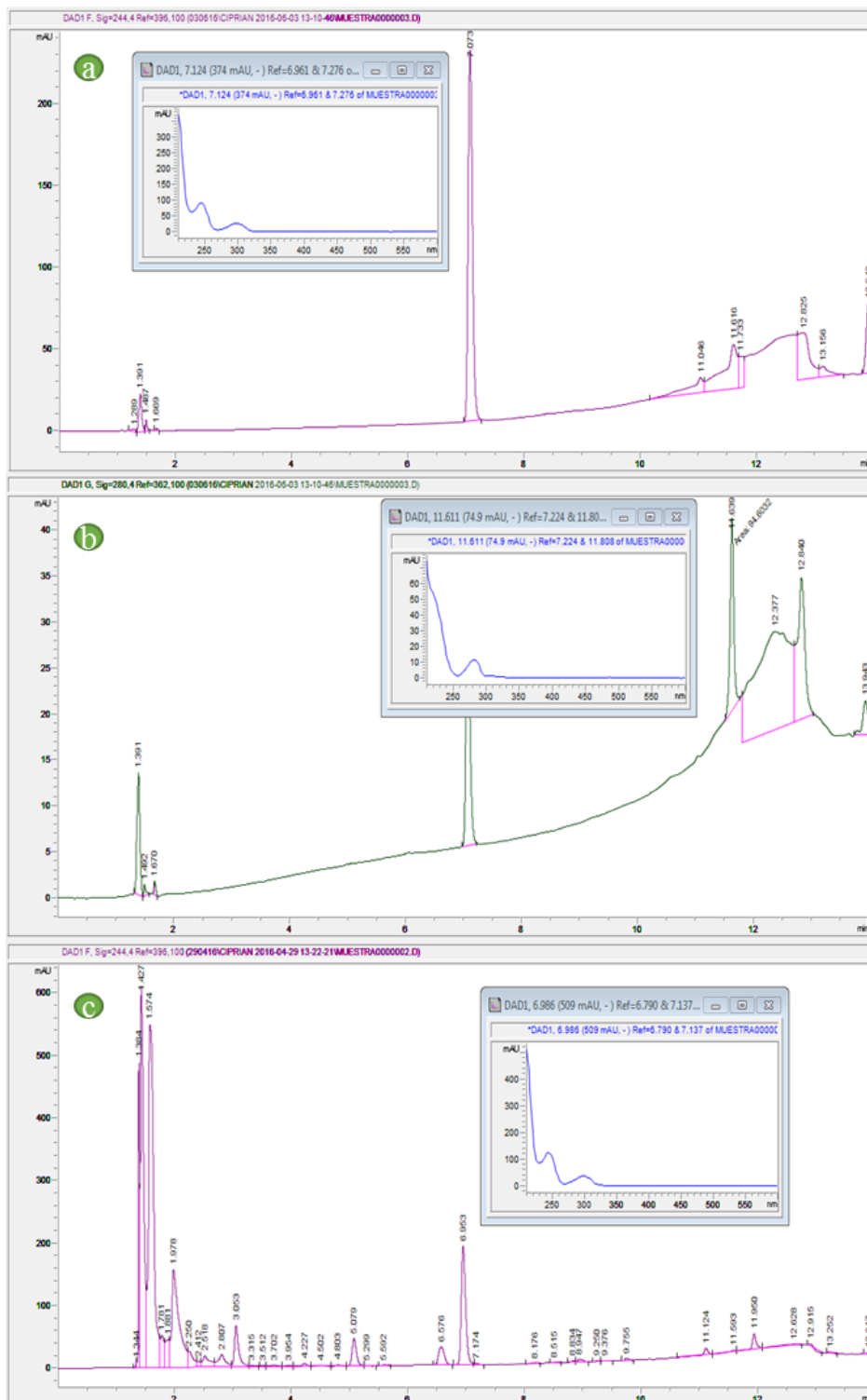


Figura 8: Cromatogramas de a) Orina artificial con clenbuterol y estradiol (medida a 244 nm para clenbuterol), b) Orina artificial con clenbuterol y estradiol (medida a 280 nm para estradiol), c) Muestra de la fase inferior tras la separación de una disolución con clenbuterol y estradiol (medida a 244 nm).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Región de inmiscibilidad

La aplicación de una estrategia secuencial adecuada para la separación eficiente del clembuterol y etinilestradiol a partir de soluciones acuosas que incluyen surfactantes no iónicos con líquidos iónicos de base imidazolio exige un estudio previo riguroso de la zona inmiscibilidad: i) la temperatura de operación y ii) la naturaleza química de los componentes.

3.1.1 Determinación de la ventana de inmiscibilidad provocada por los dos líquidos iónicos en base imidazolio con el Tween 20

La primera etapa de esta sección incluyó la determinación de los datos de solubilidad a diferentes temperaturas, siguiendo el procedimiento experimental detallado en el apartado de materiales y métodos. Para evaluar los dos líquidos iónicos de imidazolio, se estudió la región de inmiscibilidad que generan al mezclarse con un mismo surfactante y agua. El surfactante seleccionado para este propósito fue el Tween 20.

Las curvas de solubilidad para estos sistemas {Tween 20 + H₂O + C₂C₁imC₁SO₄ o C₂C₁imC₂SO₄} se determinaron a presión atmosférica y diferentes temperaturas (25 °C - 60 °C), que corresponden con el mismo rango usado por Álvarez et al. (2014 b) para permitir la comparación directa de los datos. Los datos experimentales se pueden observar en las Figuras 9 y 10.

En términos generales, del análisis bibliográfico se desprende que existe una relación proporcional entre la temperatura y la inmiscibilidad para sistemas acuosos tradicionales que contienen sales inorgánicas y polímeros, mientras que se detecta una inversión de la tendencia cuando se trabaja con líquidos iónicos y sales convencionales (Freire et al. 2012). En el presente trabajo las regiones de inmiscibilidad aumentan del orden de un 5% cada 10°C en el caso del C₂C₁imC₁SO₄, mientras que para el C₂C₁imC₂SO₄ es de cerca de un 3%. El análisis de estos datos demuestra que un incremento de la temperatura supone un aumento de la zona bifásica, lo cual concuerda con el comportamiento de los sistemas acuosos bifásicos basados en líquidos iónicos de amonio o imidazolio previamente descritos (Álvarez et al. 2014b, Álvarez et al. 2015b).

Se puede apreciar que en el caso del C₂C₁imC₁SO₄ se obtienen mayores regiones de inmiscibilidad que con C₂C₁imC₂SO₄ en disoluciones acuosas del surfactante Tween 20, lo

cual coincide con las conclusiones de Álvarez et al. (2014 b) para sistemas con surfactantes y líquidos iónicos.

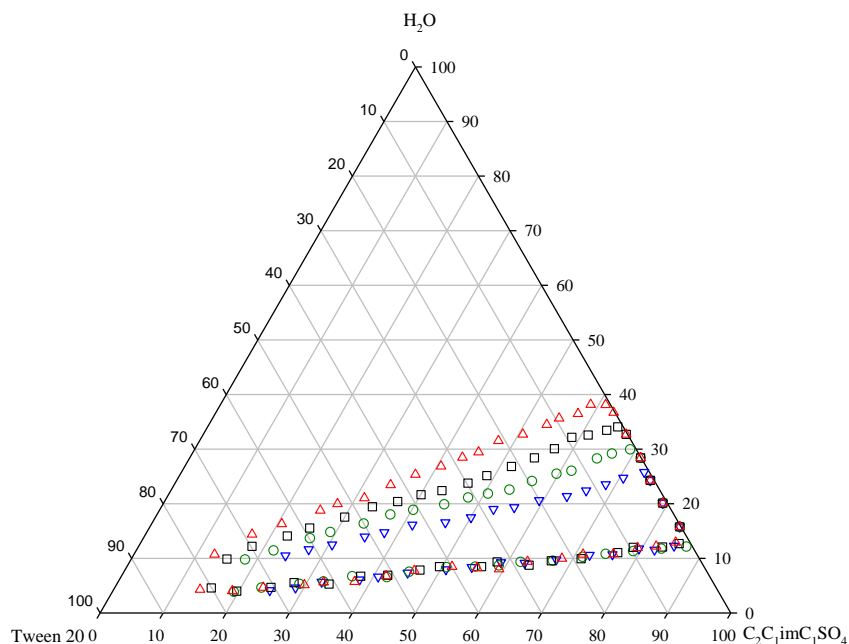


Figura 9: Datos de la curva binodal {Tween 20 (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) +H₂O (3)} a T = 25 °C (▽), 40 °C (○), 50 °C (□), 60 °C (△) y P = 101,33 kPa.

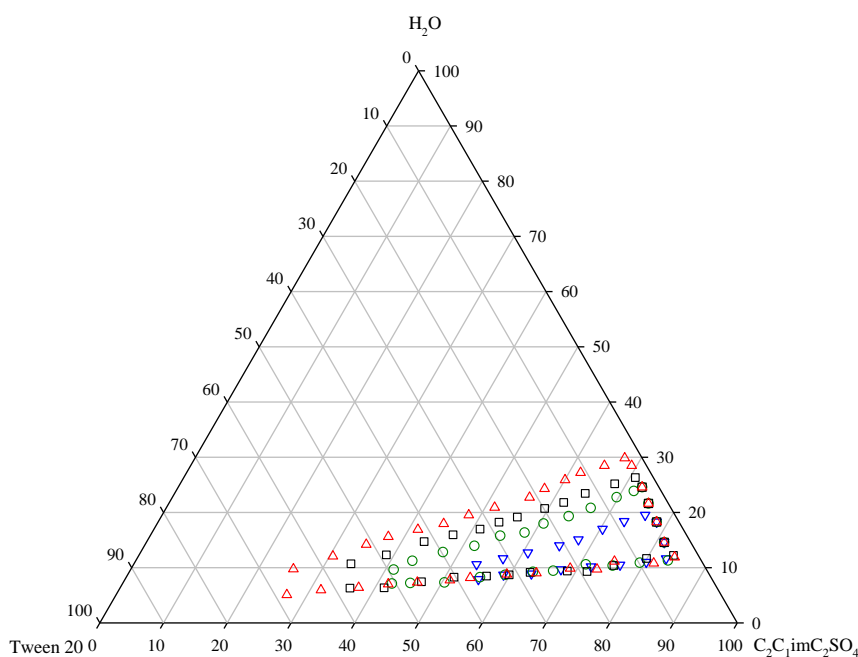


Figura 10: Datos de la curva binodal {Tween 20 (1) + C₂C₁imC₂SO₄ (2) +H₂O (3)} a T = 25 °C (▽), 40 °C (○), 50 °C (□), 60 °C (△) y P = 101,33 kPa.

La razón de este comportamiento se debe al potencial de estos agentes *salting-out* para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, de modo que se favorece la hidratación del líquido iónico en detrimento del surfactante. Por el contrario, las fuerzas

intermoleculares se debilitan cuando se usa un líquido iónico menos hidrofílico ($C_2C_{1im}C_2SO_4$), lo que se traduce en una región inmiscible de menor tamaño.

Además, la ventana de inmiscibilidad generada por el $C_2C_{1im}C_2SO_4$ con Tween 20 es menor que las generadas por este mismo líquido iónico con Triton X-100 y X-102 (Álvarez et al. 2014 b). Se observa por lo tanto una mayor capacidad para generar regiones bifásicas más amplias cuando se utilizan surfactantes de la familia Triton en vez de la del Tween. Al analizar el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de cada uno, se observa que en los casos del Triton X-100 y del Triton X-102 son de 13,5 y 14,4, respectivamente, mientras que el Tween 20 tiene valor de 16,7. La explicación de este comportamiento radica en el mismo efecto comentado anteriormente para el líquido iónico, ya que la competición entre este y el surfactante por las moléculas de agua es la que determina la segregación de fases, y la utilización de surfactantes más hidrofílicos (con un mayor HLB) supondrá una mayor afinidad por las moléculas de agua, impidiendo así la solvatación del líquido iónico y la consiguiente formación de fases.

Atendiendo a estas consideraciones, a continuación se estudiaron los sistemas formados por $C_2C_{1im}C_1SO_4$ (líquido iónico más hidrofílico) con Triton X-100 y X-102 (más hidrofóbicos) con el fin de ser aplicados para separar los contaminantes modelo.

3.1.2 Determinación de la ventana de inmiscibilidad generada por el $C_2C_{1im}C_1SO_4$ con Triton X-100 y X-102

Una vez determinados los diagramas de fase a diferentes temperaturas, los cuales se presentan en la Figura 11, se puede concluir que, para estos compuestos, la región de inmiscibilidad ocupa casi la mitad del área de diagrama ternario, detectándose que la adición de pequeñas cantidades de surfactante a disoluciones acuosas de $C_2C_{1im}C_1SO_4$ (en un porcentaje de masa mayor del 60%) desencadena la formación inmediata de fases. Este comportamiento se mantiene a las tres temperaturas estudiadas, y sólo se registra un aumento sutil (de aproximadamente 2%) en la zona bifásica cuando al aumentar la temperatura. Este incremento de la región de inmiscibilidad con la temperatura en los sistemas estudiados sigue la tendencia registrada en los sistemas acuosos bifásicos tradicionales compuestos de polímeros y sales, lo que implica que el líquido iónico está jugando el papel de las sales convencionales. En cualquier caso, se puede afirmar que estos sistemas son robustos frente a las variaciones de temperatura típicas asociadas con condiciones ambientales normales (por ejemplo oscilación de temperatura invierno/verano o día/noche) ya que no tienen efectos negativos destacables sobre la capacidad de

segregación de fases. Se ha de destacar que este tipo de variaciones depende en gran medida de la naturaleza del catión del líquido iónico, ya que la utilización de cationes como los amonios son más sensibles a los cambios de temperatura (Álvarez et al. 2015 b), lo que pone de manifiesto la relevancia de una selección adecuada del líquido iónico como agente de separación.

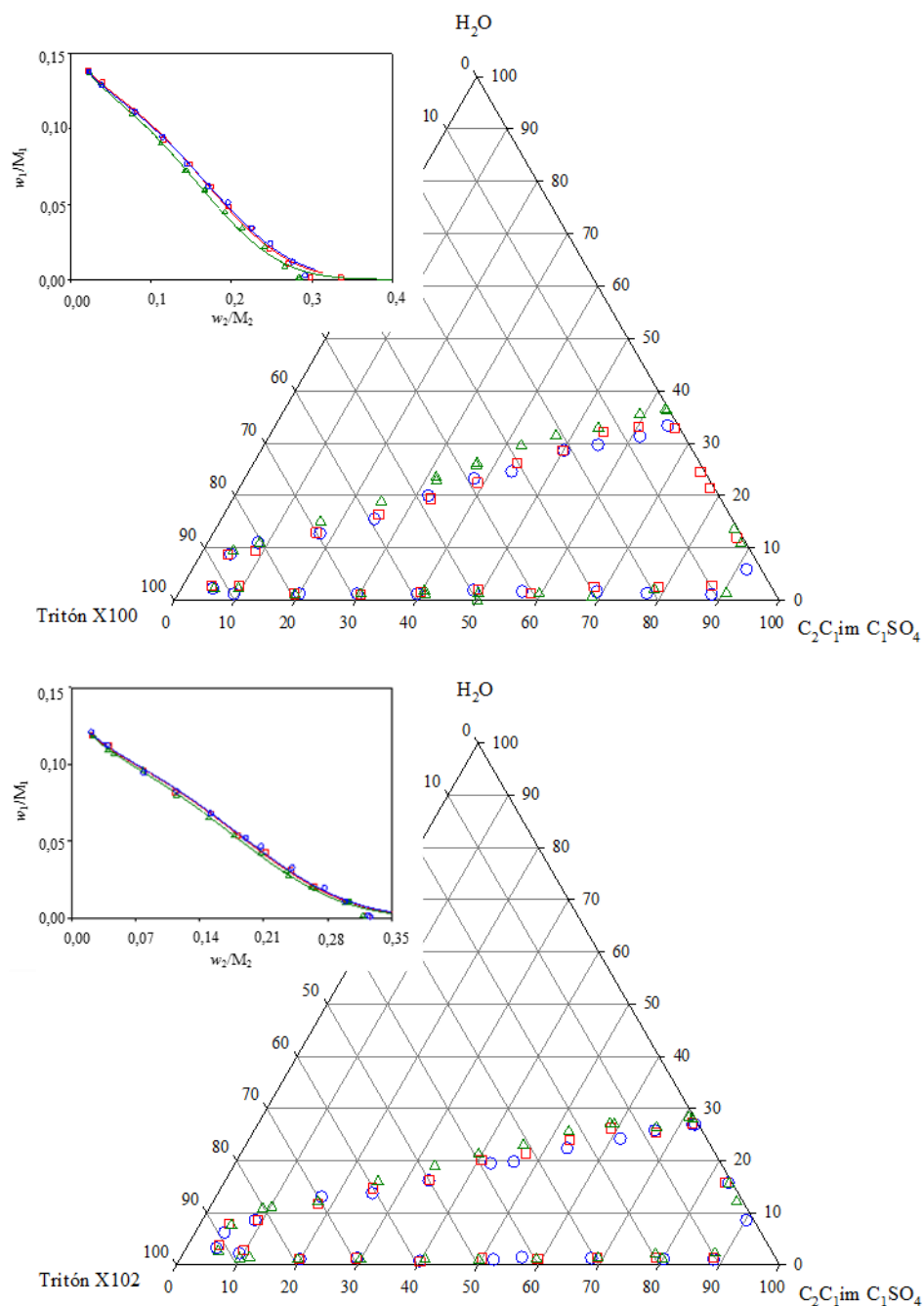


Figura 11: Regiones de inmiscibilidad en los diagramas ternarios y representación ortogonal para los sistemas de Triton X-100 (arriba) o Triton X-102 (abajo) + C₂C₁imC₁SO₄ + agua a 20°C (○), 30°C (□), 40°C (△) y P = 101,33 kPa. Las líneas sólidas en el ortogonal representan el modelo teórico.

Para confirmar la importancia de una correcta elección del líquido iónico se analizó de nuevo la naturaleza química del mismo, centrándose en la longitud de cadena alquílica en el anión con el fin de comprobar la hipótesis de que los líquidos iónicos con cadenas más cortas tienen mayor capacidad *salting-out*, (Álvarez et al. 2014 b). La visualización de los datos mostrados en la Figura 12 en representación ortogonal, permite comparar la capacidad de segregación de $C_2C_{1im}C_1SO_4$ y $C_2C_{1im}C_2SO_4$, confirmando las tendencias comentadas anteriormente relativas a una mayor interacción con las moléculas de agua de líquidos iónicos de cadena más corta.

Análogamente, la selección de un agente tensioactivo con mayor grado de hidrofobicidad tal como el Triton X-100 implica curvas binodales más cercanas al vértice de agua, debido a una migración más sencilla del tensioactivo en la presencia del líquido iónico.

Una vez que se demostró la idoneidad de los agentes *salting-out* seleccionados para la etapa de separación de los contaminantes, los datos experimentales de estos sistemas ($C_2C_{1im}C_1SO_4$ con Triton X100 ó Triton X-102) se ajustaron a diferentes modelos empíricos con el fin de averiguar cuál de ellos proporcionaba una mejor descripción de las curvas de binodales (Álvarez et al. 2015 a, Torres-Plasencia et al. 2015):

$$w_1 = a \cdot \ln(w_2 + b) + c \quad (\text{Ec. 1})$$

$$w_1 = d \cdot \exp(ew_2^{0.5} - fw_2^3) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$w_1 = g + hw_2^{0.5} + iw_2 + jw_2^2 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$w_1 = \exp(k + lw_2^{0.5} + mw_2 + nw_2^2) \quad (\text{Ec. 4})$$

$$w_1 = o \exp(pw_2^q + rw_2^s) \quad (\text{Ec. 5})$$

donde el porcentaje en masa de surfactante y líquido iónico están representados por w_1 y w_2 , respectivamente. En todos los casos, los parámetros se obtuvieron mediante la minimización de la desviación estándar (σ):

$$\sigma = \left(\frac{\sum_i^{n_{DAT}} (z_{exp} - z_{adjust})^2}{n_{DAT}} \right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 6})$$

siendo z_{exp} y z_{adjust} los valores experimentales y teóricos, respectivamente, y n_{DAT} el número de datos.

Los valores de los parámetros de ajuste se recogen en las Tablas a.1 y a.2 (Anexo I) junto a los valores de desviación estándar, los cuales pueden apreciarse en la Figura 13.

El análisis de las desviaciones permite concluir que todos los modelos describen adecuadamente las curvas binodales, ya que los valores son siempre inferiores a 0,003. Se ha destacado la ecuación polinómica (Ec. 3) dado que es la que proporciona un mayor grado de ajuste de los datos experimentales para los dos agentes tensioactivos, lo que hace evidencia la necesidad de nuevos estudios en este campo, ya que la ecuación Merchuk (Ec. 2) es la más frecuentemente utilizada para modelar las curvas de solubilidad en sistemas bifásicos acuosos (Freire et al. 2012 b).

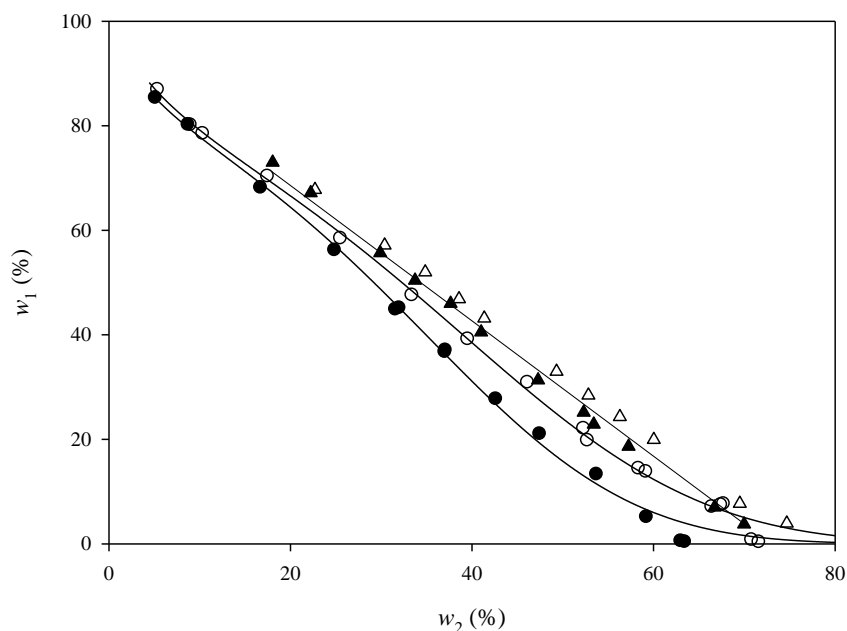


Figura 12. Comparativa de las regiones de fase para las disoluciones acuosas de: $C_2C_1imC_1SO_4$ con (●) Triton X-100 o (○) Triton X-102; $C_2C_1imC_2SO_4$ (20) con (▲) Triton X-100 o (△) Triton X-102 a 40°C y $P = 101,33$ kPa. Las líneas sólidas representan el modelo teórico y los símbolos los datos experimentales.

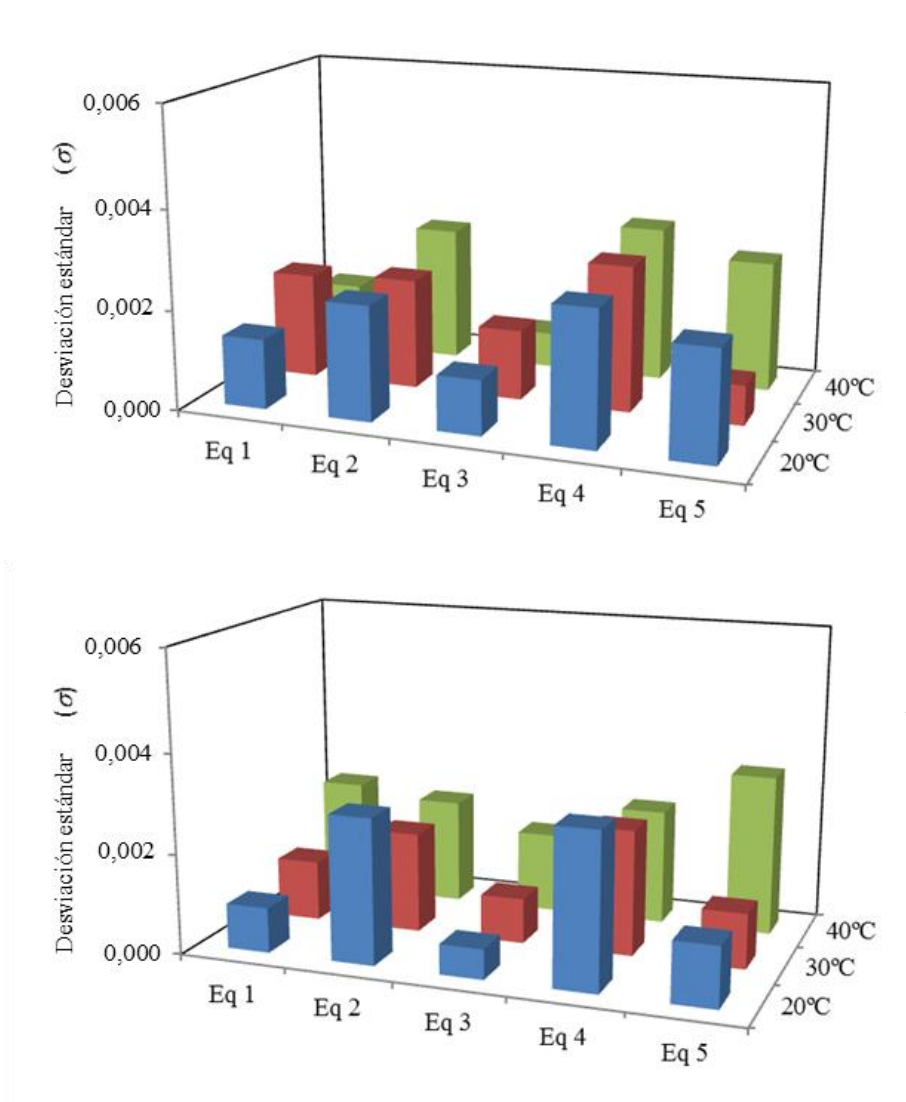


Figura 13: Desviación estándar de las cinco ecuaciones empíricas utilizadas para correlacionar las curvas binodales en presencia de Triton X-100 (a) y Triton X-102 (b): 20°C (azul), 30°C (rojo) and 40°C (verde).

3.2 Rectas de reparto

Después de determinar los límites del área de inmiscibilidad se abordó la determinación de las rectas de reparto con el fin de definir por completo la capacidad de extracción de cada uno de los sistemas estudiados. Por lo tanto, una vez realizadas las separaciones empíricamente se recopilaron los valores obtenidos en las Tablas a.3 y a.4 y se presentaron en las Figuras a.1, a.2 y a.3 (todas incluidas en el Anexo I). La Figura 14 muestra el procedimiento utilizado para determinar distintas rectas de reparto y el resultado de la extracción de la fase pesada (inferior) mediante jeringas y sin romper la interfase. Esta muestra recogida puede medirse directamente desde la jeringa en el densímetro y refractómetro para determinar su composición.

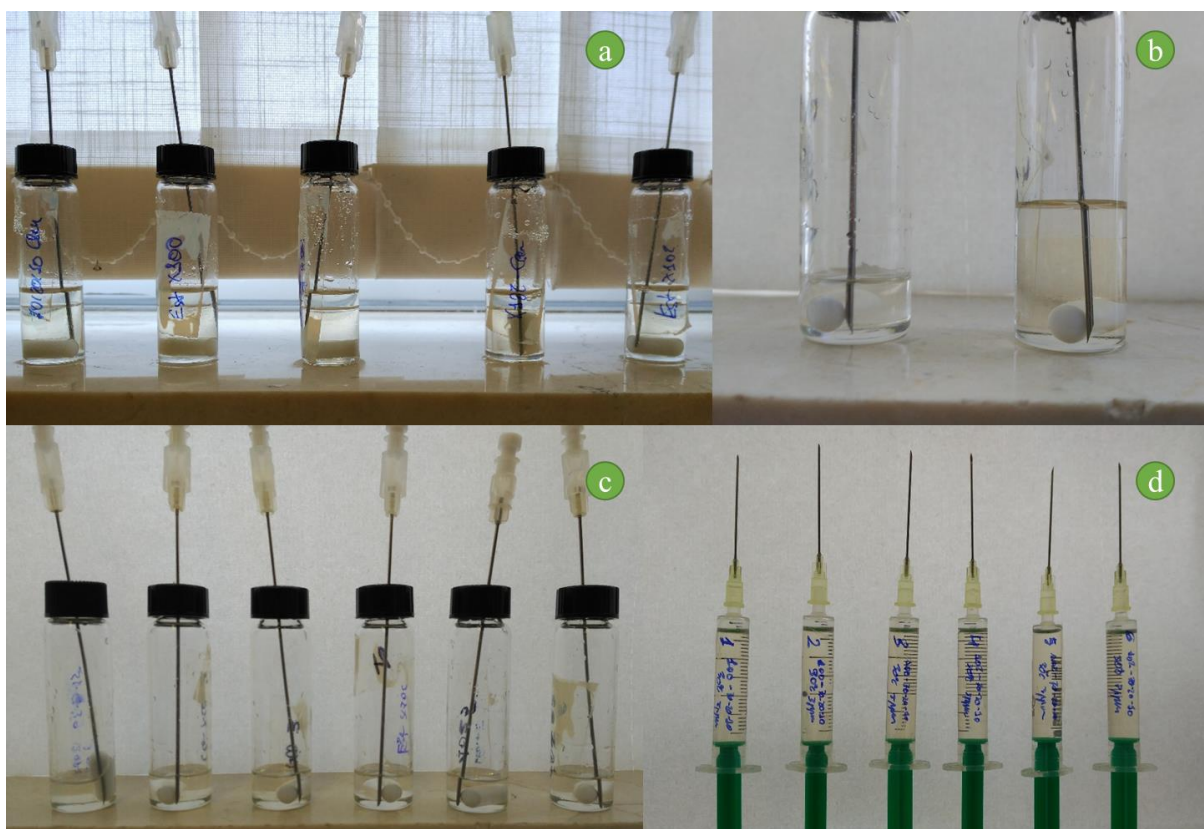


Figura 14: Material utilizado para el cálculo de las rectas de reparto; a) Tubo con las dos fases, b) Comparativa de un tubo con una de las fases y la interfase con otro tubo con ambas fases, c) Tubos con la interfase y toda la fase superior, d) Jeringas con la fase inferior.

Además, se utilizó la ecuación de Othmer-Tobias (Othmer et al. 1942) para averiguar la consistencia termodinámica de los datos de las rectas de reparto:

$$\left(\frac{1 - w_1^I}{w_1^I} \right) = n \left(\frac{1 - w_2^{II}}{w_2^{II}} \right)^m \quad (\text{Ec. 7})$$

donde w_1 y w_2 son las concentraciones de surfactante y líquido iónico, respectivamente, I y II se refieren a las fases superior e inferior, respectivamente, y n y m son los parámetros de ajuste. Los valores de los parámetros de la ecuación se recogen en las Tablas a.5 y a.6 del Anexo I, junto con los coeficientes de regresión, y sus valores próximos a la unidad demuestran un elevado grado de consistencia termodinámica, en línea con lo demostrado para el mismo líquido iónico basado en el anión etilsulfato (Álvarez et al. 2014b). Esta ecuación también demostró ser adecuada para el $C_2C_{1m}C_2SO_4$ con anterioridad (Álvarez et al. 2014b).

Por otro lado, con el fin de proporcionar una descripción más exhaustiva de las rectas de reparto, se calcularon la longitud (TLL) y la pendiente (S) de las mismas, dado que proporcionan información valiosa para definir la calidad del proceso de separación:

$$TLL = \left[(w_1^I - w_1^{II})^2 + (w_2^I - w_2^{II})^2 \right]^{0.5} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$S = \frac{w_1^I - w_1^{II}}{w_2^I - w_2^{II}} \quad (\text{Ec. 9})$$

Los valores calculados de TLL y S recogidos en la Tabla a.3 muestran que se obtienen rectas de reparto más largas y con mayor pendiente conforme se agrega más agente segregante a la disolución acuosa de surfactantes no iónicos, tanto Tween 20 como Triton X-100 y Triton X-102. En la misma línea, se obtuvo una mayor pureza de la fase rica en surfactante cuando se aumentó la cantidad de líquido iónico ($C_2C_{1im}C_1SO_4$), y esta tendencia se mantiene para todas las temperaturas en los dos surfactantes investigados (Triton X-100 y Triton X-102). Por ello, se seleccionó la recta de reparto que permite una mayor pureza de surfactante en la fase superior (siempre mayor que 90%) para la extracción de los contaminantes modelo etinilestradiol y clembuterol.

3.3 Optimización de las condiciones de extracción del etinilestradiol y el clembuterol

La siguiente etapa de este trabajo a tratar fue el análisis de la capacidad de extracción de los contaminantes emergentes clembuterol y etinilestradiol en sistemas formados por $C_2C_{1im}C_1SO_4$ y Triton. Para ello se evaluó la partición de los contaminantes en efluentes acuosos de forma independiente y mezclados. Para cuantificar la viabilidad de los sistemas propuestos se utilizó la eficiencia de la extracción, que se calculó según se indica a continuación:

$$E (\%) = \left(\frac{m_i^I}{m_i} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

donde m_i^I es la masa de contaminante en la fase rica en surfactante (fase superior) y m_i la cantidad añadida inicialmente, respectivamente.

La Figura 15 muestra los embudos de decantación utilizados para obtener la mayor cantidad posible de cada fase pura, despreciando la interfase. Esto permite recogerlas en recipientes graduados distintos para medir el volumen (o mediante pesada y con la densidad obtener el volumen) de muestra recogida y determinar su composición con la densidad e índice de refracción, así como detectar la concentración de contaminante

extraída (inyección en HPLC) y relacionándola con el volumen medido obtener la cantidad extraída aplicando la Ec. 10.

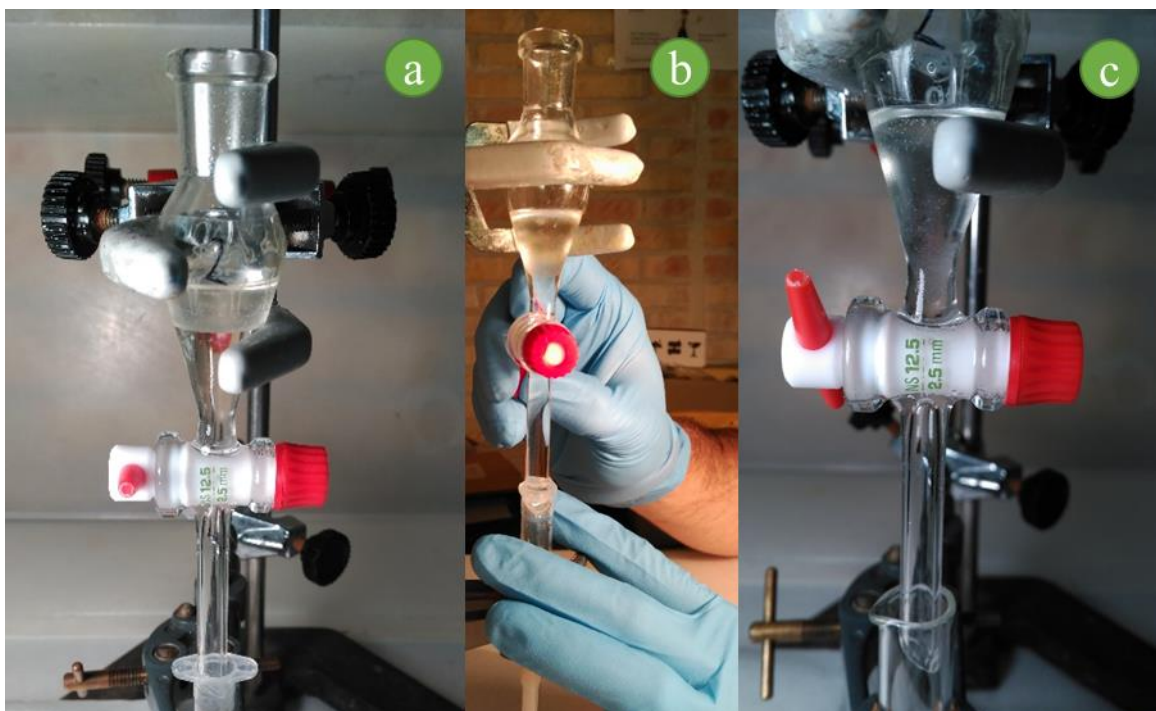


Figura 15: Embudos de decantación utilizados para evaluar la capacidad de separación del sistema; a) Embudo con las dos fases, b) Recogida de la fase inferior, c) Fase superior separada de la inferior.

Por un lado, el análisis de los datos obtenidos revela una gran afinidad del etinilestradiol por la fase rica en surfactante, obteniéndose en todos los casos niveles de extracción de prácticamente el 100% para ambos surfactantes y a todas las temperaturas.

Por otro lado, los niveles de partición de clenbuterol a la fase superior son también bastante elevados (alrededor de 55% de la extracción), como se puede observar en la Figura 16.

En general, los resultados obtenidos en los ensayos con ambos contaminantes simultáneamente no difieren significativamente de aquellos en los que se estudiaban individualmente, y la operación a diferentes temperaturas y con distintos surfactantes no parece alterar la capacidad de extracción. Por el contrario, la naturaleza química de ambos contaminantes es decisiva para explicar las divergencias en la capacidad de migración. De este modo, la mayor hidrofobicidad del etinilestradiol ($\log P = 3,90$) promueve su partición preferencial hacia la fase rica en tensioactivo, mientras que el clenbuterol, más hidrofílico ($\log P = 2,33$), permanece en gran medida en la fase pesada (www.chemspider.com).

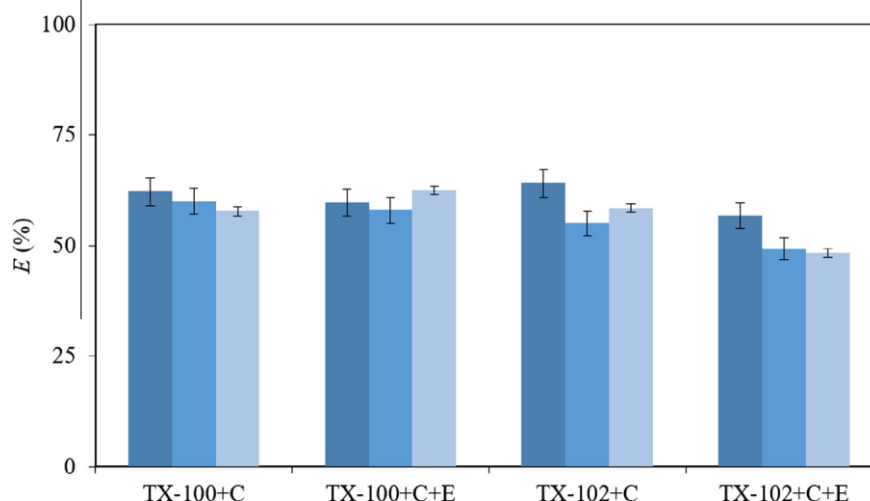


Figura 16: Extracción de clenbuterol en sistemas que contienen Triton X-100 o Triton X-102 con clenbuterol individualmente (C) y mezclado con ethynylestradiol (C+E) a (■) 20°C, (■) 30°C, (■) 40°C y $P = 101,33$ kPa.

Estos resultados constituyen un valioso punto de partida para optimizar la extracción selectiva de ambos contaminantes. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue reducir al máximo la presencia de clenbuterol en la fase superior mientras se mantiene la segregación completa de etinilestradiol en esta fase. Para ello se consideraron variables clave como la temperatura, el pH y la composición de la alimentación. El rango de operación para dichas variables se definió tras un experimento preliminar que permitiese identificar la zona en la que no hubiese problemas operacionales significativos.

Se utilizó un diseño central compuesto de tipo centrado en las caras para optimizar adecuadamente las variables seleccionadas utilizando la metodología de superficie de respuesta, ya que permite analizar estadísticamente las respuestas a los cambios de variables cuando se estudian tres factores a la vez (Montgomery 2001). Por lo tanto, se llevaron a cabo 20 experimentos para incluir temperaturas entre 20 y 40°C, pH entre 2 y 4, y concentraciones de líquidos iónico en la alimentación que varían desde el 18 hasta el 72%, manteniendo estos puntos de trabajo siempre sobre la misma recta de reparto (Figura 17). En todos los experimentos, el etinilestradiol particionó completamente hacia la fase superior (rica en surfactante), a todos los valores de temperatura, pH y concentración de líquido iónico.

En vista de estos resultados positivos, el siguiente paso para la consecución de un proceso de extracción selectivo competitivo incluyó el análisis de la varianza (ANOVA) para los resultados de la extracción de clenbuterol (*software* Design Expert® 8.0.0). Como se muestra en la Tabla 5, una ecuación polinómica de segundo orden permitió correlacionar de forma fiable las variables seleccionadas:

$$Y = b_0 + b_A X_A + b_B X_B + b_C X_C + b_{AB} X_A X_B + b_{AC} X_A X_C + b_{BC} X_B X_C + b_{AA} X_A^2 + b_{BB} X_B^2 + b_{CC} X_C^2$$

(Ec. 11)

siendo Y la variable de respuesta (extracción clembuterol), X_i las variables independientes (pH, T y concentración de líquido iónico en la corriente de alimentación), y b_i , b_{ii} y b_{ij} los parámetros del modelo.

A pesar de las limitaciones del valor P resaltadas por Goodman (2016), se considera que esta herramienta puede arrojar luz sobre el significado de los datos experimentales. Atendiendo a esta consideración, se utilizó este parámetro para dilucidar la idoneidad de un modelo cuadrático para describir adecuadamente la superficie de respuesta 3D. En este sentido, los valores de "Prob> F" de menos de 0,05 y el coeficiente de correlación múltiple ($R^2 = 0,977$) sugieren que el modelo cuadrático es significativo y fiable. Además, la comparación de la gama de valores predichos con el valor del error de predicción medio de 22,95 (claramente superior a 4) indica que el modelo presenta una precisión correcta. En relación con la importancia de los factores estudiados y sus interacciones lineales y de segundo grado, los datos de la Tabla a.7 demuestran que los términos del modelo que pueden considerarse significativos son X_A , X_C , X_{BC} ("Prob> F" inferior a 0,05), lo que significa que el pH es la única variable cuya influencia puede ser despreciada para optimizar la extracción de clembuterol. Por lo tanto, la Ec. 11 se puede reescribir teniendo en cuenta sólo las variables significativas y los valores finales de los parámetros optimizados incluidos en la Tabla a.7 (Anexo I).

Como se mencionó anteriormente, la significatividad estadística de las variables seleccionadas debe ir inevitablemente acompañada de un análisis cuidadoso de los datos experimentales, donde se observa que sólo la concentración de líquido iónico y la temperatura conllevan cambios importantes en la respuesta clembuterol, tal y como se puede comprobar en la representación 3-D de la superficie de respuesta (Figura 17). Se puede apreciar también cómo la variación de la concentración de líquido iónico en la recta de reparto seleccionada modifica decisivamente la eficacia de la extracción de clembuterol, y su reducción del 72 al 18% implica una partición casi completa de este compuesto a la fase inferior (aproximadamente 3% en la fase superior). Por lo tanto, la optimización de los parámetros para el intervalo estudiado permitió obtener niveles de extracción de 4,2% a 40 °C, pH 2 y 72% de concentración de líquido iónico inicial sobre la recta de reparto seleccionada (Figura 17).

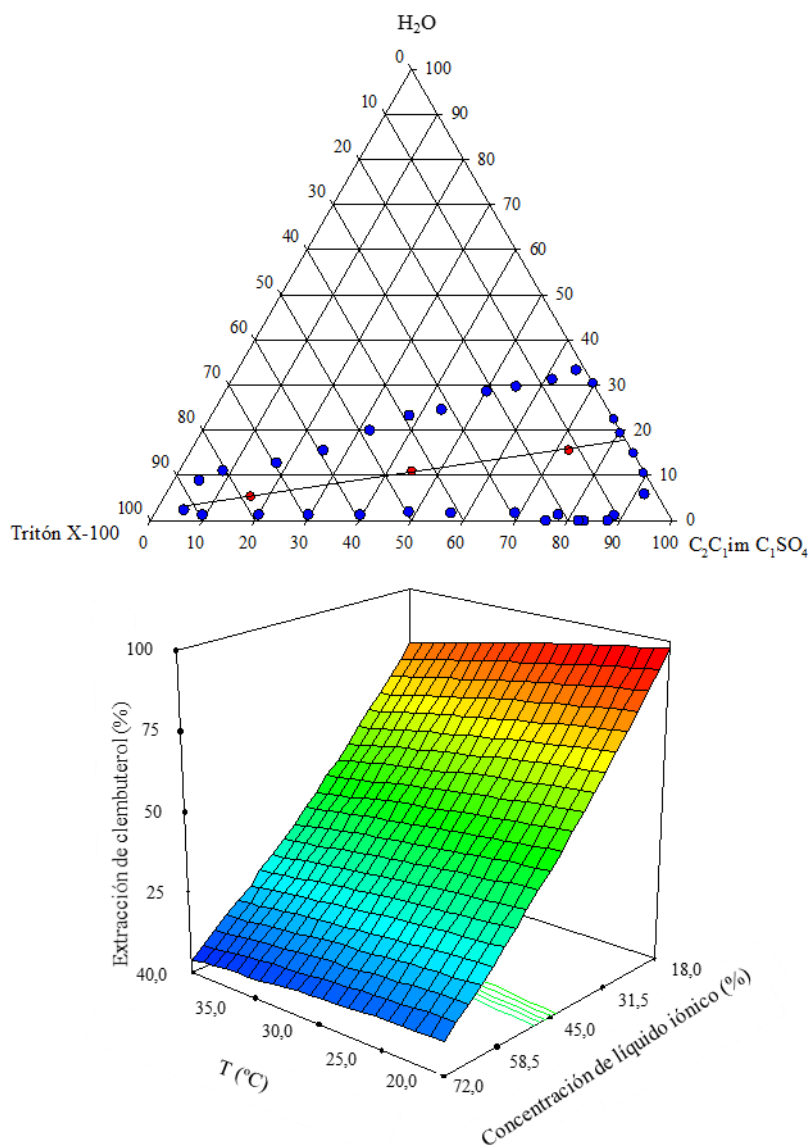


Figura 17: Recta de reparto de operación (superior) y superficie de respuesta (inferior) de la extracción de clenbuterol para diferentes temperaturas y concentración de líquido iónico en la corriente de alimentación en la recta de reparto.

Teniendo en cuenta estos resultados, se propone un proceso secuencial para la separación selectiva de etinilestradiol y clenbuterol de acuerdo al diagrama de flujo que se incluye en la Figura 18. La estrategia comienza con un paso que consiste en la adición de una mezcla binaria de Triton X-100 y $C_2C_1imC_1SO_4$ al efluente acuoso que contiene ambos contaminantes (corrientes F1 y F2, respectivamente) con el fin de alcanzar el punto marcado con "ABS-1" en la recta de reparto que se indica en la Figura 18, en las condiciones optimizadas mencionadas anteriormente. Después de la separación de fases, se obtiene una fase rica en surfactante (R1) que contiene todo el etinilestradiol, mientras que la mayor parte del clenbuterol es retenido en la fase rica en líquido iónico (E1). Este

último se introduce de nuevo en la segunda etapa de extracción junto con surfactante puro con el fin de alcanzar el punto marcado como "ABS-2" en la Figura 18, según se infiere de la maximización para la migración de clembuterol a la capa superior obtenida con Design-Expert 7.0.0. Por lo tanto, la operación a 20°C, pH 2,2 y 18,3% de la concentración de líquido iónico hace que sea posible llegar a más de un 97% de la extracción clembuterol esta vez en la nueva corriente de salida rica en surfactante (R2). Por último, se evaluó la viabilidad de las condiciones optimizadas obtenidas para la separación del punto ABS-1, utilizando una muestra de orina sintética (Passos et al. 2012), y se comprobó que utilizando los óptimos del modelo se consigue la separación selectiva de etinilestradiol y clembuterol, logrando en la etapa clave que el clembuterol sea extraído mayoritariamente en la fase inferior (95,8%).

En resumen, la estrategia propuesta permite la separación selectiva del etinilestradiol y del clembuterol de disoluciones acuosas y constituye un primer paso prometedor para identificar y concentrar este tipo de contaminantes emergentes en efluentes residuales.

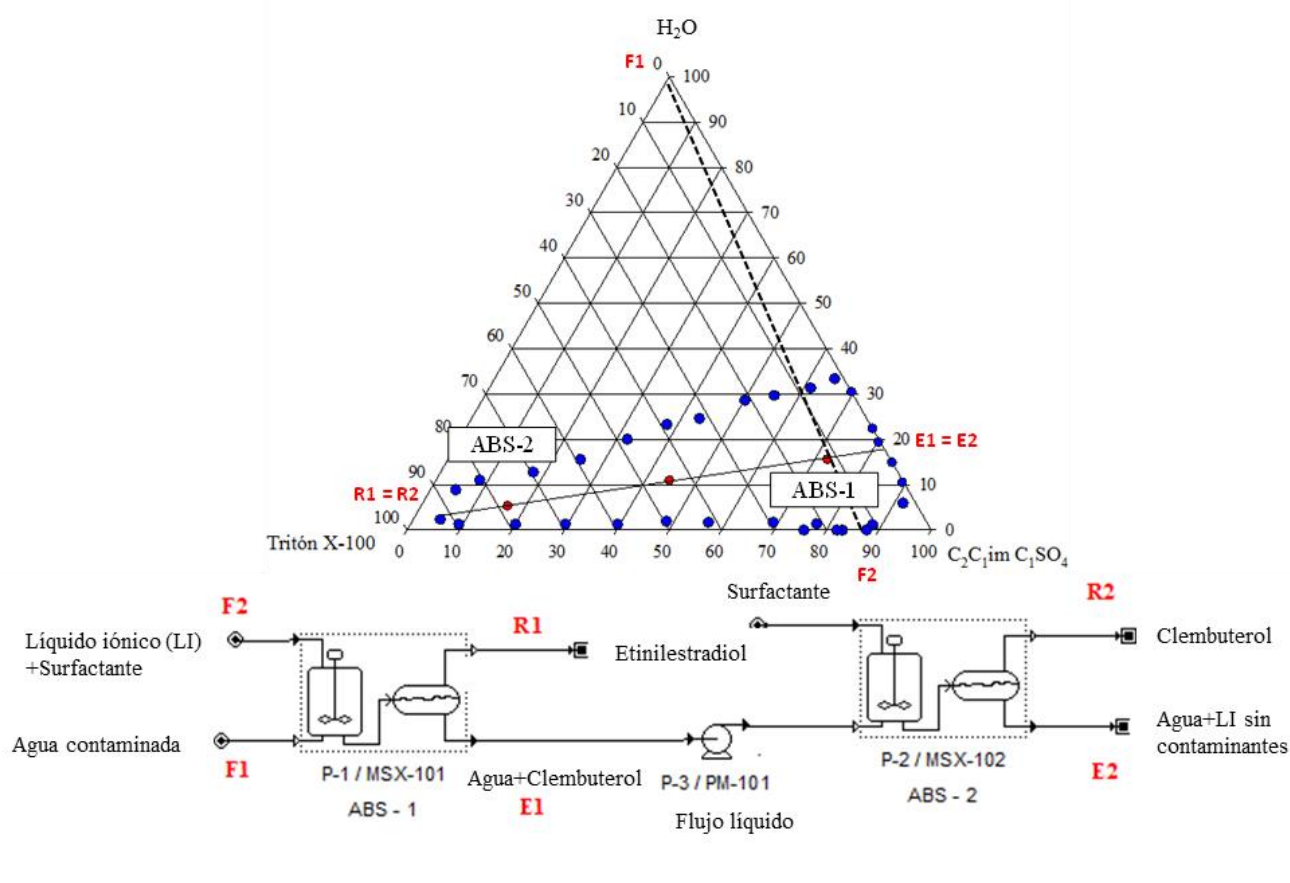


Figura 18: Diagrama ternario (superior) que contiene la alimentación (F1 y F2), equilibrio (E y R) y puntos de operación (ABS-1 y ABS-2), y diagrama de flujo (inferior).

4 CONCLUSIONES

Este trabajo representa una primera contribución para demostrar la idoneidad de los líquidos iónicos comerciales en base de imidazolio para generar sistemas con potencial para separar selectivamente contaminantes emergentes (clembuterol y 17 α -etinilestradiol) a partir de disoluciones acuosas que contienen surfactantes no iónicos comerciales.

Se ha comprobado cómo, de acuerdo con la bibliografía, la temperatura es un factor con un efecto reducido a la hora de generar una región de inmiscibilidad mayor en sistemas acuosos bifásicos que usan líquidos iónicos en base imidazolio (sistemas robustos frente a cambios de temperatura) mientras que la naturaleza química del líquido iónico y surfactante utilizados es decisiva, siendo preferible que sean lo más hidrofílico y lo más hidrofóbico posible, respectivamente. Conforme al fin de este trabajo, para el sistema más prometedor se ha comprobado la capacidad de separar ambos compuestos objeto de estudio en distintas fases, alcanzando una recuperación total del estradiol en la fase superior y sobre un 55% del clembuterol en la misma.

Mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta se ha estudiado el comportamiento de la recuperación de cada molécula modelo a través de la modificación de variables clave como la temperatura de operación, el pH y la concentración de líquido iónico en la alimentación. Con ella se ha logrado minimizar (en la primera etapa) y maximizar (en la segunda etapa) la segregación del clembuterol a la fase superior manteniendo el reparto del estradiol en ambos casos en la fase superior. En este sentido, se demostró que el factor crucial a tener en cuenta para controlar el proceso de separación es la concentración de la alimentación en una recta de reparto definida, ya que el cambio 18-72% de líquido iónico supone una variación de la extracción de clembuterol desde 4,2 hasta 97,4%, mientras que cambios en la temperatura tiene una influencia reducida y fluctuaciones de una unidad de pH un efecto despreciable.

Todo ello ha permitido plantear una estrategia secuencial de separación operativa para recuperar cada contaminante modelo de la corriente acuosa mediante dos etapas distintas.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Albertsson, P.A. (1986), Partitioning of cell particles and macromolecules, New York, EEUU, Ed. John Wiley and Sons.
- Álvarez, M.S., Moscoso, F., Rodríguez, A., Sanromán, M.A., Deive F.J. (2013), Novel physico-biological treatment for the remediation of textile dyes-containing industrial effluents, *Bioresour. Technol.* 146, 689-695.
- Álvarez, M.S., Moscoso, F., Rodríguez, A., Sanromán, M.A., Deive F.J. (2014a), Hybrid sequential treatment of aromatic hydrocarbon-polluted effluents using non-ionic surfactants as solubilizers and extractants, *Bioresour. Technol.* 162, 259-265.
- Álvarez, M.S., Rivas, M., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Rodríguez, A. (2014b), Ionic liquids and non-ionic surfactants: a new marriage for aqueous segregation, *RSC Adv.* 4, 32698-32700.
- Álvarez, M.S., Esperança, J.M.S.S., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Rodríguez, A. (2015a), A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants, *Sep. Purif. Technol.* 153, 91-98.
- Álvarez, M.S., Patiño, F., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Rodríguez, A. (2015b), Aqueous immiscibility of cholinium chloride ionic liquid and Triton surfactants, *J. Chem. Thermodyn.* 91, 86-93.
- Deive, F.J., Rodríguez, A., Pereiro, A.B., Araújo, J.M.M., Longo, M.A., Coelho, M.A.Z., Canongia Lopes, J.N., Esperança, J.M.S.S., Rebelo, L.P.N., Marrucho, I.M. (2011) Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction. *Green Chemistry* 13, 390-396.
- Deive, F.J., Rodríguez, A., Rebelo, L.P.N., Marrucho, I.M. (2012), Extraction of *Candida antarctica* lipase A from aqueous solutions using imidazolium-based ionic liquids, *Sep. Purif. Technol.* 97, 205-210.
- ELSEVIER, búsqueda con las palabras “ionic liquids”, recuperado el día 31/10/2016. <https://www.scopus.com/>.
- Freire, M.G., Neves, C.M.S.S., Marrucho, I.M., Canongia Lopes, J.N., Rebelo, L.P.N., Coutinho, J.A.P. (2010) High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. *Green Chemistry* 12, 1715-1718.
- Freire, M.G., Cláudio, A.F.M., Araujo, J.M.M., Coutinho, J.A.P., Marrucho, I.M., Canongia Lopes, J.N., Rebelo, L.P.N. (2012), Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.* 41, 4966-4995.
- Giordani, L., Cuzziol, N., Del Pinto, T., Sánchez, M., Maccari, S., Massimi, A., Pietraforte, D., Viora M. (2015), β -2 agonist clenbuterol hinders human monocyte differentiation into dendritic cells, *Exp. Cell Res.* 339, 163-173.
- Gonzalez, A., Avivar, J., Cerda, V. (2015), Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction prior silylation and gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1413,1-8.
- Goodman, S. N. (2016), Aligning statistical and scientific reasoning, *Science* 352, 1180-1181.
- GRUNDFOS BIOBOOSTER, Open up for Denmark's most advanced WWTP, recuperado el día 21/09/2016, <http://www.grundfod.com/~wastewater-treatment-at-herlev-hospital-denmark.html>.
- Gutowski, K.E., Broker, G.A., Willauer, H.D., Huddleston, J.G., Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Rogers R.D. (2003), 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.* 125, 6632-6633.
- Inoue, G., Shimoyama, Y., Su, F.F., Takada, S., Iwai, Y., Arai, Y. (2007) Measurement and correlation of partition coefficients for phenolic compounds in the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/water two-phase system. *Journal of Chemical and Engineering Data* 52, 98-101.
- Lee, W.Y., Kim, K.S., You, J.K., Hong, Y.K. (2016), Effect of Cations in Ionic Liquids on the Extraction Characteristics of 1,3-Propanediol by Ionic Liquid-based Aqueous Biphasic Systems, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 572-576.
- Masi, F., El Hamouri, B., Abdel Shafi, A., Baban, H., Ghrabi, A., Regelsberger, M. (2010), Treatment of segregated black/grey domestic wastewater using constructed wetlands in the Mediterranean basin: the zero-m experience, *Water Sci. Technol.* 61, 97-105.

- Montgomery, D.C. (2001), *Design and Analysis of Experiments*, New York, EEUU, 5th Ed. John Wiley and Sons.
- Othmer, D.F., Tobias, P.E. (1942), Liquid-Liquid extraction data. The line correlation, *Ind. Eng. Chem.* 34, 693- 696.
- Passos, H., Sousa, A.C.A., Pastorinho, M.R., Nogueira, A.J.A., Rebelo, L.P.N., Coutinho, J.A.P., Freire, M.G. (2012), Ionic-liquid-based aqueous biphasic systems for improved detection of bisphenol A in human fluids, *Anal. Methods* 4, 2664-2667.
- Pauwels, B., Verstraete, W.J. (2006), The treatment of hospital wastewater: an appraisal, *Water Health.* 4, 405-416.
- Plechkova, N.V., Seddon K.R. (2008), Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chem. Soc. Rev.* 37, 123-150.
- Postigo, C., Richardson, S.D. (2014), Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment, *J. Hazard. Mater.* 279, 461-475.
- Ranyere, L., Souza, R.L., Lima, R.A., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S. (2015), Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification, *Sep. Purif. Technol.* 155, 118-126.
- Royal Society of Chemistry, búsqueda con las palabras “clembuterol” y “etinilestradiol”, recuperado el 24/06/2016, <http://www.chemspider.com>.
- Sadeghi, R., Hamidi, B., Ebrahimi, N. (2014), Investigation of amino acid-polymer aqueous biphasic systems, *J. Phys. Chem. B.* 118, 10285-10296.
- Soto, A., Arce, A., Khoshkbarchi, M.K. (2005) Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid, *Sep. Purif. Technol.* 44, 242-246.
- Torres-Plasencia, G., Gutiérrez-Armillas, E., Deive, F.J., Sanromán, M.A., Rodríguez, A. (2015), Triggering phase disengagement of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids by using inorganic and organic salts, *J. Chem. Thermodyn.* 88, 1-7.
- Ventura, S.P.M., Barros, R.L.F., Barbosa, J.M.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S., Coutinho, J.A.P. (2012) Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry* 14, 734-740.
- Verlicchi, P., Zambello, E. Predicted and measured concentrations of pharmaceuticals in hospital effluents. Examination of the strengths and weaknesses of the two approaches through the analysis of a case study, *Sci. Total Environ.* 565 (2016) 82–94.
- Ulloa, G., Coutens, C., Sánchez, M., Sineiro, J., Fábregas, J., Deive, F.J., Rodríguez, A., Núñez, M.J. (2012a) On the double role of surfactants as microalga cell lysis agents and antioxidants extractants. *Green Chemistry* 14, 1044-1051.
- Walter H., Brooks D. E. and Fisher D. (Eds) (1985) *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology.* Orlando, EEUU, Academic Press,
- Walden, P. (1914), Ueber die Molekulargröße und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenen Salze , *Bull. Acad. Imper. Sci. St. Petersburg*, 8, 405–422.
- Yu-li Lo (2003), Relationships between the hydrophilic–lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines, *J. Control. Release* 90, 37-48.
- Zhang, C., Li, Y., Wang, C., Niu, L.H., Cai, W. (2016), Occurrence of endocrine disrupting compounds in aqueous environment and their bacterial degradation: A review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 46, 1-59.

ANEXO I

1 Tablas

Tabla a.1: Parámetros de las ecuaciones de correlación y desviaciones estándar para Triton X-100 (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) + H₂O (3) a distintas temperaturas.

<i>T</i> /°C	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			<i>σ</i>		
20	-2.9522	5.6804	5.2789			0.0014		
30	-0.8014	1.4075	0.4275			0.0021		
40	-3.0209	5.5920	5.3489			0.0013		
<i>T</i> /°C	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>			<i>σ</i>		
20	0.1664	-1.2679	90.25			0.0023		
30	0.1651	-1.1950	96.61			0.0022		
40	0.1684	-1.3660	109.36			0.0027		
<i>T</i> /°C	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>			<i>σ</i>	
20	0.1331	0.1514	-0.8473	0.4192			0.0011	
30	0.1298	0.1968	-0.9686	0.5716			0.0014	
40	0.1348	0.1481	-0.9146	0.5818			0.0007	
<i>T</i> /°C	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	<i>n</i>			<i>σ</i>	
20	-1.3427	-6.5964	17.045	-55.32			0.0027	
30	-1.3114	-7.0280	18.672	-60.03			0.0029	
40	-1.1797	-8.3261	21.828	-68.62			0.0031	
<i>T</i> /°C	<i>o</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>r</i>	<i>s</i>			<i>σ</i>
20	4.8533	-103.17	4.1374	3.0408	0.0396			0.0022
30	0.1441	-12895	9.5298	7.1039	1.4227			0.0008
40	4.8396	-103.18	4.2039	2.9225	0.0459			0.0026

Tabla a.2: Parámetros de las ecuaciones de correlación y desviaciones estándar para Triton X-102 (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) + H₂O (3) a distintas temperaturas.

<i>T</i> /°C	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			<i>σ</i>
20	-2.5531	6.3304	4.8398			0.0009
30	-2.4966	6.1443	4.6605			0.0012
40	-2.3152	5.7487	4.1748			0.0023
<i>T</i> /°C	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>			<i>σ</i>
20	0.1471	-1.3582	66.91			0.0029
30	0.1458	-1.3428	69.02			0.0020
40	0.1477	-1.4498	72.11			0.0021
<i>T</i> /°C	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>i</i>	<i>j</i>	<i>σ</i>	
20	0.1374	-0.0728	-0.2590	-0.1029	0.0006	
30	0.1191	0.0889	-0.6237	0.3192	0.0009	
40	0.1163	0.1121	-0.7111	0.4926	0.0016	
<i>T</i> /°C	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>	<i>n</i>	<i>σ</i>	
20	-1.2696	-8.4484	20.54	-52.79	0.0031	
30	-1.5575	-5.6759	13.78	-43.76	0.0025	
40	-1.4521	-6.6421	15.99	-48.06	0.0023	
<i>T</i> /°C	<i>o</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>σ</i>
20	0.1262	-116322	7.7404	9.6284	1.3243	0.0012
30	0.1233	-12895	9.1498	7.8167	1.4334	0.0011
40	0.1143	-29.24	27.36	2.0860	313.80	0.0032

Tabla a.3: Rectas de reparto experimentales en porcentaje en peso para Tween 20 (1) + C₂C₁imC_nSO₄ (n = 1,2) (2) + H₂O (3) a distintas temperaturas.

Fase rica en Surfactante		Fase rica en Líquido iónico			
100 w ₁ ^I	100 w ₂ ^I	100 w ₁ ^{II}	100 w ₂ ^{II}	TLL	S
Tween 20 (1) + C ₂ C ₁ imC ₁ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)					
25 °C					
69.60	24.34	0.78	83.49	90.7	-1.1635
65.47	25.32	0.89	80.76	85.1	-1.1649
61.80	26.82	0.92	75.98	78.3	-1.2384
40 °C					
76.41	18.04	1.01	84.05	100.2	-1.1423
72.41	19.04	1.17	80.08	93.8	-1.1671
64.96	22.46	1.10	75.23	82.8	-1.2102
50 °C					
79.39	14.79	0.77	81.42	103.1	-1.1799
74.40	16.59	0.61	77.43	95.6	-1.2129
69.69	18.63	0.64	73.24	88.0	-1.2644
60 °C					
81.61	12.34	1.14	80.68	105.6	-1.1775
78.43	12.58	1.22	76.34	100.1	-1.2109
73.10	13.99	1.16	71.24	91.9	-1.2566
Tween 20 (1) + C ₂ C ₁ imC ₂ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)					
25 °C					
36.28	55.56	6.08	82.31	40.3	-1.1290
33.52	56.64	5.01	81.15	37.6	-1.1632
29.96	58.72	4.18	79.24	32.9	-1.2563
40 °C					
49.85	43.52	7.02	79.09	55.7	-1.2041
45.03	45.14	5.82	76.79	50.4	-1.2389
37.67	49.41	4.78	74.09	41.12	-1.3327
50 °C					
55.79	36.68	4.23	81.01	68.0	-1.1631
52.04	37.51	3.32	78.64	63.8	-1.1845
45.53	40.81	2.80	74.74	54.6	-1.2594
60 °C					
66.64	27.66	5.71	79.53	80.0	-1.1747
63.89	28.08	4.95	77.50	76.9	-1.1926
59.23	30.16	4.23	72.96	69.7	-1.2850

Tabla a.4: Rectas de reparto experimentales en porcentaje másico para Surfactante (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) + H₂O (3) a distintas temperaturas.

Fase rica en Surfactante		Fase rica en Líquido iónico			
100 w ₁ ^I	100 w ₂ ^I	100 w ₁ ^{II}	100 w ₂ ^{II}	<i>TLL</i>	<i>S</i>
Triton X-100 (1) + C ₂ C ₁ imC ₁ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)					
20°C					
88.20	4.74	0.00	75.71	113.2	-1.2428
89.56	6.31	0.00	81.99	117.3	-1.1834
90.58	6.27	0.00	83.03	118.7	-1.1800
92.26	5.43	0.00	87.64	123.6	-1.1222
30°C					
82.05	8.84	0.00	77.01	106.7	-1.2036
88.38	5.29	0.00	81.20	116.5	-1.1643
89.34	5.61	0.00	83.01	118.2	-1.1543
91.37	4.90	0.00	87.33	123.1	-1.1085
40°C					
87.86	4.85	0.00	75.83	112.9	-1.2378
89.62	4.91	0.00	81.25	117.7	-1.1740
90.23	4.91	0.00	84.48	120.3	-1.1340
91.81	5.18	0.00	86.83	122.9	-1.1244
Triton X-102 (1) + C ₂ C ₁ imC ₁ SO ₄ (2) + H ₂ O (3)					
20°C					
88.91	4.87	0.00	75.96	113.8	-1.2507
91.38	4.75	0.00	82.74	120.1	-1.1717
92.53	5.21	0.00	87.11	123.6	-1.1298
30°C					
87.18	5.03	0.00	76.15	112.5	-1.2258
89.56	4.68	0.00	82.74	118.8	-1.1473
91.21	5.033	0.00	87.49	123.0	-1.1062
40°C					
82.89	7.72	0.00	76.19	107.5	-1.2106
88.90	5.25	0.00	81.86	117.4	-1.1604
91.63	6.06	0.00	87.38	122.5	-1.1268

Tabla a.5: Parámetros de la ecuación de Othmer-Tobias y los coeficientes de correlación para Tween 20 (1) + C₂C₁imC_nSO₄ (n = 1,2) (2) + H₂O (3) y distintas temperaturas.

	$T / ^\circ\text{C}$	n	m	R^2
C ₂ C ₁ imC ₁ SO ₄	25	1.4294	0.7179	0.972
	40	1.6731	1.0334	0.984
	50	1.3115	1.0925	0.999
	60	0.8652	0.9544	0.990
C ₂ C ₁ imC ₂ SO ₄	25	16.0947	1.4386	0.998
	40	10.5414	1.7770	0.990
	50	4.0666	1.1315	0.998
	60	1.6255	0.8626	0.997

Tabla a.6: Parámetros de la ecuación de Othmer-Tobias y coeficientes de correlación para Surfactante (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) + H₂O (3) y distintas temperaturas.

Surfactante	$T / ^\circ\text{C}$	n	m	R^2
Triton X-100	20	0.2561	0.5565	0.960
	30	1.0343	1.3359	0.907
	40	0.2066	0.3761	0.977
Triton X-102	20	0.2434	0.5880	0.990
	30	0.2754	0.5431	0.999
	40	0.7434	1.1250	0.967

Tabla a.7: Análisis ANOVA para la metodología superficie de respuesta, el modelo optimizado de parámetros y los valores de ajuste (programa en Inglés).

Source	Sum Squares	Degree Freedom	Mean Square	F-Value	Prob > F
Model	13868	9	1540	46.27	< 0.0001
X_A -T	167.28	1	167.28	5.0200	0.0489
X_B -pH	4.3600	1	4.3600	0.1300	0.7251
X_C -[IL]	13402	1	13402	402.5	< 0.0001
X_{AB}	15.68	1	15.68	0.4700	0.5082
X_{AC}	39.60	1	39.60	1.1900	0.3010
X_{BC}	178.6	1	178.6	5.3600	0.0431
X_A^2	1.2600	1	1.2600	0.3800	0.8496
X_B^2	25.20	1	25.20	0.7600	0.4047
X_C^2	53.79	1	53.79	1.6200	0.2325
b_0	b_A	b_C	b_{BC}		
146.4	-0.7935	-2.6742	-0.1750		
Standard deviation		5.77	R-Squared		0.9766
Mean		49.15	Adj R-Squared		0.9554
C.V.%		11.74	Pred R-Squared		0.8031
PRESS		2795.76	Adeq Precision		22.951

2 Rectas de reparto

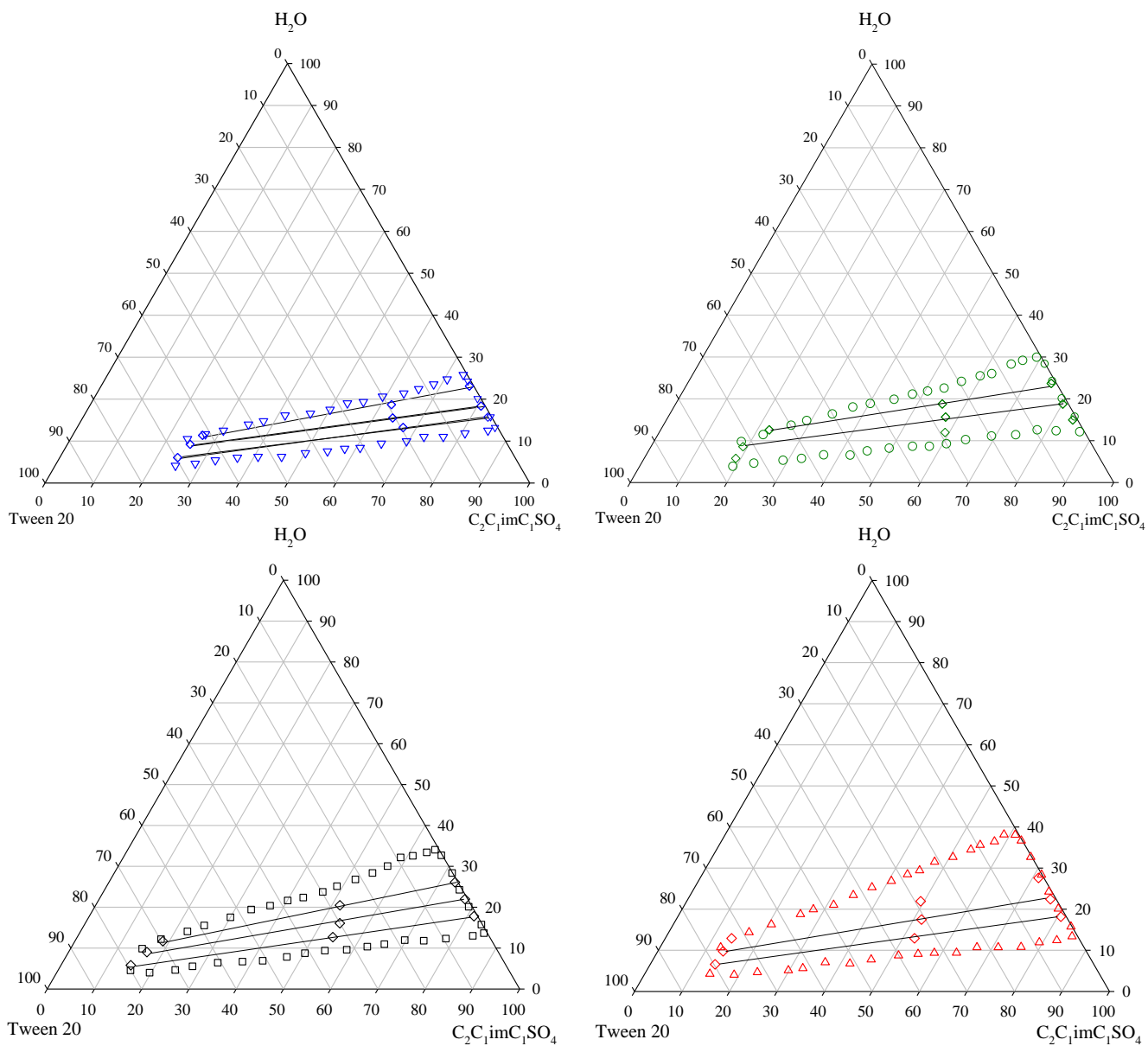


Figura a.1: Rectas de reparto para los sistemas de Tween 20 (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) + H₂O (3) at $T = 25$ °C (∇), 40 °C (\circ), 50 °C (\square), 60 °C (\triangle) y $P = 101.33$ kPa.

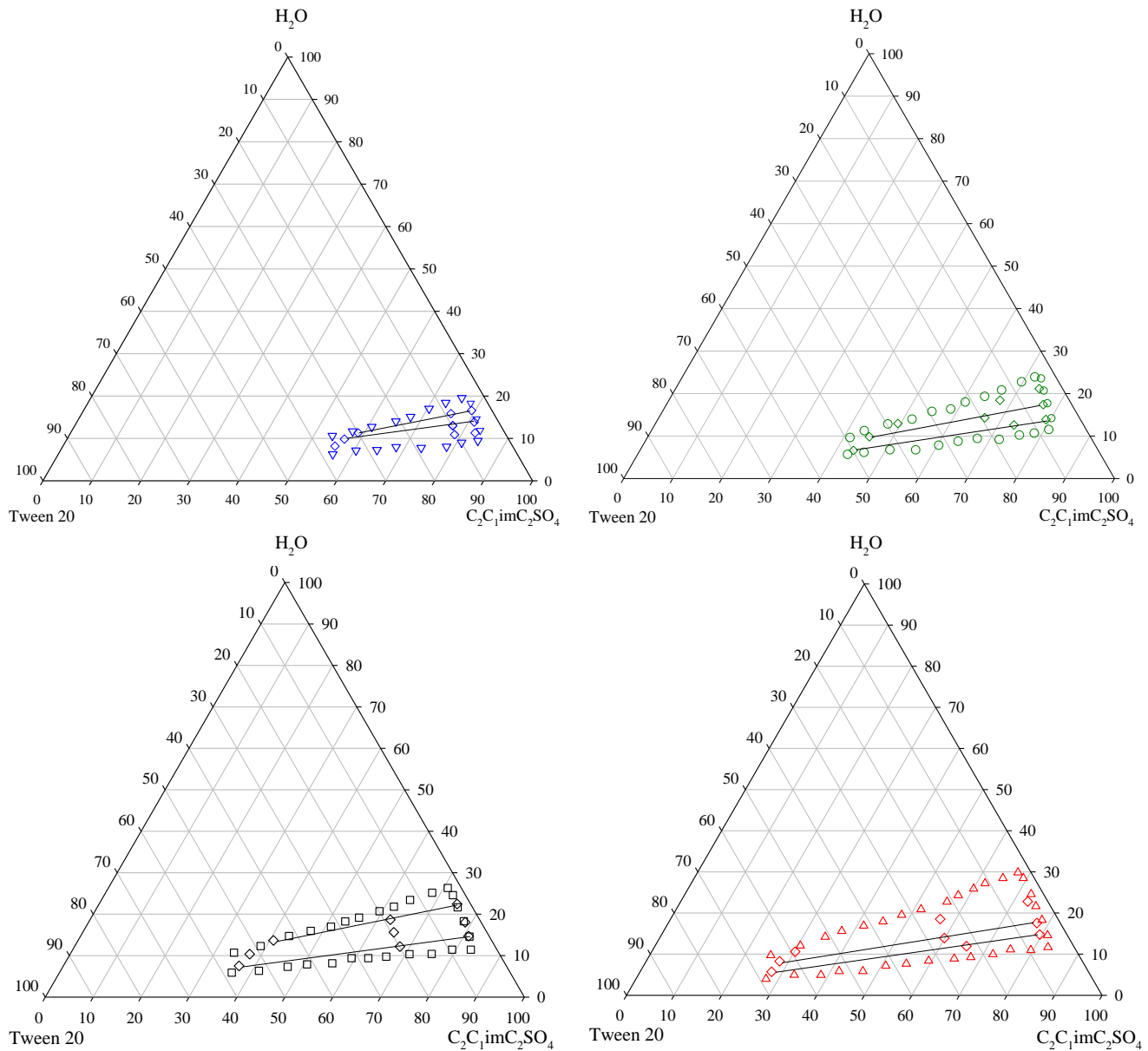


Figura a.2: Rectas de reparto para los sistemas de Tween 20 (1) + C₂C₁imC₂SO₄ (2) +H₂O (3) a $T = 25$

°C (∇), 40 °C (\circ), 50 °C (\square), 60 °C (\triangle) y $P = 101.33$ kPa.

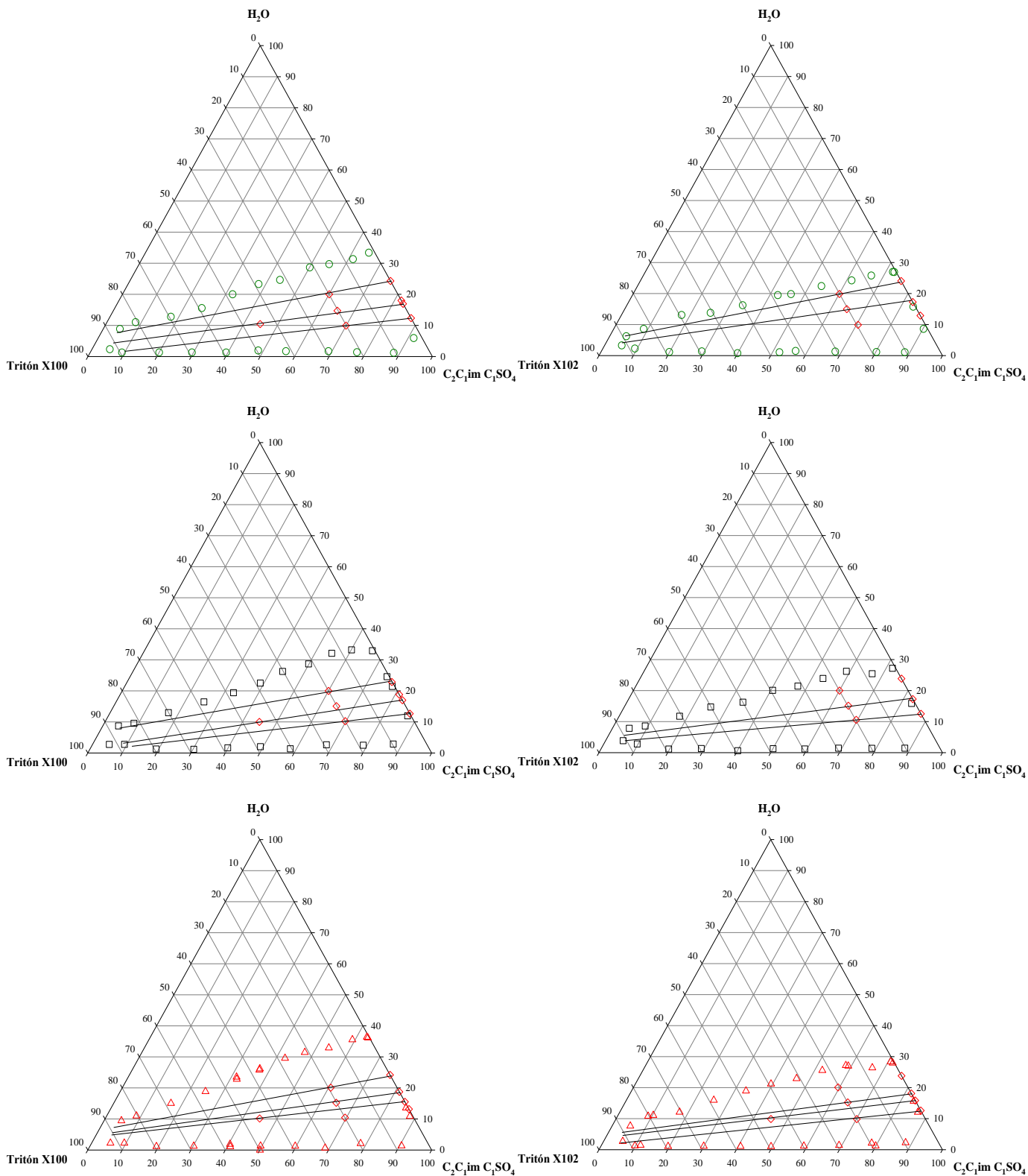


Figura a.3: Rectas de reparto para los sistemas de Triton X-100 ó Triton X-102 (1) + C₂C₁imC₁SO₄ (2) +H₂O (3) a T = 20 °C (○), 30 °C (□), 40 °C (△) y P = 101.33 kPa.